

## Nesvádějme nic na elektronický věk

Když mě onehdy požádal šéfredaktor Chemických Listů o napsání úvodníku („to víš, je nás gramotných málo:-) !“), nic jsem neslibil, ale začal jsem o tom trochu přemýšlet. Zanedlouho přinesl námět život sám.

Co se stalo – Lidové noviny (LN) zveřejňovaly v posledním lednovém týdnu srovnávací žebříčky vysokých škol, pod názvem Unikátní projekt LN po čtvrté. Zpracovatelé dat, což LN samozřejmě nejsou, se dopustili fatální chyby, velmi poškozující fakulty VŠCHT Praha i některé další. Ta je zřejmá z následujícího „dopisu čtenáře“, kterým jsem na článek reagoval a který jsem do LN zaslal 28. ledna se žádostí o jeho uveřejnění:

### Unikátní projekt LN je opravdu unikátní

Společnost SC&C, letos dokonce ve spolupráci s firmou SCIO uskutečnila již čtvrtý pokus o vytvoření žebříčku vysokých škol na základě různých kritérií. Dalo by se říci – záslužná činnost – pokud by ovšem byla udělena správně a korektně. Že tomu tak není, je na první pohled patrné např. z tabulky Žebříček podle citací a publikací v kategorii škol Chemicko-technologických veřejných (LN 27.1.), a to v kolonce Publikace za 10 let. Podobné nesmyslné údaje jsou pochopitelně v souvisejících sloupcích, zde to ovšem již není patrné „na první pohled“.

Jak mohou uniknout zpracovatelům dat do očí bijící nízká čísla u všech fakult Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, která je, jak známo z jiných průzkumů, v publikační činnosti jasnou jedničkou mezi českými vysokými školami? Pokud připustíme, že nešlo o zlý úmysl, jde o jasnou nekompetentnost autorů zveřejněného průzkumu. Ta ostatně vyplývá z uveřejněné metodiky. Začalo se správně – východiskem byla světová databáze publikací – ISI Web of Knowledge a ne slovní česká databáze RIV, obsahující řadu „balastu“ a existující hlavně pro ty autory, kteří se ve světových databázích jaksi nemohou nalézt. „Vyřazeny byly publikace, které nebylo možné na detail fakulty zařadit, např. obsahovaly jen název univerzity...“ dočítáme se ve zveřejněné metodice. Nebylo autorům průzkumu divné, že v případě VŠCHT vyřazují většinu zde vytvořených publikací jen proto, že na nich není uveden název fakulty, ale „jen“ název vysoké školy a příslušného ústavu, tak jak je to ve světě zcela běžné? Kdyby si dali tu práci, nezbytnou pro seriózní výsledek průzkumu, mohli využít zmíněnou databázi RIV k dohledání fakult k vyřazeným publikacím. Ta by tak byla zas jednou rozumně využita a veřejnost by byla informována seriózně. Unikátní projekt LN lze přenést do sportovního světa přiblížením: „...vyhodnotili jsme výsledky Olympijských her. Medailová místa jsme do vyhodnocení nezahrnuli!“

Pro čtenáře LN ještě dovětek:

Autor příspěvku je profesorem Fakulty chemické technologie VŠCHT Praha a jejím bývalým děkanem, sám je ve sledovaném období autorem mnoha desítek publikací v impaktovaných časopisech, uveřejněných v databázi ISI Web of Knowledge.

Asi nesprávně jsem se domníval, že dopis v žádném případě nepoškozuje LN (to rozhodně nebylo mým úmyslem), dává jim naopak šanci reagovat rychle i s tím, že se redakce s jeho obsahem neztotožní a získá tak čas na přípravu rozboru a jeho následné zveřejnění. Odpověď na sebe nenechala dlouho čekat: „Už jsem mluvila s doc. Staňkem a píšu o tom v příštím Diáři R. Kvačkové. Zdraví Kvačková (která jinak nemá s žebříčky nic společného).“

Nic víc, nic miň, někdo nestojí někomu ani za oslovení. Bez ohledu na formu odpovědi, tu nechť čtenář laskavě posoudí sám, jsem se těšil na to, jak LN uvedou vše na správnou míru a Alma Mater bude očištěna. Bohužel jsem se nedočkal. V LN 2.2. se v Diáři Radky Kvačkové pod názvem „Dvorského děti a Liškovy židle“ vzadu krčí následující text:

„Ad žebříčky: Pražská vysoká škola chemicko-technologická, která kralovala na vrcholu tak zvaného Bergerova žebříčku kvality českých vysokých škol z hlediska vědecké publikační činnosti, se v žebříčku společnosti SC&C (minulý týden přinesly LN) ocitla až za Univerzitou Pardubice, VUT Brno a Univerzitou T. Bati Zlín. Podle jejího prorektora Jana Staňka přišli učitelé VŠCHT o osmdesát procent citací v prestižních časopisech prostě tím, že většinou uvádějí na vědecké práce vedle svých jmen jen anglický překlad názvu školy, nikoli až fakult. Ty jsou na VŠCHT totiž velmi úzce propojené. Žebříček SC&C přitom hledal v databázích podle fakult. To je slabá stránka elektronického věku. Počítač pracuje jen s tím, co mu zadáte. Doslova a bez širšího uvážení.“

Co závěrem? Za špatnou práci statistiků, novinářů a vlastně kohokoli rozhodně nemohou počítače! Mějme to na paměti sami, vštěpujme to studentům! Nadpis použitý pro zmíněný článek je jistě pro čtenáře atraktivnější, než nějaké uvádění statistických údajů na správnou míru. Dodejme, že pro čtenáře bulvárního tisku a věřme, že se jim LN přes tuto epizodu nestanou! Těm, kteří se snaží, aby české vysoké školství za něco stálo, je totiž plastový nábytek v kanceláři pana ministra naprosto ukradený.... A omluva poškozeným? Copak se to dneska nosí?!

Libor Červený



dal něco málo aktivního uhlí (tzv. karborafinu), aby mohl pozorovat pohyby u kapky. Tušení ho nezklamalo: při rostoucím  $m$  docházelo k stále čilejším pohybům roztoku u povrchu kapkové elektrody. Tedy uvnitř kapky se amalgam zinku promíchával a tím jeho koncentrace u povrchu klesala, což způsobovalo pozorovaný posun hodnoty  $E_{1/2}$ . Nepřímým důkazem bylo to, že u redox systému železa v oxalátu žádný takový posun nenastával – nebyl přítomen amalgam.

Blížilo se však ještě větší překvapení. Když Pešek seděl u polarografu a nechal roztok se suspenzí karborafinu probublávat dusíkem kvůli odstranění kyslíku, ponechal proudový okruh zapnutý při nulovém vloženém potenciálu, kdy obvykle žádný proud neprotékal. Náhodou mu napadlo podívat se na světelný index zrcátkového galvanometru a všiml si zvláštního záchvěvu, který se po malé chvíli opakoval. Byly to nepatrné proudové impulsy, způsobené dotykem částic karborafinu s kapkovou elektrodou. Ty vznikaly pouze při bublání roztoku; a když se zapnula registrace, vznikl polarogram ve tvaru nepravidelné křivky s maximem okolo  $-1$  V proti kalomelové elektrodě. Necelý rok po Peškově přijetí do zaměstnání se objevilo něco, co nikdo nečekal. Nový jev zaujal posléze i prof. Heyrovského. Jak se brzy ukázalo, podobné, ale lépe reprodukovatelné efekty skýtaly též suspenze dalších látek, jako oxidů nebo sulfidů některých kovů, nejlépe v prostředí chloridu amonného, které bránilo růstu pH u kapky. Publikace výsledků měly ohlas v zahraničí. Našli se spolupracovníci a práce se protáhly až do začátku šedesátých let.

Objevily se však nové perspektivy. Hlad po dostupných zdrojích elektrické energie vzbudil ve světě zájem o výzkum palivových galvanických článků – sen starých elektrochemiků. Z Heyrovského ústavu se odštěpila skupina, která měla tuto problematiku řešit. Byl to úkol veliký. V Hostivaři se našly místnosti pro nové laboratoře a mechanickou dílnu v areálu filmových ateliérů. Pešek jako teoretik se zálibou v matematice byl přijat do této skupiny. Práce se mu slušně dařila. V té době se však objevila skutečně nová problematika v podobě elektrochemie polovodičů. Na stipendium Humboldtovy nadace a doporučení vedoucího hostivařské skupiny prof. Koryty se tedy Pešek vypravil na dlouhodobou stáž do Mnichova na technickou univerzitu, aby si rozšířil své znalosti. Rok a dva měsíce pilné práce vydaly na dvě publikace o elektrochemickém chování polovodičového oxidu zinečnatého, nicméně po návratu domů bylo třeba pokračovat v problematice zdrojů proudu; na zařizování nové laboratoře nebyly vhodné podmínky.

Svémi pracemi na teorii porézních elektrod přispíval Pešek k vývoji laboratorních palivových článků na vodík a kyslík a později i k vývoji zlepšených alkalických akumulátorů typu Ni-Cd a Ni-Fe. Byla mu proto koncem šedesátých let nabídnuta spolupráce s ústavem anorganické technologie VŠCHT. Ta nakonec vedla k zdokonalené teorii olověných a alkalických akumulátorů. Jeho práce stačily podle prof. Koryty na doktorskou disertaci, ale pro personální či politickou atmosféru v ústavu nemohl na obhajobu pomýšlet. Chuť do práce si však ne-

nechal vzít. Čas tedy plynul dále a začátkem 80. let mu byla nabídnuta spolupráce s katedrou elektrotechnologie VUT v Brně na výzkumu olověných akumulátorů. Tak se ocitnul před životní křížovatkou.

Je nutno poznamenat, že tehdy nikdo v oddělení zdrojů proudu v Hostivaři nevěřil, že by další výzkum olověných akumulátorů měl ještě nějaký smysl. V popředí zájmu byly jiné zdroje, hlavně alkalické akumulátory a lithiové články. Víra v praktické uplatnění palivových článků byla silně otřesena. Hledaly se příležitostné zahraniční spolupráce. V Budapešti byl zájem o nový typ železné elektrody (plastem pojené) a v Petrohradě se vylepšovaly malé hermeticky uzavřené akumulátory, což bylo zajímavé kvůli zahraničním stykům resp. cestám. Zatím se v Brně měřily odpory elektrod klasických olověných akumulátorů, což vypadalo jako samoúčelné hraní. Po setkání s příslušnými pracovníky však Pešek projevil zájem. Instinktivně vycítil příležitost, snad proto, že měl zálibu v detailech.

Jak se v nejbližších letech ukázalo, bylo to šťastné rozhodnutí. Zpočátku bylo ovšem nutno vypracovat lepší metodiku měření, což komerční olověné mřížky neumožňovaly. Vyvinuly se proto laboratorní mřížky ve tvaru systému rovnoběžných izolovaných žebířek. Bylo dále nutno objasnit anomální jevy, jako závislosti odporů na čase a na způsobu přípravy vzorku. Konečně zbývala dosud nevyřešená otázka, jak změřit odpor mezi aktivní hmotou a mřížkou (kolektorem proudu), což bylo v popředí zájmu techniků, resp. výrobců. Pešek vypracoval vhodnou metodu, založenou na použití kolektoru z rovnoběžných izolovaných žebířek a počítače on line. Postupně vycházely publikace a jeden člen brněnské skupiny navštívil konferenci o akumulátorech v Nice (1992), kde se setkal s představiteli americké organizace ALABC (Advanced Lead-Acid Battery Consortium). Ti o novou metodu měření projevíli zájem. Pešek s brněnskými kolegy se samozřejmě nabídky na spolupráci, finančně dobře honorovanou, ihned chytili. Dále už to znamenalo pilně pracovat, psát výzkumné zprávy a navštěvovat zahraniční konference. To mu vydrželo až do pokročilého věku. Náplň práce znamenala v podstatě vývoj olověných akumulátorů pro elektrická a později hybridní elektrická vozidla. Vědy (totiž té akademické) v tom bylo poměrně málo, ale mělo to praktický smysl a navíc určitý společenský význam.

V současné době se značně oživil výzkum palivových galvanických článků a publikací přibývá velmi rychle (např. Journal of Power Sources, který vychází dvakrát měsíčně, obsahuje někdy i přes 100 prací, většinou o palivových článcích), takže je prakticky nemožné je všechny sledovat. Do výzkumu se zapojily výzkumné organizace v Japonsku, v Číně a dalších zemích s nasazením velkých finančních i personálních prostředků. Značný podíl v těchto publikacích má elektrochemie polovodičů, která ostatně zasahuje svými výsledky do nejrůznějších vědních oborů a oblastí techniky. U palivových článků jde o elektrolyty resp. membrány z polovodičových organických polymerů (hlavně PEMFC – proton exchange membrane fuel cells) – dále jsou známé zobrazovací jednotky z tekutých

krystalů, v širším smyslu pak stále se rozšiřující aplikace polovodivého oxidu titaničitého. Souvisejícím oborem je též výzkum pevných elektrolytů pro vysokoteplotní palivové články (SOFC – solid oxide fuel cells) a konečně výzkum solárních článků. Nejmladšího data jsou bioelektrochemické palivové články, využívající produktů rozkladné činnosti mikroorganismů.

V posledních desetiletích nabývá na významu ochrana životního prostředí. Elektrochemie zde přispívá k řešení dílčích problémů jako je studium mechanismu a rychlosti environmentálně významných procesů, monitorování polutantů, jakož i degradace toxických sloučenin. Např. pro čištění vody byly navrženy reaktory založené na fotoelektrochemických účincích oxidu titaničitého.

Poměrně mladý obor je bioelektrochemie (resp. biofyziologie), která vyšetřuje biologické systémy včetně DNA pomocí elektrochemických metod. Stojí za zmínku, že zde bylo využito i klasické polarografie. Snad se zde jeví možnost lékařské diagnostiky.

Svým ilustrativním vyprávěním jsem chtěl objasnit, jak křivolaká může být cesta, po které se vědec vydává. Snaha nastínit perspektivy nějakého vědního oboru, který je – jako všechno – ve vývoji, je komplikována tím, že v průběhu desítek let se mohou některé cesty opustit jako nevýhodné a nové mohou být nějakým šťastným objevem vytvořeny. Všechno záleží na lidech. Kdysi v mládí jsem četl, jaký byl Edisonův recept na úspěch: „Tři lžičky štěstí, koflík nadání a 500 kg železné píle a vytrvalosti, to se všechno náležitě promíchá a pak se to využívá, a to je všechno.“

**K. Micka** (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Prague*): **What Are the Outlooks of Electrochemistry?**

A short characteristic of the trends that stimulate the development of natural sciences in general and electrochemistry in particular.

## ADIPOCYTOKINY – NEDÁVNO OBJEVENÉ HORMONY TUKOVÉ TKÁŇE

VOJTĚCH ŠKOP<sup>a</sup>, KATEŘINA KONTROVÁ<sup>a</sup>,  
JARMILA ZÍDKOVÁ<sup>a</sup> a VÁCLAV ZÍDEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, Praha 6, <sup>b</sup> Fysiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, Praha 4 Krč  
vojtech.skop@vscht.cz

Došlo 24.6.08, přijato 10.9.08.

Klíčová slova: adipocytokiny, adipokiny, obezita, tuková tkáň, inzulin, diabetes, inzulinová rezistence, glukosa

### Obsah

1. Úvod
2. Popis a funkce jednotlivých adipocytokinů
  - 2.1. Adipocytokiny potlačující působení inzulinu
  - 2.2. Adipocytokiny podporující působení inzulinu
  - 2.3. Ostatní adipocytokiny
3. Závěr

### 1. Úvod

Tuková tkáň byla po dlouhá staletí stranou zájmu vědců i lékařů, byla považována za pouhé úložiště zásobních látek. Ale nárůst obezity a problémů, které s ní souvisí, za posledních 30 let vedl k vytvoření představy o negativním působení této tkáně jak u vědecké, tak laické veřejnosti. Z tohoto důvodu přišla v posledních dvou desetiletích vlna intenzivního vědeckého zájmu o tyto buněčné typy podporovaná jednak narůstajícím množstvím obezických jedinců a také poznáním, že adipocyty se účastní velkého množství regulačních a homeostatických pochodů. Mezi tyto pochody patří regulace množství tuku a energetické rovnováhy, imunitní odpověď, kontrola krevního tlaku, hemostáza a reprodukční funkce. Tyto procesy jsou regulovány převážně sekrecí tkáňových hormonů z adipocytů a ostatních buněk tukové tkáně, které byly souhrnně nazvány adipocytokiny nebo adipokiny. Působení adipocytokinů je autokrinní, parakrinní i endokrinní a zjednodušeně se dají rozdělit na ty, které podporují působení inzulinu a na ty, které ho potlačují<sup>1</sup>.

Nepříznivý vliv abdominální obezity na metabolismus je zprostředkovan mimo jiné právě změnami v produkci adipocytokinů, ke kterým dochází při výrazném rozvoji obezity<sup>2</sup>. Nedávno popsáné tkáňové hormony sekretované

adipocyty přispívají ke zhoršené produkci inzulinu, inzulinové rezistenci a endotheliálním dysfunkcím. Způsobují zánětlivé stavy a podporují rozvoj aterosklerózy<sup>3,4</sup>.

### 2. Popis a funkce jednotlivých adipocytokinů

#### 2.1. Adipocytokiny potlačující činnost inzulinu

##### *Faktor nekrotizující nádory – $\alpha$*

Faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor –  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) je známý více jako prozánětlivý cytokin produkováný buňkami imunitního systému. Spojení mezi obezitou a expresí prozánětlivých cytokinů bylo poprvé zmíněno před 17 lety. Tato studie předložila názor, že obezita je provázána zánětem a zároveň byla prokázána produkce TNF- $\alpha$  adipocyty a jeho schopnost regulovat působení inzulinu<sup>1,5</sup>. Pozdější práce poukázaly na klíčovou roli TNF- $\alpha$  při rozvoji inzulinové rezistence<sup>6</sup> a jeho zvýšenou krevní hladinu při obezitě vlivem vyšší produkce adipocytů<sup>7</sup>.

TNF- $\alpha$  indukuje fosforylaci substrátu inzulinového receptoru 1 a 2 (IRS-1 a 2) na serinu (Ser) a threoninu (Thr). To brání interakci IRS-1 a 2 s inzulinovým receptorem a fosforylaci na tyrosinu (Tyr) zprostředkované inzulinem<sup>8</sup>. Zároveň způsobuje pokles aktivity lipoproteinlipasy a zvýšení aktivity hormon sensitive lipasy. Následkem je zvýšené uvolňování volných mastných kyselin do oběhu a snížená akumulace lipidů<sup>3</sup>.

##### *Interleukin-6*

Interleukin-6 (IL-6) byl mezi prvními faktory, které byly spojované s rozvojem inzulinové rezistence a kardiovaskulárními chorobami<sup>5</sup>.

Je významnou měrou sekretován v útrobním tuku<sup>9</sup>, kde je jeho sekrece asi třikrát větší než v podkožním tuku. Patří mezi významné prozánětlivé cytokiny a podílí se na rozvoji jaterní inzulinové rezistence<sup>10</sup>. Jeho množství je zvýšené u obezických jedinců a u pacientů s diabetem 2. typu. Na druhou stranu IL-6 za určitých podmínek může podporovat energetickou výměnu a citlivost k inzulinu. Jeho negativní působení na metabolismus zatím zůstává sporné<sup>11</sup>.

##### *Interleukin-1 $\beta$*

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) patří mezi cytokiny se silně prozánětlivým účinkem<sup>12</sup> a v tukové tkáni je nejvíce produkován makrofágy, které jsou zde trvale usídlené. Produkce je vyšší v útrobní tukové tkáni ve srovnání s podkožní. Nedávné studie prokázaly, že exprese IL-1 $\beta$  v tukové tkáni vzroste při obezitě u hlodavců i u lidí. U lidí s vyšší krevní hladinou IL-1 $\beta$  spolu se zvýšeným IL-6 bylo popsáno zvýšené nebezpečí diabetu 2. typu.

IL-1 $\beta$  snižuje expresi IRS-1 na úrovni transkripce a tím porušuje signální dráhu inzulínu. Podílí se tak s ostatními faktory na rozvoji inzulínové rezistence<sup>13</sup>.

#### *Chemotaktický protein monocytů-1*

Chemotaktický protein monocytů-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) patří mezi chemokiny do rodiny malých indukovatelných cytokinů. Hraje velice významnou roli v přestupu monocytů a T-lymfocytů do tkání. Je exprimován v adipocytech a dalších buněčných typech včetně hladkého svalstva a endothelu, pokud dojde k zánětlivému stimulu.

U obezích hlodavců dochází k jeho zvýšené expresi. Pacienti s diabetem mají prokazatelně vyšší hladiny MCP-1 v plasmě. Samotný MCP-1 je schopen narušovat signální dráhu inzulínu v kosterním svalstvu i při běžných fyziologických koncentracích. Tyto nové poznatky napovídají, že MCP-1 má kromě zánětlivé odpovědi další významnou funkci v komunikaci mezi tukovou a svalovou tkání. Může se tak podílet na rozvoji inzulínové rezistence<sup>14</sup>.

#### *Rezistin*

Tento adipocytokin byl identifikován v roce 2000 třemi nezávislými pracovišti. Počáteční studie ukazovaly zvýšenou hladinu rezistinu u obezích hlodavců, snížení hladiny vlivem antidiabetických léků a redukci hyperglykemie imunoneutralizací rezistinu.

Rezistin se skládá ze 114 aminokyselin. Sekretován je jako homodimer, ve kterém jsou podjednotky spojeny disulfidovými můstky. V krevním oběhu se vyskytuje ve dvou formách, hexamerní a trimerní, která je více bioaktivní a netvoří disulfidové vazby. Pravděpodobně se štěpení disulfidových vazeb využívá k aktivaci.

U myši byl popsán vliv vyšší koncentrace rezistinu na snížení příjmu glukosy do buněk. K této změně došlo jiným mechanismem, než ovlivněním signálu inzulínového receptoru, pravděpodobně snížením aktivity glukosových transportérů. Dále bylo prokázáno, že rezistin indukuje expresi faktorů, které inhibují signální dráhu inzulínu. Na myších modelech byla také ukázána pozitivní korelace mezi rostoucím množstvím rezistinu a vyššími hladinami inzulínu, glukosy a lipidů a rozvíjející se obezitou. Vyskytují se ale i práce, které tyto korelace nepotvrzují nebo dokonce vyvracejí.

Zvýšená exprese rezistinu je výsledkem diferenciací adipocytů. Vyšší počet adipocytů u hlodavců lokálně způsobí vyšší produkci rezistinu, který inhibuje inzulínovou signalizaci a příjem glukosy a tím brání i diferenciaci dalších adipocytů. Tímto způsobem je zajištěna zpětná kontrola adipogeneze.

U lidí byla opět zjištěna pozitivní korelace mezi obezitou a vyšší hladinou krevního rezistinu. Během hubnutí navíc došlo k významnému snížení koncentrace rezistinu. U lidí je oproti hlodavcům mnohem více prací, které s těmito výsledky nesouhlasí, proto není jisté, zda má rezistin u lidí na obezitu nějaký vliv. Stejně tak nebyl u lidí prokázán vliv rezistinu na metabolismus glukosy, působení inzulínu nebo diabetes. Pravděpodobně bude v nejbližších

letech působení lidského rezistinu předmětem intenzivního vědeckého zkoumání.

V několika studiích na lidech byl popsán vliv zánětlivých cytokinů na hladinu rezistinu, která významně korelovala např. s IL-6 a C-reaktivním proteinem. Dále bylo prokázáno, že TNF- $\alpha$  a IL-6 silně stimulují expresi rezistinu. Je známo, že při obezitě dochází ke zvýšení hladiny prozánětlivých cytokinů, je pravděpodobné, že rezistin může působit jako signální molekula, iniciující imunitní odpověď a produkci prozánětlivých cytokinů<sup>15</sup>.

#### *Protein vázající retinol 4*

Protein vázající retinol 4 (Retinol binding protein 4, RBP4) je prozatím jediný známý specifický vazebný protein pro retinol v krevním oběhu a dlouhou dobu se myslelo, že jeho jedinou funkcí je roznášení retinolu do tkání. K hlavní produkci dochází v játrech, ale byla popsána i syntéza adipocyty<sup>16,17</sup>.

V roce 2005 bylo objeveno spojení RBP4 s inzulínovou rezistencí. Hladiny RBP4 jsou zvýšené při inzulínové rezistenci a diabetu 2. typu. Po podání antidiabetik se koncentrace RBP4 ustálí na normálních hodnotách. Zvýšená exprese nebo podání rekombinantního RBP4 vyvolává inzulínovou rezistenci, naopak nižší hladiny zvyšují citlivost k inzulínu. Podání syntetických analogů retinolu, která způsobují vyšší vylučování RBP4 močí, upravuje inzulínovou rezistenci a glukosovou intoleranci u obezích myší<sup>16</sup>.

#### *Inhibitor plasminogenového aktivátoru-1*

Dnes je vysoká hladina inhibitoru plasminogenového aktivátoru-1 (plasminogen activator inhibitor, PAI-1) považována za významnou složku metabolického syndromu. Nedávné studie naznačují, že kromě role v ateroskleróze, má vliv i na rozvoj tukové tkáně a funkci inzulínu v adipocytech. Mechanismus, kterým dochází při obezitě ke zvýšené expresi PAI-1, je velice komplexní a účastní se ho několik faktorů<sup>18</sup>.

## 2.2. Adipocytokiny podporující působení inzulínu

#### *Adiponektin*

Adiponektin je exprimován z převážné části v adipocytech. V ostatních buněčných typech se ho syntetizuje pouze malé množství. Byl objeven v roce 1995 na základě rozdílné exprese mRNA v buněčné linii 3T3-L1 diferencovaných adipocytů oproti nediferencovaným preadipocytům. V literatuře je možné ho najít ještě pod názvy Acrp30, AdipoQ, apM1 a Gelatin-binding protein 28 (GBP28).

Adiponektin je složen ze dvou strukturně odlišných oblastí, N-terminální fibrilární doména má kolagenovou strukturu, zatímco C-terminální oblast je globulární. Za nativních podmínek se v monomerní formě nevyskytuje. Základní stavební jednotkou jsou těsně propojené homotrimery, jež se pomocí fibrilární části spojují do složitějších komplexů, které cirkulují v krvi.

Předpokládá se, že adiponektin zvyšuje citlivost tkání

k inzulinu a snižuje riziko aterosklerózy. Jeho koncentrace jsou paradoxně nižší u obézních jedinců oproti hubeným, navíc redukcí tělesné hmotnosti je možné hladinu adiponektinu opět zvýšit. To vede k domněnce, že snížená koncentrace adiponektinu vlivem obezity způsobí snížení citlivosti tkání k inzulinu, což je spojeno s rozvojem inzulinové rezistence a diabetickými stavy. Tento názor podporuje i studie, která prokázala nižší hladiny adiponektinu u pacientů s diabetem oproti zdravým jedincům. Nejvýraznější korelace byla nalezena mezi hladinou adiponektinu a inzulinem stimulovaným příjmem glukosy<sup>19</sup>.

### Leptin

Z fyziologického hlediska způsobuje obezitu porucha energetické rovnováhy. Příjem i výdej energie musí být přísně regulované, aby byla tělesná hmotnost udržována na konstantní hodnotě. Regulace těchto procesů se účastní komplexní interakce různých faktorů produkovaných v periferních tkáních. Pomocí systému zpětné kontroly je jejich působení nakonec zakotveno v centrálním nervovém systému (CNS), kde se jejich interakce přemění na nervový signál.

Nedostatek leptinu se u modelových organismů projevuje sníženým výdejem energie a obezitou. Krevní koncentrace leptinu vzrůstají se zvětšující se obezitou a se zvětšujícím se podílem tukové tkáně. Syntéza se dále zvyšuje se zvětšující se velikostí adipocytů. Hladina leptinu je navíc ovlivněna řadou dalších faktorů, jako je věk, pohlaví, teplota, ve které se organismus nachází, nebo poruchy příjmu potravy (anorexie, bulimie), při kterých je pozměněn i transport leptinu přes hematoencefalickou bariéru.

Během hladovění je exprese leptinu na nízké úrovni, silně poklesne i jako odezva na zvýšený výdej energie. Po najedení dojde k rychlému obnovení syntézy a krevní koncentrace leptinu. Tímto způsobem leptin slouží jako senzor krátkodobých změn v energetickém metabolismu a jako regulátor příjmu potravy. Při hladovění jsou leptinové receptory nacházející se v hypothalamu bez navázaného leptinu, protože jeho koncentrace je příliš nízká, což vyvolává pocit hladu. Následkem zvýšení koncentrace leptinu je jeho vazba na receptory a útlum pocitu hladu. V CNS má vliv ještě na sekreci některých hormonů a neurotransmiterů.

Leptin, kromě CNS, působí i v periferních tkáních např. v játrech, ledvinách, slinivce, kosterním svalstvu, střevech a reprodukčních orgánech, kde ovlivňuje metabolismus sacharidů a působení inzulinu, metabolismus lipidů, termoregulaci, ovulaci a dospívání. Syntéza leptinu probíhá z převážné části v tukové tkáni, ale je exprimován i v jiných tkáních např. v kosterním svalstvu, žaludku, kostní dřeni a játrech, zde je jeho syntéza značně závislá na věku. Zajímavým poznáním bylo objevení exprese leptinu i jeho receptoru v placentě a vaječnicích<sup>20</sup>.

### Visfatin

Visfatin byl popsán jako adipocytokin, jehož exprese probíhá převážně v útrobní tukové tkáni. Jeho význam

v regulaci metabolismu lipidů a sacharidů spočívá zejména ve schopnosti vazby na inzulinový receptor a v aktivaci inzulinové signalizační kaskády. Visfatin podporuje účinek inzulinu, stimuluje lipogenezi a příjem glukosy do buněk. U heterozygotních myši s jednou alelou visfatinu defektní se vyskytuje porušená glukosová tolerance a vyšší hladina glukosy. Pokud jsou defektní obě alely, myši umírají v časném embryonálním stádiu. Při použití kompetitivních metod se zjistilo, že vazba inzulinu neovlivňuje vazbu visfatinu a naopak, navíc visfatin se váže s podobnou afinitou i na inzulinový receptor s mutovanou extracelulární  $\alpha$ -podjednotkou, což je místo vazby inzulinu. Tato data nasvědčují, že visfatin skutečně aktivuje inzulinovou signalizační kaskádu vazbou na inzulinový receptor, ale místo této vazby je jiné než místo vazby inzulinu<sup>21</sup>.

Hladina visfatinu v plasmě je zvýšená u osob s diabetem 2. typu, nezávisle na dalších faktorech<sup>22</sup>, ale i u diabetiků 1. typu. Obecně se zdá, že zvýšené množství visfatinu v krvi je spojeno s pokročilým poškozením  $\beta$ -buněk<sup>23</sup>. Možným regulačním prvkem sekrece visfatinu, kromě regulace dalšími adipocytokiny<sup>24</sup>, se zdá být hladina glukosy a inzulinu. Při zvýšené hladině glukosy v krvi dochází ke zvýšení koncentrace visfatinu. V přítomnosti inzulinu a stejně zvýšené koncentraci glukosy však k navýšení hladiny visfatinu nedochází<sup>25</sup>.

Při objevení visfatinu bylo zjištěno, že jeho mRNA kóduje protein, který je již delší dobu znám jako imunomodulační cytokin, faktor podporující zrání pre-B buněk (pre-B cell colony-enhancing faktor, PBEF)<sup>23</sup>. Ještě před objevením visfatinu a jeho funkcí v metabolismu lipidů a sacharidů byla zjištěna významná sekvenční homologie savčího PBEF s bakteriálním proteinem, identifikovaným jako nikotinamidfosforibosyltransferasa (EC 2.4.2.12, NamPRTasa), významným enzymem katalyzujícím první krok syntézy NAD z nikotinamidem. Současně byla u PBEF tato enzymová aktivita potvrzena<sup>26</sup>.

### Protein stimulující acylaci a adipsin

Protein stimulující acylaci (acylation stimulating protein, ASP) je jedním z faktorů, které mají přímý vliv na diferenciaci adipocytů. Vzniká štěpením komplementového proteinu C3, ke kterému dochází v extracelulárním prostoru. C3 je sekretován několika typy buněk, mezi které patří také zralé adipocyty. Vznik ASP začíná vazbou C3 na faktor B, tento komplex je následně štěpen serinovou proteasou adipsinem. Adipsin je dalším proteinem sekretovaným adipocyty, jehož exprese, stejně jako exprese C3 a faktoru B, podporují chylomikrony.

Funkční studie ukazují, že ASP stimuluje příjem mastných kyselin, glukosy a syntézu triacylglycerolů (TAG) jiným mechanismem než vazbou na C3 receptor. ASP se také účastní rozvoje tukové tkáně. Byl prokázán vliv ASP na diferenciaci adipocytů *in vitro*. Tyto výsledky byly následně potvrzeny *in vivo* na myších modelech s geneticky vyřazeným proteinem C3, které měly redukováné množství tukové tkáně a zhoršený příjem TAG<sup>27</sup>.

*Vaspin*

Strukturně je vaspin jedním z členů rodiny inhibitorů serinových proteas, tzv. serpinů. Je produkován tukovou tkání a vykazuje 40% homologii s  $\alpha_1$ -antitrypsinem.

Úroveň exprese a sérová koncentrace vaspinu poklesne při diabetu a při snížení tělesné hmotnosti. Na normální hodnoty se opět dostane podáním inzulínu nebo činidel zvyšujících citlivost k inzulínu. Podání vaspinu obézním myším upravuje glukosovou toleranci a citlivost k inzulínu, normalizuje koncentraci krevní glukosy a také ovlivňuje expresi dalších faktorů důležitých v inzulínové rezistenci (TNF- $\alpha$ , leptin, rezistin a další).

Vaspin je faktor sekretovaný tukovou tkání, s potenciální antiproteasovou aktivitou, který zlepšuje některé poruchy provázející metabolický syndrom zvýšením citlivosti tkání k inzulínu. Není ale jasné, zda má tuto funkci on sám nebo potenciální substrát proteasy, kterou inhibuje<sup>28</sup>.

*Omentin*

Na základě rozdílné exprese mezi útrobní a podkožní tukovou tkání byl identifikován další adipocytokin, který byl pojmenován omentin. Podobně jako visfatin má pozitivní vliv na příjem glukosy adipocyty, ale nevykazuje inzulín mimetický efekt, pouze zvyšuje citlivost buněk k inzulínu. Omentin není sekretován přímo adipocyty, ale podpůrnými cévními buňkami<sup>29</sup>.

## 2.3. Ostatní adipocytokiny

*Interleukin-18*

Interleukin-18 (IL-18) je další prozánětlivý faktor. Hraje významnou roli při různých imunitních onemocněních, jako je např. systémový lupus erythematosus (SLE)<sup>30</sup>. Zvýšená krevní hladina IL-18 je spojena s obezitou, metabolickým syndromem a rizikem aterosklerózy a metabolického syndromu<sup>31,32</sup>. Předpokládá se proto produkce IL-18 v tukové tkáni<sup>32</sup>.

U transgenních myší, které mají vyřazený gen pro IL-18 nebo jeho receptor, se vyskytuje obezita a inzulínová rezistence, ke které dochází v játrech, svalch a tukové tkáni a s ní související hyperinzulinemie a hyperglykemie. Obezita je výsledkem vyššího příjmu potravy a následné akumulace tuku. V játrech dochází k inzulínové rezistenci prostřednictvím zvýšené exprese genů podílejících se na glukoneogenezi, což poukazuje na novou roli IL-18 v homeostáze energetického příjmu a citlivosti tkání k inzulínu<sup>33</sup>.

*Rozpustný preadipocytový faktor-1*

Rozpustný preadipocytový faktor-1 (preadipocyte factor-1, Pref-1) je transmembránový protein vysoce exprimovaný v preadipocytech. Expresie u zralých adipocytů úplně chybí. Extracelulární oblast Pref-1 podléhá na dvou místech proteolytickému štěpení za vzniku 50 a 25 kDa rozpustných produktů.

Myši s transgenní expresí většího štěpného produktu Pref-1 v tukové tkáni vykazují podstatný pokles hmotnosti

celkového tuku a nižší expresí faktorů sekretovaných adipocyty, včetně leptinu a adiponektinu. U těchto myší s částečnou ztrátou tukové tkáně se projevila hyperglykemie, porušená glukosová tolerance a zhoršená citlivost k inzulínu. Výsledky ukazují, že rozpustný Pref-1 má negativní vliv na adipogenezi a s ní související správnou funkci adipocytů<sup>34</sup>.

*Angiotensin*

Renin-angiotensinový systém je známý důležitý regulační mechanismus krevního tlaku a hospodaření s elektrolyty. Produkce angiotensinogenu – prekurzoru angiotensinu – byla na konci 20. století zjištěna také v tukové tkáni, kde je vyšší u obézních jedinců ve srovnání s hubenými. Vyšší exprese je podobně jako u dalších adipocytokinů v útrobní tukové tkáni ve srovnání s podkožní.

Dosavadní výsledky ukazují, že angiotensin produkováný tukovou tkání by mohl být významný faktor ovlivňující expresi dalších adipocytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-6, PAI-1, leptinu a dalších) a mohl by tak ovlivňovat významné pochody probíhající v tukové tkáni, včetně zánětlivých procesů a růstu tukové tkáně<sup>35,36</sup>.

## 3. Závěr

Hlavní podmínkou přežití člověka byla po dlouhou dobu jeho schopnost šetřit energii a překonat různě dlouhá období nedostatku potravy. Slabí jedinci umírali a přežívali pouze ti, kteří měli vhodnou genetickou výbavu k efektivnímu ukládání a využívání svých energetických zásob. Předpokládáme, že jedny z faktorů, které patří do této „vhodné genetické výbavy“, jsou právě adipocytokiny a to zejména ty, které podporují činnost inzulínu (adiponektin, leptin, visfatin, ASP, adiposin vaspin, omentin a pravděpodobně i další). Za normálních fyziologických podmínek nebo dokonce za stavu hladovění tyto adipocytokiny podporují růst tukové tkáně, příjem glukosy a brzdí odbourávání energetických zásob ve formě TAG. Jsou v jisté rovnováze s ostatními adipocytokiny (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1, rezistinem, RBP4, PAI-1 a dalšími), které naopak brání v jejich působení a v působení inzulínu. Společné působení všech adipocytokinů spolu se správným působením mnoha dalších mechanismů, mezi které patří např. neurohormonální regulace a transkripční faktory, udržuje homeostázu důležitých metabolitů a podporuje správný růst tukové tkáně.

Celkový růst tukové tkáně, včetně diferenciací adipocytů, je tedy řízen kromě adipocytokinů mnoha dalšími stejně důležitými pochody, které v tomto článku nejsou diskutovány. Není to tedy pasivní odpověď organismu na nadměrný příjem energie ve formě potravy, ale je to vysoce regulovaný složitý proces. V obecném povědomí je schopnost tukové tkáně rozpínat se do nekonečna, ale právě poslední informace o regulaci jejího růstu, včetně nových poznatků o adipocytokinech naznačují, že tomu tak není. Pokud velikost tukové tkáně při pozitivní energetické bilanci překročí určitou hranici, přestane být schopna dále



se zvětšovat a přestane být schopna dále ukládat živiny. Tyto živiny, zejména volné mastné kyseliny, se pak začnou ukládat v jiných tkáních, převážně játrech a svalch, kde působí negativně. Vlivem zvyšování produkce prozánětlivých adipocytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1) dochází v tukové tkáni ke zvyšování počtu makrofágů a dalších imunitních buněk, vlivem čehož dochází k opětovně vyšší produkci těchto faktorů. Ty pak potlačují působení inzulínu a tím brání dalšímu příjmu živin do tukové tkáně. Při nadměrné obezitě dochází tedy ke změně v produkci adipocytokinů. Již nejsou v rovnováze adipocytokiny potlačující a podporující činnost inzulínu, ale dochází k vyšší produkci rezistinu, TNF- $\alpha$ , RBP4 a dalších, které brání tukové tkáni v rozvoji a v mnoha jiných tkáních způsobují inzulínovou rezistenci. Naproti tomu se při obezitě produkce adipocytokinů podporujících činnost inzulínu, zejména leptinu a adiponektinu, snižuje a nejsou tak již schopny podpořit správné fungování tukové tkáně. Tento regulační mechanismus působí pravděpodobně proti nadměrnému nárůstu obezity, ale za cenu vzniku celkových poruch v organismu, např. diabetu 2. typu a aterosklerózy, poruch, které často končí až smrtí.

Nové poznatky o tukové tkáni nás postupně utvrzují, že regulační procesy, které zde probíhají, jsou velice komplexní a složité a budou pravděpodobně mnohem složitější, než se dnes domníváme. Objevení a poznání vzájemné souhry či protihry všech adipocytokinů bude předmětem intenzivního vědeckého zkoumání několika příštích desetiletí. Na druhou stranu už poznatky, které víme dnes, by nám v blízké budoucnosti mohly umožnit účinnou terapii poruch souvisejících s obezitou. Z klinického hlediska by každý z adipocytokinů mohl představovat potenciální cíl působení nových léků.

*Tato publikace vznikla za finanční podpory grantů IAA500110805 a MŠMT 6046137305.*

#### LITERATURA

- Rosen E. D., Spiegelman B. M.: *Nature* 444, 847 (2006).
- Sethi J. K., Vidal-Puig A. J.: *J. Lipid. Res.* 48, 1253 (2007).
- Zahorska-Markiewicz B.: *Adv. Med. Sci.* 51, 111 (2006).
- Trayhurn P., Wood I. S.: *Br. J. Nutr.* 92, 347 (2004).
- Tilg H., Moschen A. R.: *Mol. Med.* 14, 222 (2008).
- Uysal K. T., Wiesbrock S. M., Marino M. W., Hotamisligil G. S.: *Nature* 389, 610 (1997).
- Hotamisligil G. S., Arner P., Caro J. F., Atkinson R. L., Spiegelman B. M.: *J. Clin. Invest.* 95, 2409 (1995).
- Paz K., Hemi R., LeRoith D., Karasik A., Elhanany E., Kanety H., Zick Y.: *J. Biol. Chem.* 272, 29911 (1997).
- Fontana L., Eagon J. C., Trujillo M. E., Scherer P. E., Klein S.: *Diabetes* 56, 1010 (2007).
- Klover P. J., Clementi A. H., Mooney R. A.: *Endocrinology* 146, 3417 (2005).
- Febbraio M. A.: *J. Clin. Invest.* 117, 841 (2007).
- Dinarello C. A.: *J. Exp. Med.* 201, 1355 (2005).
- Jager J., Grémeaux T., Cormont M., Le Marchand-Brustel Y., Tanti J. F.: *Endocrinology* 148, 241 (2007).
- Sell H., Dietze-Schroeder D., Kaiser U., Eckel J.: *Endocrinology* 147, 2458 (2006).
- Kusminski C. M., McTernan P. G., Kumar S.: *Clin. Sci.* 109, 243 (2005).
- Yang Q., Graham T. E., Mody N., Preitner F., Peroni O. D., Zabolotny J. M., Kotani K., Quadro L., Kahn B. B.: *Nature* 436, 356 (2005).
- Stefan N., Hennige A. M., Staiger H., Machann J., Schick F., Schleicher E., Fritsche A., Häring H. U.: *Diabetes Care* 30, 1173 (2007).
- Alessi M. C., Juhan-Vague I.: *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 26, 2200 (2006).
- Berg A. H., Combs T. P., Scherer P. E.: *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 84 (2002).
- Margetic S., Gazzola C., Pegg G. G., Hill R. A.: *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 1407 (2002).
- Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M., Segawa K., Tanaka M., Kishimoto K., Matsuki Y., Murakami M., Ichisaka T., Murakami H., Watanabe E., Takagi T., Akiyoshi M., Ohtsubo T., Kihara S., Yamashita S., Makishima M., Funahashi T., Yamanaka S., Hiramatsu R., Matsuzawa Y., Shimomura I.: *Science* 307, 426 (2005).
- Chen M. P., Chung F. M., Chang D. M., Tsai J. C., Huang H. F., Shin S. J., Lee Y. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 295 (2005).
- López-Bermejo A., Chico-Julià B., Fernández-Balsells M., Recasens M., Esteve E., Casamitjana R., Ricart W., Fernández-Real J. M.: *Diabetes* 55, 2871 (2006).
- Kralisch S., Klein J., Lossner U., Bluher M., Paschke R., Stumvoll M., Fasshauer M.: *J. Endocrinol.* 185, 1 (2005).
- Haider D. G., Schaller G., Kapiotis S., Maier C., Luger A., Wolzt M.: *Diabetologia* 49, 1909 (2006).
- Rongvaux A., Shea R. J., Mulks M. H., Gigot D., Urbain J., Leo O., Andris F.: *Eur. J. Immunol.* 32, 3225 (2002).
- Kalant D., Maslowska M., Scantlebury T., Wang H. W., Cianflone K.: *CJD* 27, 154 (2003).
- Hida K., Wada J., Eguchi J., Zhang H., Baba M., Seida A., Hashimoto I., Okada T., Yasuhara A., Nakatsuka A., Shikata K., Hourai S., Futami J., Watanabe E., Matsuki Y., Hiramatsu R., Akagi S., Makino H., Kanwar Y. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10610 (2005).
- Yang R. Z., Lee M. J., Hu H., Pray J., Wu H. B., Hansen B. C., Shuldiner A. R., Fried S. K., McLenithan J. C., Gong D. W.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, 1253 (2006).
- Dinarello C. A.: *Semin. Nephrol.* 27, 98 (2007).
- Zirlik A., Abdullah S. M., Gerdes N., MacFarlane L., Schönbeck U., Khera A., McGuire D. K., Vega G. L.,

- Grundy S., Libby P., de Lemos J. A.: *Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2043 (2007).
32. Trayhurn P., Wood I. S.: *Br. J. Nutr.* 92, 347 (2004).
  33. Netea M. G., Joosten L. A., Lewis E., Jensen D. R., Voshol P. J., Kullberg B. J., Tack C. J., van Krieken H., Kim S. H., Stalenhoef A. F., van de Loo F. A., Verschueren I., Pulawa L., Akira S., Eckel R. H., Dinarello C. A., van den Berg W., van der Meer J. W.: *Nat. Med.* 12, 650 (2006).
  34. Lee K., Villena J. A., Moon Y. S., Kim K. H., Lee S., Kang C., Sul H. S.: *J. Clin. Invest.* 111, 453 (2003).
  35. van Harmelen V., Ariapart P., Hoffstedt J., Lundkvist I., Bringman S., Arner P.: *Obes. Res.* 8, 337 (2000).
  36. Hauner H.: *Proc. Nutr. Soc.* 64, 163 (2005).

**V. Škop<sup>a</sup>, K. Kontrová<sup>a</sup>, J. Zídková<sup>a</sup>, and V. Zidek<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague,* <sup>b</sup>*Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague*):  
**Adipocytokines – Recently Discovered Fat Tissue Hormones**

The number of obese and overweight individuals has risen dramatically over the last three decades. Obesity is not only associated with the development of the type 2 diabetes and hypertension but it also has negative effects on liver function, leading to diseases such as nonalcoholic fatty liver disease. Insulin resistance is the primary defect underlying the development of the type 2 diabetes and is a central component defining the metabolic syndrome. Adipose tissue produces and secretes a variety of tissue hormones – adipocytokines and adipokines. The recently described adipocyte secretory hormones contribute to the pathogenesis of impaired insulin secretion and insulin resistance, endothelial dysfunction, a pro-inflammatory state and promote progression of atherosclerosis. The present article gives an overview of the well-known adipocytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1, resistin, RBP4, PAI-1, adiponectin, leptin, visfatin, ASP, vaspin, omentin, IL-18, Pref-1, angiotensin) and their role in the regulation of metabolism.

## VYUŽITIE ROZTAVENÝCH ANORGANICKÝCH SOLÍ AKO CHLADIACÍCH MÉDIÍ V JADROVEJ ENERGETIKE – SOL' ZEME A SVETLO SVETA

MICHAL KORENKO a MARIÁN KUCHARÍK

Ústav anorganickej chémie SAV, Dúbravská cesta 9,  
845 36 Bratislava 45, Slovenská republika  
uachmiko@savba.sk

Došlo 26.11.07, prepracované 29.4.08, prijaté 2.6.08.

Kľúčové slová: vysokoteplotné chladiace médiá, vysokoteplotné nukleárne reaktory, reaktory IV. generácie, vodíková ekonomika, nukleárna fúzia vodíka

### Obsah

1. Úvod
2. Najdiskutovanejšie aplikácie
  - 2.1. Teplotransportný systém na báze roztavených fluoridov
    - 2.1.1. Výroba vodíka termochemickými procesmi
    - 2.1.2. Ťažba a spracovanie bituminóznych pieskov a ropno-nosných bridlíc
    - 2.1.3. Breytnov cyklus účinnejšej výroby elektrickej energie
  - 2.2. Pokročilý vysokoteplotný nukleárny reaktor
  - 2.3. Rýchly množivý reaktor
  - 2.4. Reaktor s palivom rozpusteným v tavenine na báze anorganických solí
  - 2.5. Termonukleárna fúzia vodíka
3. Záver

### 1. Úvod

Voda v jej rôznych formách je v súčasnosti výhradným teplotransportným médiom v priemysle. Od ľadu až po stlačenú vodnú paru, od hasenia požiarov, spracovania potravín, ľahký a ťažký priemysel cez parné turbíny, na ktorých dodnes prakticky stojí konverzia tepla na elektrickú energiu, až po obrovské chladiace veže; dominanty a symboly jadrových elektrární (aj keď hlavne v prímorských štátoch používajú aj iné spôsoby chladenia). Silná dominancia vody v priemysle a energetike je založená na bezkonkurenčnom spojení jej dvoch kľúčových vlastností; vysokej tepelnej kapacity, a lacnej dostupnosti. Jej jediným limitujúcim faktorom je tepelná stabilita a z toho vyplývajúca použiteľnosť vody maximálne do 550 °C a aj to len vo forme stlačenej vodnej pary.

V posledných rokoch je ale badať zvýšený záujem, pochádzajúci hlavne z nukleárnej energetiky, o výskum a vývoj použitia roztavených anorganických solí ako chla-

diaciach a teplotransportných systémov<sup>1–4</sup>. Pôsobnosť a teplotné okno ich použitia (450–1000 °C, často aj viac) vysoko prevyšuje použitie stlačenej vodnej pary. Nejde o nóvum, len o znovu oživený záujem vychádzajúci zo starších konceptov amerických jadrových reaktorov na báze roztavených solí (Molten Salts Reactors). Tento „revival“ je priamym dôsledkom nových možností aplikácií tzv. vysokopotencionálneho tepla (tepla transportovaného pri vysokých teplotách transportného média), ale aj rozvoja už zmienovaných konceptov nukleárných reaktorov na báze roztavených solí.

Historicky predstavovalo použitie parných turbín (ak nerátame spaľovacie turbíny, ktoré sú pre nukleárne aplikácie nepoužiteľné) donedávna prakticky jediný efektívny spôsob konverzie tepelnej energie na elektrickú, čo výrazne ovplyvňovalo vývoj konceptov civilných nukleárných reaktorov. Hoci z kurzu termodynamiky vieme, že akýkoľvek termodynamický stroj (a teda aj nukleárny reaktor spojený s turbínou, či spaľovací motor) pracuje pri vyšších teplotách efektívnejšie, doteraz bolo práve kvôli historickej dominancii parného cyklu len málo pokusov o vývoj vysokoteplotných technológií pre výrobu elektrickej energie. Pokrok vo vývoji tzv. Breytnovho cyklu; vysokoteplotnej turbíny na báze dusíka, alebo hélia, schopnej konvertovať teplo na elektrickú energiu pri teplotách až do 1000 °C, otvára dvere pre vývoj a využitie nukleárných reaktorov pracujúcich pri vyšších teplotách. Zároveň sa ukázali aj ďalšie možnosti využitia vysokopotencionálneho tepla a to predovšetkým pre termochemickú produkciu vodíka či už pre dlho zamýšľaný koncept tzv. vodíkovej ekonomiky, alebo hydrogenačné spôsoby spracovania rôznych druhov ropy. Veľmi zaujímavé je využitie vysokopotencionálneho tepla pre priamu ťažbu a *in-situ* spracovanie bituminóznych (asfaltických) pieskov a živcových ropno-nosných bridlíc. Dokonca sa reálne uvažuje o taveninách anorganických solí ako chladiacom médiu tzv. prvej steny reaktora pre termonukleárnu fúziu vodíka<sup>5–7</sup>.

Koncepty využitia anorganických tavenín ako chladiaceho média v nukleárných reaktoroch boli poloprevádzkovo testované v rôznych projektoch v 50. až 70. rokoch v ORNL (Oak Ridge National Laboratory) v USA (Aircraft Reactor Experiment, Molten Salts Reactor Experiments a iné).

Zaujímavý bol dôvod vývoja týchto reaktorov. Prvý z týchto reaktorov (ARE) bol zamýšľaný ako výkonná pohonná jednotka pre ďalekonosné bombardéry schopné bez prestávky lietať niekoľko dní. Tento zámer bol neskôr po vývoji medzikontinentálnych balistických rakiet pozmenený a konvertoval do vývoja jadrových reaktorov pre ponorky. V 60. a 70. rokoch bol poloprevádzkovo testovaný aj civilný nukleárny reaktor na báze roztavených solí (MSRE, MSBR). Z politických a vojenských dôvodov (nie však z technologických) bol tento projekt zastavený<sup>8</sup>. Skú-

senosti z uvedenými experimentálnymi reaktormi predstavujú solídny základ poznatkov v danej oblasti. Utajené experimentálne štúdie vykonané počas studenej vojny v 40. a 50. rokoch súvisiace s týmito reaktormi predstavovali *de facto* začiatok modernej taveninovej chémie ako experimentálnej vedy<sup>8</sup>. V súčasnosti sa tieto koncepty jadrových reaktorov, ktoré patria do skupiny reaktorov tzv. IV. generácie považujú za veľmi perspektívne nielen kvôli efektívnejšej a bezpečnejšej prevádzke, ale aj kvôli predpokladanej schopnosti spracovávať aj vyhorené palivo zo súčasných reaktorov.

V literatúre sa najčastejšie uvádza 5 možných vysokoteplotných aplikácií teplotransportných systémov na báze roztavených anorganických solí, ktoré súvisia s rôznym využitím nukleárnej energie:

- 1) teplotransportný systém na báze roztavených fluoridov pre termochemickú produkciu vodíka pre vodíkovú ekonomiku, *in-situ* veľkokapacitnú ťažbu a spracovanie bituminóznych (asfaltických) pieskov (tar sands) a živcových ropno-nosných bridlic (oil shales), alebo Breytnov cyklus účinnejšej výroby elektrickej energie.
- 2) tzv. pokročilý vysokoteplotný nukleárny reaktor (Advanced High Temperature Reactor), ktorý je založený na použití tuhého paliva zakomponovaného do grafitovej matrice a využitií roztavených solí v primárnom aj sekundárnom okruhu reaktora.
- 3) rýchly množivý reaktor (Liquid Salt Cooled Fast Reactor) využívajúci tuhé pokovené palivo chladené v primárnom aj sekundárnom okruhu roztavenými soľami.
- 4) nukleárny reaktor s palivom rozpusteným v tavenine na báze anorganických solí (Molten Salt Reactor), ktorá zároveň funguje aj ako chladiaci systém primárneho okruhu.
- 5) využitie teplotransportných možností roztavených anorganických solí v nukleárnej fúzii vodíka.

Výber vhodných konkrétnych zmesí tavenín anorganických solí pre všetky uvedené aplikácie by mal spĺňať nasledujúce všeobecné požiadavky<sup>9,10</sup>:

- čo najväčší interval tepelnej a chemickej stability a to aj v prostredí intenzívnej radiácie,
- materiálová kompatibilita hlavne s vysokoteplotnými zliatinami a grafitom,
- schopnosť rozpúšťať použiteľné množstvá jadrového paliva (platí hlavne pre bod 4).

Tieto základné požiadavky môžu byť rozšírené aj o ďalšie špecifické parametre, predovšetkým chemické, termodynamické, transportné a nukleárne (korózna aktivita, tepelné kapacity, tepelná vodivosť, viskozita, tlak pár, hustota, povrchové vlastnosti, neutrónová bilancia, moderátorový koeficient, cena, atď.). Na základe týchto požiadaviek a na základe predchádzajúcich skúseností so staršími konceptmi sa v súčasnosti v literatúre uvažuje o použití hlavne týchto typov fluoridových taveninových systémov<sup>2</sup>:

- fluoridové taveniny alkalických kovov: LiF–KF, LiF–RbF, FLiNaK (LiF–NaF–KF), LiF–NaF–RbF,
- fluoridové systémy na báze ZrF<sub>4</sub>: LiF–NaF(KF, RbF)–ZrF<sub>4</sub>, LiF–NaF–ZrF<sub>4</sub>, NaF–RbF–ZrF<sub>4</sub>,
- fluoridové systémy na báze BeF<sub>2</sub>: LiF–BeF<sub>2</sub>, NaF–BeF<sub>2</sub>, LiF–NaF–BeF<sub>2</sub>.

O iných ako fluoridových taveninách sa prakticky neuvažuje, hlavne kvôli výrazne vyššej tepelnej a radiačnej stabilite fluoridov a zároveň ich nízkej prchavosti oproti ostatným potenciálnym kandidátom (ostatné halogenidy a oxidy).

## 2. Najdiskutovanejšie aplikácie

### 2.1. Teplotransportný systém na báze roztavených fluoridov

Túto prvú aplikáciu môžeme považovať za fundamentálnu z hľadiska využitia roztavených anorganických solí ako vysokoteplotných teplotransportných systémov. Štyri ďalšie uvedené aplikácie sú len variácie základného motívu rôzneho využitia anorganických tavenín na odvod a transport vysokopotencionálneho tepla. V tomto prípade ide konkrétne odvod a hlavne transport tepla z akéhokoľvek vysokoteplotného reaktora (nad 400 °C), nie len nukleárneho, k akémukoľvek používateľovi. Pričom tento transport by mal v závislosti od využitia tepla prebiehať v intervale od niekoľko stoviek metrov až po niekoľko kilometrov.

Myšlienka využitia tavenín anorganických solí na ďalekosný potrubný transport tepla bezprostredne vystala z nových aplikačných možností vysokopotencionálneho tepla a komparatívnych výhod anorganických tavenín oproti ostatným systémom. Tieto výhody veľmi dobre ilustruje tab. I (cit.<sup>4</sup>), ktorá sumarizuje požiadavky na štyri

Tabuľka I

Parametre transportu 1000 MW energie pre rôzne transportné médiá,  $\Delta t = 100$  °C

Parametre	Para (LWR)	Sodík (LMR)	Hélium	Fluoridové taveniny
Tlak, MPa	15,5	0,69	7,07	0,69
Teplota na výstupe, °C	320	540	1000	1000
Rýchlosť média, m s <sup>-1</sup>	6	6	75	6
Počet potrubí, priemer 1 m	0,9	2	13,2	0,6

typy teplotransportných systémov, vrátane konvenčnej vodnej pary, pre požiadavku transportu 1000 MW energie pri 100 °C rozdiel teplôt medzi koncami potrubia. Kým v prípade hélia je na takýto transport potrebných 13,2 potrubí o priemere 1 m, pre fluoridové taveniny je to len pol potrubia rovnakého priemeru. Nízky počet potrubí síce vykazuje aj vodná para a roztavený sodík, no tieto dva systémy nie sú použiteľné pre transport vysokopotenciálneho tepla (príliš nízka teplota média). Navyše z hľadiska bezpečnosti sa vo všeobecnosti uprednostňujú nízkotlaké systémy, čo je ďalšia nevýhoda hélia a vo všeobecnosti aj vodnej pary. Z hľadiska ceny sú fluoridové taveniny výrazne drahšie ako voda, ale rovnako výrazne lacnejšie ako sodík a hélium. Z hľadiska bezpečnosti je navyše sodík problematický aj kvôli jeho extrémnej citlivosti na vodu. Možno povedať, že výhody tavenín idú až za rámec ich použitia ako výhradne vysokoteplotného média (nad 500 °C).

### 2.1.1. Výroba vodíka termochemickými procesmi

Už dnes je vodík s celkovou produkciou cca 50 mil t rok<sup>-1</sup> jednou z kľúčových surovín chemického priemyslu a každý rok, hlavne kvôli petrochémií, jeho produkcia kontinuálne stúpa. Ak by došlo k prielomu v rozvoji tzv. vodíkovej ekonomiky (výmena fosílnych palív za vodík, pre všetky transportné systémy, vrátane leteckých) výroba vodíka by sa postupne stala najmasovejšou priemyselnou výrobou vôbec. Základným kľúčom k tomuto prielomu je cena vodíka. Z toho vychádza aj myšlienka využiť vysokopotenciálne teplo z vysokoteplotných nukleárných reaktorov na tepelný rozklad vody, čo by predstavovalo efektívnejší spôsob výroby vodíka, než klasická elektrolyza vody. Nešlo by o priamy tepelný rozklad, ale o cyklus na seba naväzujúcich reakcií, do ktorého vstupuje voda a teplo a výsledným produktom je vodík a kyslík. Najznámejším a pravdepodobne najperspektívnejším je cyklus vyvinutý firmou General Atomic na báz iódu a oxidu siričitého (obr. 1). V súčasnosti už existuje, aspoň na teoretickej báze, množstvo podobných uzavretých cyklov, vrátane tzv. hybridných cyklov, ktoré

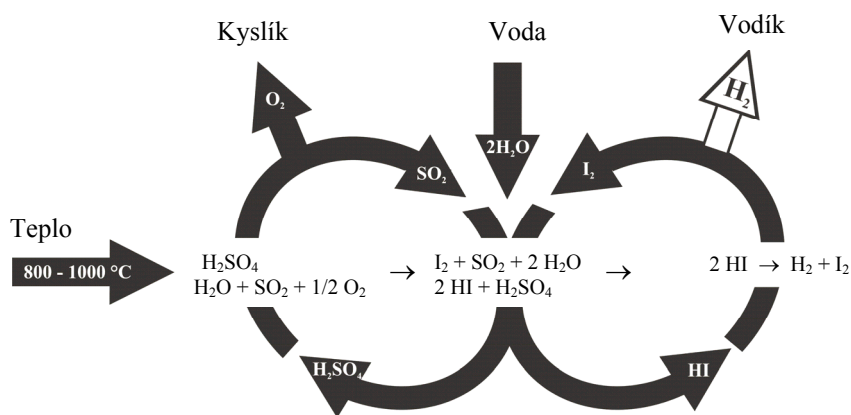
kombinujú tepelný rozklad s elektrolyzou.

Keďže z bezpečnostných dôvodov nemôže byť veľkotónážna chemická výroba vodíka v blízkosti nukleárneho zdroja tepla, teplotransportné rozhranie musí dosahovať dĺžky rádovo stoviek metrov až niekoľko kilometrov. Hélium, ako teoreticky jediný možný konkurent roztavených solí, ktorý možno použiť pri vysokých teplotách, je pre takto koncipovaný transport, hlavne z ekonomických dôvodov, prakticky vylúčený.

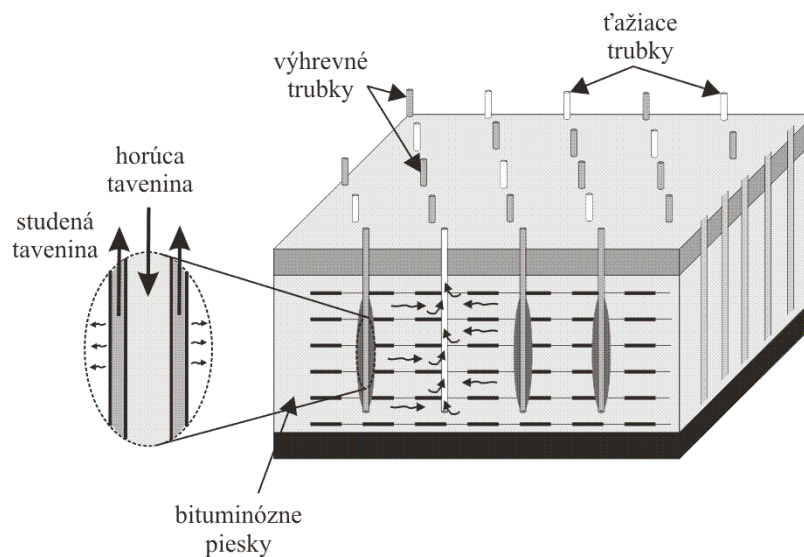
### 2.1.2. Ťažba a spracovanie bituminóznych pieskov a ropno-nosných bridlic

Bituminózne alebo asfaltové piesky (bituminous sands), niekedy sa označujú aj ako dechtové piesky (tar sands), ropné piesky (oil sands), alebo ropno-nosné bridlice (oil shale) sú zmesi piesku, hlíny, ílu a vysokoviskózných organických zlúčenín, ktoré tvoria tzv. bitúmen<sup>11</sup>. Celkové svetové zásoby bitúmenu sa odhadujú na 400 Gt (zásoby konvenčnej ropy sa odhadujú na 600 Gt, z toho je ťažiteľných 150 Gt). Tieto zásoby majú veľký strategický význam, pretože sú použiteľné na výrobu nafty a drvivá väčšina sa nachádza mimo politicky nestabilný Blízky východ (Kanada, Venezuela, USA, Rusko). Len zásoby bituminóznych pieskov v USA majú hodnotu 800 mld barelov konvenčnej ropy, čo je trikrát viac ako ťažiteľné zásoby ropy v Saudskej Arábii.

Keďže pomer vodíka k uhlíku je v týchto pieskoch pomerne nízky, konverzia bituminóznych pieskov na komerčne palivo je založená (1) na pridávaní vodíka hydrogenečnými procesmi, alebo (2) na odstraňovaní uhlíka (zvyčajne spaľovaním vo forme CO<sub>2</sub>). Samotná ťažba bituminóznych pieskov je založená na znižovaní viskozity bitúmenu s rastúcou teplotou. Existujú aj spôsoby ťažby založené na podporovanom zapálení ložiska (*in-situ* combustion), kde sa zapáli jeden vrt a do ložiska sa vháňa vzduch, čím dochádza nie len k znižovaniu viskozity bitúmenu, ale aj k *in-situ* spracovaniu ložiska (zvyšovaniu pomeru vodík – uhlík). Produktom je menej kvalitný podiel a relatívne vysoké emisie CO<sub>2</sub> (cit.<sup>4</sup>) (výrobná cena takejto ropy je 70–90 \$/barrel).



Obr. 1. Termochemická výroba H<sub>2</sub> na báze I<sub>2</sub> – SO<sub>4</sub> cyklu (General Atomic)



Obr. 2. Schéma *in-situ* ťažby a spracovania bituminózneho ložiska pomocou vysokopotencionálneho tepla z nukleárných reaktorov

Na podobnom princípe funguje proces firmy Shell (Shell Oil-Shale Process). Proces je založený na pomalom niekoľko mesačnom zahrievaní (370 °C) celého ložiska pomocou elektrických výchrevných telies v redukčnej atmosfére, pričom produktom je kvalitná ľahká ropa a nízke emisie CO<sub>2</sub>. Náklady na tento spôsob sú približne trikrát menšie ako pri podporovanom zapálení ložiska. Polovicu nákladov tvorí cena elektrickej energie. Ak by sa na vyhrievanie použil nukleárny reaktor, môžeme bitúmenové ložisko vyhrievať priamo z reaktora teplom transportovaným pomocou roztavených fluoridov. Znížime náklady na výrobu elektrickej energie (priame využitie tepla) a znížime tvorbu skleníkových plynov súvisiacich s výrobou elektrickej energie. Ohrev ložiska by bol založený na množstve dlhých výchrevných elementov (rúra v rúre); išlo by v podstate o obrovský rúrkový výmenník tepla (obr. 2). Otázkou ostáva výber konštrukčných materiálov (rúry kilometrovej dĺžky) a akceptovanie výstavby nukleárneho reaktora v blízkosti ložiska<sup>4</sup>.

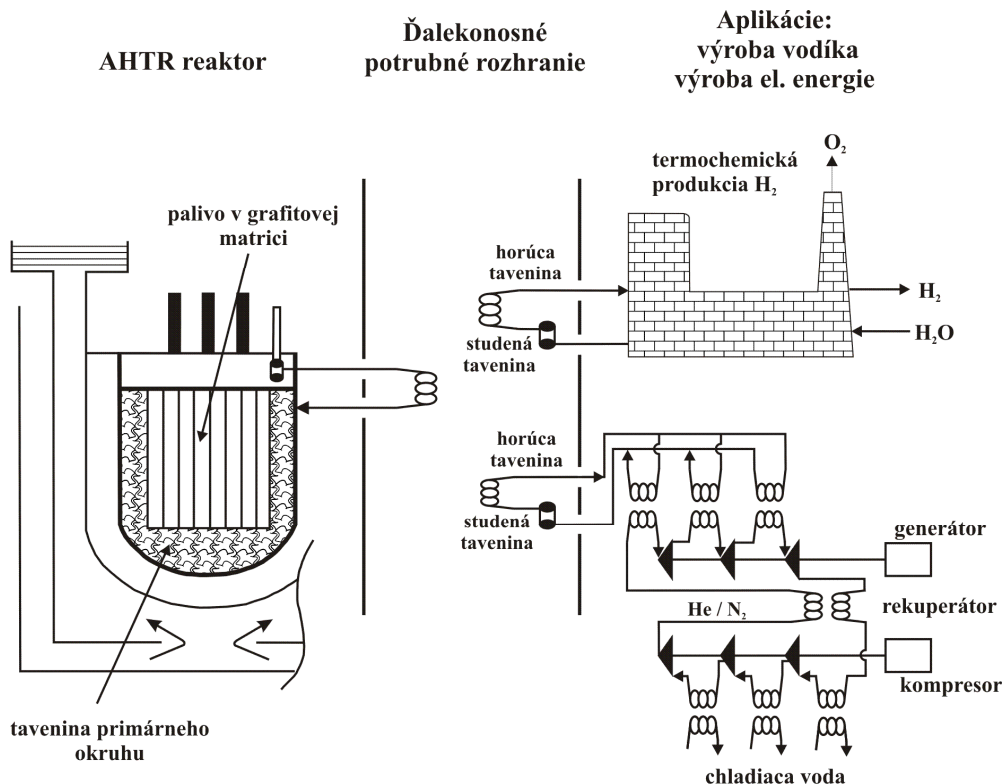
### 2.1.3. Breytnov cyklus účinnejšej výroby elektrickej energie

Výroba elektrickej energie tzv. Breytnovým cyklom umožňuje integrovať vysokoteplotný nukleárny reaktor priamo, bez parného „rozhrania“ k turbíne. Proces účinnejšej výroby elektrickej energie je založený na výmene doterajšej parnej turbíny za vysokoteplotnú turbínu na báze dusíka, alebo hélia. Takáto turbína konvertuje teplo na elektrickú energiu pri teplotách až do 1000 °C a tak je celý proces schopný dosiahnuť výrazne vyššiu účinnosť (nad 50 %). Transport tepla od reaktora k turbíne môžu zabezpečovať roztavené soli, alebo vysokotlaké hélium. Najpravdepodobnejší bude hybridný spôsob; výhodou hélia je, že ho možno priamo integrovať s turbínou (hélium priamo poháňa lopatky vysokoteplotnej turbíny), no na

druhej strane roztavené soli sú vhodnejšie na použitie v primárnom okruhu, keďže vysokotlaký systém nie je najbezpečnejším spôsobom priameho chladenia nukleárneho reaktora.

### 2.2. Pokročilý vysokoteplotný nukleárny reaktor

Tento typ reaktora (Advanced High Temperature Reactor) je nový „obojzivilný“ koncept vysokoteplotného reaktora pre (1) vysokotonážnu termochemickú produkciu vodíka, (2) účinnejšiu produkciu elektrickej energie prostredníctvom Breytnovho cyklu (obr. 3). Tento koncept sa už niekoľko rokov vyvíja v USA. Keď sme v kap. 2.1.1. hovorili o vysokoteplotnom transportnom systéme pre výrobu vodíka a ďalšie aplikácie popisovali sme vlastne rozhranie medzi používateľom a týmto reaktorom, ktorého hlavným cieľom je integrovaná výroba vysokopotencionálneho tepla pre výrobu elektrickej energie alebo vysokotonážnu termochemickú výrobu vodíka. Tento koncept je založený na využití tuhého paliva zakomponovaného v grafitovej matici, ktoré sa používa pre vysokoteplotné hélium chladené reaktory (Modular High Temperature Gas Cooled Reactor) a využití roztavených fluoridov na báze LiF-BeF<sub>2</sub> a NaF-ZrF<sub>2</sub> (teplota topenia cca 400 °C, teplota varu cca 1400 °C) ako chladiva primárneho okruhu. Výhodou použitia roztavených solí oproti héliu v primárnom okruhu je možnosť výrazného zmenšenia celého objemu reaktora a tak zvýšenia jeho kapacity (2400–4000 MW v prípade AHTR oproti max. 600 MW pre hélium chladený reaktor). Niektoré štúdie dokonca naznačujú<sup>3,12</sup>, že by mohol byť tento koncept ekonomicky zaujímavý aj v porovnaní s najrozšírenejšími ľahkovodnými reaktormi (LWR). Ďalšou nespornou výhodou je nízkotlaký systém reaktora a jeho pasívna bezpečnosť. Ľudovo povedané, v prípade poškodenia konštrukčných materiálov



Obr. 3. Schéma „obojživelného“ zapojenia vysokoteplotného reaktora (AHTR) pre termochemickú výrobu H<sub>2</sub>, a zároveň aj účinnú výrobu elektrickej energie (vysokoteplotná turbína na báze He, alebo N<sub>2</sub>)

nehrozí únik chladiaceho média, pretože pri lokálnom znížení teploty tavenina zatuhne a izoluje trhlinu.

### 2.3. Rýchly množivý reaktor

Návrh tohto reaktora (Liquid Salt-Cooled Fast Reactor) je úplne nový koncept vychádzajúci z už existujúceho rýchleho množivého sodíkom chladeného reaktora (Sodium-Cooled Fast Reactor). V týchto typoch reaktorov sa nenachádza moderátor a štiepna reakcia prebieha s pomocou nespomalených rýchlych neutrónov. Rýchle neutróny sú schopné štiepiť urán 238 (<sup>238</sup>U), ktorý tvorí asi 99,3 % prírodného uránu no v „konvenčných“ typoch reaktorov nie je použiteľný. Bežne používaný a štiepateľný urán 235 (<sup>235</sup>U) tvorí len 0,7 % prírodného uránu! Palivo v tomto type reaktora síce tvorí vysokoobohatený urán, alebo vysokoobohatené plutónium, alebo ich zmes, no tzv. obálka, štiepateľný množivý materiál, obsahuje urán a thórium s prírodným izotopickým zložením. Nevýhodou týchto zaujímavých reaktorov je zatiaľ ich cena oproti ľahkovodným reaktorom. Taveninou chladený LSFRe koncept sa môže oproti pôvodnému sodíkom chladenému SFR rýchlemu reaktoru ale pochváliť niekoľkými sľubnými výhodami: (1) redukcia objemu reaktora a tak zvýšenie jeho ekonomickej kapacity, (2) bezpečnosť, odstránenie problému s explozívnou reakciou medzi sodíkom a vodou,

(3) energetická účinnosť roztavenými soľami chladeným rýchlym reaktorom sa pohybuje medzi 45 až 50 % oproti 40 až 42 % pre sodíkom chladeným rýchlym reaktorom, (4) keďže roztavené soli sú oproti roztavenému sodíku priehľadné, takýto koncept umožňuje aj priamu optickú inšpekciu konštrukčných materiálov reaktora.

### 2.4. Reaktor s palivom rozpusteným v tavenine na báze anorganických solí

Tento typ reaktora (Molten Salt Reactor) sa od vyššie uvedených líši tým, že jadrové palivo je rozpustené priamo vo fluoridovej tavenine primárneho okruhu a spolu s rozpustenými štiepnymi produktmi obteká grafitový moderátor. Tento koncept reaktora bol prvýkrát vyvinutý pre už spomínaný nukleárny letecký pohon v 50. rokoch a v civilnej verzii bol tento reaktor poloprevádzkovo úspešne niekoľko mesiacov testovaný v 60. rokoch v ORNL v USA. Tento typ reaktora má niekoľko výhod. Umožňuje širšie možnosti spracovania jadrového paliva (Th-<sup>233</sup>U cyklus, denaturovaný Th-<sup>233</sup>U), vrátane využitia režimu rýchleho množivého reaktora pre Th-<sup>233</sup>U cyklus. Umožňuje lepšie „on-line“ riadenie celého reaktora (palivo je tekuté, homogénne, odpadávajú tzv. kampane súvisiace s výmenou paliva pri reaktoroch z tuhým palivom). Na druhú stranu tento typ reaktora je veľmi citlivý na otázky



korózie a materiálovej kompatibilita (neustála kontinuálna prevádzka, zvýšená korózna aktivita tavenín s rozpusteným jadrovým palivom a rozpustenými štiepnymi produktmi voči konštrukčným materiálom). Tento koncept reaktora sľubuje zo všetkých uvedených typov pravdepodobne potenciálne najväčší komplexný benefit (hlavne v jeho rýchlej množivej verzii), no napriek úspešným testom aj najväčšie technologické výzvy.

### 2.5. Termonukleárna fúzia vodíka

Najfuturistickejšou a najzaujímavejšou aplikáciou roztavených solí v energetike je ich využitie pri koncipovanom reaktore pre termonukleárnu fúziu vodíka – nevyčerpatelnom zdroji energie. Rztavené fluoridy (hlavne na báze  ${}^6\text{LiF-BeF}_2$ ) predstavujú v súčasnosti seriózných kandidátov pre odvod tepla z fúzneho reaktora a zároveň nespotebovovaný materiál, ktorý pomáha tieniť tuhé konštrukčné časti reaktora pred deštruktívnym účinkom fúzných neutrónov. Vo fúznom reaktore prebieha fúzia izotopov vodíka deutéria ( ${}^2\text{H}$ ) a trícia ( ${}^3\text{H}$ ), pričom produktom tejto termonukleárnej reakcie je obrovské množstvo energie, neutróny a hélium. Na to, aby reakcia prebiehala kontinuálne, fúzny reaktor musí produkovať trícium s pomocou neutrónov a lítia  ${}^6\text{Li} + n \rightarrow {}^4\text{He} + {}^3\text{H}$ . Zdroj lítia pre túto reakciu môže byť v tuhom plášti reaktora, ktorý sa tým deštruuje, alebo môžeme lítium získavať z chladiaceho média na báze roztavených solí ( ${}^6\text{LiF}$ ) (cit.<sup>5</sup>).

O použití roztavených solí sa uvažuje aj v koncepcii tzv. inerciálneho fúzneho reaktora, kde sa vysoká teplota potrebná na naštartovanie termonukleárnej fúzie získava bombardovaním pomocou ťažkých iónov, alebo laserov. Výsledkom je okrem zvýšenej teploty aj pomalá deštrukcia prvej steny reaktora. Rztavené soli sa dajú použiť ako tieniaca ochrana vo vnútri tohto typu reaktora pred deštruktívnymi šokmi z týchto pulzov. Rovnako ako aj v prvom prípade, absorbujú fúzne neutróny a produkujú pomocou  ${}^6\text{Li}$  potrebné trícium ( ${}^3\text{H}$ ) (cit.<sup>6,7</sup>).

### 3. Záver

Komercializácia nových vysokoteplotných chladiacich a teplotransportných systémov na báze roztavených solí je zatiaľ výzva budúcnosti. No niektoré fundamentálne zmeny a technologické posuny (prielom vo vodíkovej ekonomike a masová výroba vodíka, využitie vysokopotencionálneho tepla nie len pre vodíkovú ekonomiku, ale aj petrochémiu, vysokoteplotná turbína, Breytonov cyklus a účinnejšia výroba elektrickej energie, rozvoj vysokoteplotných reaktorov generácie IV, pyrometalurgická extrakcia, transmutácia nukleárneho paliva, termonukleárna fúzia vodíka) môžu motivovať a už aj motivujú k rozvoju týchto staro-nových vysokoteplotných nízkotlakých chladiacich médií pre rôzne aplikácie v energetike. Ak si uvedomíme, že nízkoteplotné taveniny anorganických solí sa už v súčasnosti využívajú aj pri slnečných kolektoroch, palivových článkoch a batériách, ich ďalšie

možnosti a aplikácie môžu z tavenín vytvoriť veľmi rozšírené a komplexné energetické médiá. Na druhej strane komercializácia vysokoteplotných taveninových chladiacich systémov ako takých, otvára mnoho mimoriadne zaujímavých možností pre samotnú nukleárnu energetiku. Vývoj týchto systémov bude pravdepodobne veľkým impulzom aj pre taveninovú chémiu a materiálový výskum.

Využitie tavenín ako chladiča má vo všeobecne ešte jeden aspekt. Predstavuje tzv. suché chladenie (bezvodé chladenie), ktoré negatívne neprispieva ku globálnej bilancii úžitkovej vody. Keďže vo svete neustále stúpa výroba elektrickej energie, ale aj ťažká industrializácia, hlavne v krajinách tretieho sveta a s tým spojená zvýšená spotreba vody, začína sa čoraz častejšie diskutovať o lokálnej ale aj globálnej spotrebe vody. Voda sa pravdepodobne onedlho stane strategickou surovinou a geopolitickým faktorom.

### LITERATÚRA

1. Forsberg C. W., Peterson P. F., Zhao H. H.: Nucl. Eng. Int. 2003, 32.
2. Williams D. F., Toth L. M., Clarno K. T.: *Assessment of Candidate Molten Salt Coolants for the Advanced High-Temperature Reactor (AHTR)*, Oak-Ridge National Laboratory, ORNL/TM-2006/12, on-line: [http://www.ornl.gov/~webworks/cppr/y2006/rpt/124584.pdf], stiahnuté 14.02.07.
3. Ingerson D. T., Ott L. J., Renier J. P., Ball S. J., Corwin W. R., Forsberg C. W., Williams D. F., Wilson D. F., Reid L., Del Cul G. D.: *Status of Preconceptual Design of the Advanced High-Temperature Reactor*, ORNL/TM-2004/104 Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN (2004).
4. Forsberg C. W.: *Proceedings of the 2006 International Congress on Advances in Nuclear Power Plants (ICAPP '06)*, Reno, Nevada, June 4–8, 2006, Paper 6292, on-line: [http://www.ornl.gov/~webworks/cppr/y2001/pres/124648.pdf], stiahnuté 14.02.07.
5. Wong C. P. C., Malang S., Sawan M., Smolentsev S., Majumdar S., Merrill B., Sze D. K., Morley N., Sharaf S., Dagher M., Peterson P., Zhao H., Zinkle S. J., Abdou M., Youssef M.: Fusion Sci. Technol. 47, 502 (2005).
6. Moir R. W., Bieri R. L., Chen X. M., Dolan T. J., Hoffman M. A., House P. A., Leber R. L., Lee J. D., Lee Y. T., Liu J. C.: Fusion Technol. 25, 5 (1994).
7. Peterson P. F.: Fusion Technol. 39, 702 (2001).
8. MacPherson H. G.: Nucl. Sci. Eng. 90, 374 (1985).
9. Grimes W. R.: Nucl. Appl. Technol. 8, 137 (1970).
10. Grimes W. R.: *Chemical Research and Development for the Molten-Salt Breeder Reactor*, ORNL/TM-1853, ORNL, Oak-Ridge TN (1967).
11. Blažel J.: Chem. Listy 101, 640 (2007).
12. Peterson P. F., Zhao J.: *Transaction of 2004 American Nuclear Society Winter Meeting, Washington USA, Nov. 14-18, 2004*, American Nuclear Society, La Grange Park, IL, 2004.



**M. Korenko and M. Kucharík** (*Institute of Inorganic Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic*): **Utilization of Molten Inorganic Salts as Coolants in Nuclear Energetics – The Salt of the Earth and Light of the World**

Recently, a rapid growth of interest in the high-temperature coolants (700–1000 °C) based on the molten fluorides has been observed. The interest is a consequence of new applications of high-temperature heat and the de-

velopment of more efficient nuclear reactors. Recent advances in the high-temperature helium or nitrogen turbines make it possible to convert high-temperature heat to electricity on industrial scale. Likewise, there is a growing interest in using the nuclear high-temperature heat in the production of hydrogen and shale oil. Several applications of molten salts in nuclear reactors of various types are currently investigated. The use of new molten salt coolants and the related reactor concepts are described.

## MIKROBIÁLNÍ DEGRADACE ENDOKRINNĚ DISRUPTIVNÍCH LÁTEK

ZDENA KŘESINOVÁ, KATEŘINA SVOBODOVÁ  
a TOMÁŠ CAJTHAML

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, 142  
20 Praha 4  
cajthaml@biomed.cas.cz

Došlo 16.1.08, přijato 10.4.08.

Klíčová slova: biodegradace, endokrinní disruptory, 17 $\alpha$ -  
ethynylestradiol, nonylfenol, bisfenol A

### Obsah

1. Úvod
2. Zástupci endokrinně aktivních látek a jejich vlastnosti
3. Mechanismus působení endokrinně disruptivních látek a testování jejich aktivity
4. Odbourávání endokrinních disruptorů
  - 4.1. Fyzikální a chemické odstraňování endokrinních disruptorů
  - 4.2. Degradace v čistírnách odpadních vod
  - 4.3. Bakteriální zpracování endokrinních disruptorů
  - 4.4. Plankton a degradace endokrinních disruptorů
  - 4.5. Degradace pomocí hub
  - 4.6. Zpracování fenolických endokrinních disruptorů enzymy degradujícími lignin
5. Závěr

### 1. Úvod

V posledních 40 letech se objevují četné důkazy o výskytu látek v životním prostředí, schopných negativně ovlivňovat hormonální systém živočichů i lidí. Po celém světě jsou nalézána ve vodě stopová množství lidských hormonů, léčiv a látek napodobujících aktivitu hormonů, což je v přímé souvislosti s nedostatečným zpracováním odpadních vod<sup>1–4</sup>. Řada studií přítomnosti farmak a lidských hormonů v životním prostředí byla prováděna během 70.–80. let<sup>5–7</sup>, avšak tehdy detegovaná stopová množství vzbuzovala malou pozornost, až do doby zjištění spojitosti mezi syntetickou antikoncepcí 17 $\alpha$ -ethynylestradiolem a vlivem na ryby<sup>8–11</sup>.

Americká organizace pro ochranu životního prostředí (US Environmental Protection Agency – Úřad pro ochranu životního prostředí) zřídila tzv. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) k vytvoření screeningových metod a strategie testů toxicity pro vymezení endokrinně

disruptivních látek (ED). Tento proces v současnosti není ještě zcela dokončen a dosud neexistuje konsenzus pro specifikaci této skupiny látek. Endokrinní disruptory jsou velkou skupinou látek původu antropogenního (některá farmaka, pesticidy, průmyslové chemikálie, produkty spalování) i přírodního (fytoestrogeny, hormony). Předmětem současných studií není pouze vliv ED na živočichy a znečištění životního prostředí, ale také jejich degradace a detoxikace chemickými, mikrobiologickými a enzymatickými metodami<sup>12–14</sup>.

Tato práce je zaměřena na možné odstranění fenolických endokrinně disruptivních chemikálií z kontaminovaného prostředí s důrazem na basidiomycetní druhy hub produkující enzymy degradující lignin.

### 2. Zástupci endokrinně aktivních látek a jejich vlastnosti

Důležitou vlastností ED je, že mohou ovlivňovat hormonální systém organismu dlouho po uvolnění do životního prostředí. Endokrinně disruptivní účinky byly potvrzeny např. u alkylfenolů, bisfenolu A a esterů kyseliny ftalové<sup>15–17</sup>.

Během posledních let je věnována značná pozornost přírodním (estron a 17 $\beta$ -estradiol) a syntetickým antikoncepčním steroidům (17 $\alpha$ -ethynylestradiol), především díky jejich výskytu v povrchových vodách po průchodu běžným procesem v čistírnách odpadních vod, a to pro jejich potencionální negativní efekt na vývoj a reprodukci ryb, zvířat a lidí<sup>18–21</sup>. Syntetické estrogény, užívané jako orální antikoncepce, jsou v těle metabolizovány na jejich konjugáty s kyselinou glukuronovou a vyloučeny močí. Tyto konjugáty jsou následně, při zpracování splaškové vody aktivovaným kalem, hydrolyzovány glukuronidasou, produkovanou mikroorganismy (např. *Escherichia coli*), zpět na formy syntetických estrogenů a kyselinu glukuronovou<sup>20,22</sup>. Ternes a spol.<sup>23</sup> prokázali, že estron a 17 $\alpha$ -ethynylestradiol jsou často detegovány ve výpustích brazilských, německých a kanadských čističek městských odpadních vod.

Další endokrinně aktivní látky – alkylfenoly, jako je např. nonylfenol a oktylfenol, se používají k průmyslové výrobě alkylfenol-polyethoxylátů sloužících jako neiontové detergenty a jako antioxidanty. Ačkoliv samotné detergenty nejsou estrogenní, zpracování jimi kontaminované vody v čistírnách odpadních vod rozkladem aktivovaným kalem vede ke vzniku perzistentních hydrofobních metabolitů s estrogenní aktivitou<sup>24,25</sup> kumulujících se v čistírenském kalu<sup>26,27</sup>. Nejproblematičtější z alkylfenolů nonylfenol napodobuje přirozený hormon 17 $\beta$ -estradiol a je spojen s feminizací vodních organismů, poklesem rybí plodnosti a snížením množství přežívajících juvenilních jedinců.

ců<sup>28–30</sup>. Nonylfenol je za aerobních podmínek v čistíčkách odpadních vod (ČOV) jen obtížně degradovatelný<sup>31,32</sup>.

Silně hydrofilní bisfenol A [2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan] je další z řady endokrinních disruptorů<sup>33–35</sup>. Tvoří hlavní surovinu užívanou při chemických syntézách průmyslových polymerů, jako jsou polykarbonáty, epoxydové pryskyřice, fenolové pryskyřice, polyestery a polyakryláty. Bisfenol A se může uvolňovat z konzerv s vnitřním nátěrem epoxydových pryskyřic<sup>36</sup> a z polykarbonátových plastových obalů<sup>37</sup> a kontaminovat tak potraviny. Může se také uvolnit z materiálů používaných ve stomatologii (pryskyřice, plomby)<sup>38</sup>. Vzhledem k těmto expozičním cestám představuje bisfenol A v současné době nejvýznamnější endokrinně disruptivní kontaminaci pro člověka.

Dalšími identifikovanými ED jsou chemikálie užívané ve velkých objemech v průmyslu jako plasticizéry (benzylbutylftalát, dibutylftalát), aditivum kaučuku *p*-fenylnol, desinfekce *o*-fenylnol, antioxidant butylhydroxyanisol atd.

### 3. Mechanismus působení endokrinně disruptivních látek a testování jejich aktivity

Obecně je problematika endokrinního a reprodukčního efektu ED látek vztahována k několika úrovním jejich působení na hormonální systém organismu: napodobování účinků endogenních hormonů, působení proti účinkům endogenních hormonů, narušování transportu, syntézy a metabolismu endogenních hormonů, a narušování syntézy a metabolismu hormonálních receptorů<sup>16</sup>.

Estrogenní receptory regulující transkripci cílových genů po vazbě s estrogenem (17 $\beta$ -estradiol a estron) jsou tvořeny doménou vážící se na DNA, doménou vážící ligand (hormon) a několika trans-aktivačními doménami<sup>39</sup>. Lidské, stejně jako např. myší estrogenní receptory, existují ve dvou subtypech  $\alpha$  a  $\beta$ <sup>40,41</sup>. Srovnání specifických vazeb ligandů a analýza trojrozměrné struktury ukázaly, že oba estrogenní receptory  $\alpha$  i  $\beta$  mají shodnou selektivitu k ligandům<sup>42</sup>. Estrogenní receptor váže 17 $\beta$ -estradiol fenolickou částí, vazebné místo receptoru je však dvakrát větší než hydrofobní část 17 $\beta$ -estradiolu<sup>43</sup> a tato velká hydrofobní prohlubeň umožňuje alkylnolům a bisfenolu A vazbu na receptor a vyvolání nesprávných hormonálních signálů.

Pro získání nástroje stanovení estrogenní aktivity látek vložili Routledge a Sumter<sup>44</sup> sekvence DNA kódující lidský estrogenní receptor ( $\alpha$ ) do genomu kvasinek, které obsahovaly také přepisovatelný plasmid se sekvencí kontrolovanou estrogenním receptorem a odpovědnou za přepis reportérového genu *Lac-Z* (kóduje enzym  $\beta$ -galaktosidasu) umístěného také na daném plasmidu. Kvasinky tedy byly schopny syntetizovat  $\beta$ -galaktosidasu jako odpověď na přítomnost estrogenů. Pomocí tohoto testu bylo zjištěno, že alkylnoly, obsahující 6–9 uhlíků v alkylových skupinách, mají 10<sup>-3</sup> až 10<sup>-5</sup> méně estrogenní aktivity ve srovnání s 17 $\beta$ -estradiolem<sup>35,45</sup>. Nishikawa

a spol.<sup>46</sup> vyvinul tzv. dvojhybridní kvasinkový test, využívající na ligandu závislé interakce s estrogenním receptorem, umožňující měřit estrogenní aktivitu nonylfenolu a bisfenolu A. Při monitoringu ED vypouštěných do vodního prostředí je používán jako bioindikátor vitellogenin<sup>47</sup>, bílkovinný prekurzor vaječného žloutku, jehož produkce je v játrech vejcorodých obratlovců regulována estrogeny.

## 4. Odbourávání endokrinních disruptorů

### 4.1. Fyzikální a chemické odstraňování endokrinních disruptorů

Nonylfenol a bisfenol A lze rozkládat elektrochemicky využitím platinou pokryté titanové elektrody. Látky o počáteční koncentraci 1,0 mM byly rozloženy za 100 až 200 min (cit.<sup>48</sup>). Bisfenol A byl fotokatalyticky za pomoci TiO<sub>2</sub> pod UV zářením při počáteční koncentraci 175  $\mu$ M ve vodě zcela degradován na oxid uhličitý během 20 h (cit.<sup>49</sup>). Chen a spol.<sup>50</sup> publikovali degradaci bisfenolu A působením UV v kombinaci s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, při níž došlo k odstranění estrogenní aktivity bez vzniku meziproductů s akutní toxicitou. Možnost degradace bisfenolu A, 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu a estradiolu pomocí UV v kombinaci s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> publikovali i Rosenfeldt a Linden<sup>51</sup>.

Pozornost je také věnována možnosti využití aktivního uhlí při odstranění ED. Chang a spol.<sup>52</sup> popsal odstranění estronu pomocí adsorpce na práškové aktivní uhlí. Odstraňovací kapacita aktivního uhlí je však limitována kontaktním časem, konkurencí s přírodním organickým materiálem, rozpustností kontaminantu a také použitým typem aktivního uhlí<sup>53,54</sup>. Četné studie z poslední doby zkoušejí odstranění mikropolutantů, jako jsou ED, za pomoci různých typů membrán a filtračních systémů<sup>55–57</sup>.

### 4.2. Degradace v čistírnách odpadních vod

Procesy používané běžně ve vodárenské úpravě, jako je koagulace, flokulace a precipitace se ukázaly neúčinnými pro odstranění rozpuštěných organických kontaminantů včetně ED látek<sup>53,58</sup>. Účinnost používaných oxidativních procesů, jako chlorace a ozonizace, závisí na struktuře kontaminantu a dávce oxidantu<sup>59,60</sup>. Naopak biologické procesy používané v ČOV, jako je aktivace, biofiltrace a půdní filtrace (soilaquifer), prokázaly schopnost značné redukce koncentrace ED. Studie uvádí odstranění více než 90 % bisfenolu A v ČOV, při srovnání jeho koncentrace v přítoku a odtoku<sup>61,62</sup>. Rovněž je popsána schopnost aktivovaného kalu odstranit nonylfenol<sup>63,64</sup>. Pokles jeho koncentrace při průchodu ČOV je vztahován, vzhledem k jeho hydrofobicitě, především k mechanismu sorpce na aktivovaný kal<sup>65</sup>. Dochází tedy pouze k přemístění do další environmentální matrice. K další eliminaci nonylfenolu z vodního prostředí může docházet sorpcí na částice, sedimenty a akumulací v tkáních vodních organismů<sup>66–68</sup>.

Rada autorů popsala mechanismus degradace neiontových detergentů alkylnol-polyethoxylátů při zpracování

odpadní vody<sup>24,25,63,69</sup>. Iničiální zkrácení ethoxylátového řetězce těchto molekul vede k tvorbě intermediátů jako je mono- a di-ethoxylát, alkylfenol a mono- a di-karboxylované alkylfenoly. Vzhledem k limitované rozpustnosti ve vodě a tím snížené biodostupnosti nastává konečná biodegradace těchto metabolitů mnohem pomaleji.

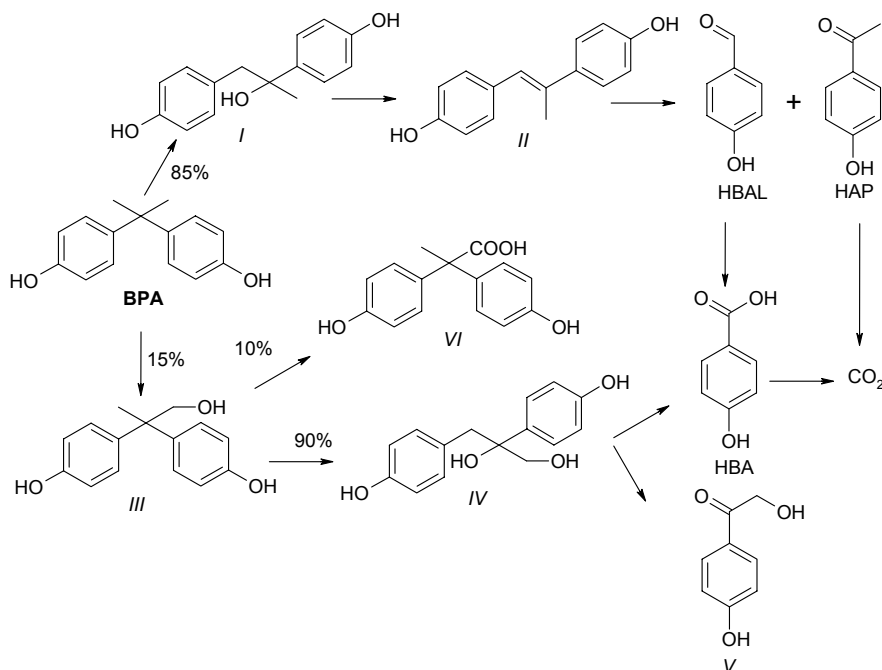
Značný zájem vyvolávají ve vodních tocích zjištěné estrogenní hormony (např. cit.<sup>4</sup>) 17 $\beta$ -estradiol a 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, které byly detegovány všudypřítomně ve výpustích z ČOV a je jim přisuzována odpovědnost za většinu estrogenních efektů<sup>9,70</sup>. Přestože některé publikace tvrdí, že odstranění 17 $\beta$ -estradiolu aktivovaným kalem je především díky sorpci, nebo dalším faktorům nesouvisejícím s mikrobiální degradací<sup>71</sup>, byla publikována oxidace 17 $\beta$ -estradiolu zředěným aktivovaným kalem z ČOV na estron s další eliminací za aerobních podmínek<sup>72</sup>. Fujii a spol.<sup>73</sup> popsali degradaci 17 $\beta$ -estradiolu gramnegativní aerobní bakterií *Novosphingobium* sp. izolovanou z ČOV. O biodegradaci umělého hormonu 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu je zatím známo velmi málo<sup>72,73</sup>.

#### 4.3. Bakteriální zpracování endokrinních disruptorů

Několik bakteriálních druhů, *Sphingomonas xenophaga*, *Sphingomonas cloacae* a *Sphingobium amniense* bylo izolováno a popsáno, jako mikroorganismy odpovědné za degradaci nonylfenolu<sup>74–76</sup>. Tyto bakterie metabolizovaly aromatickou část nonylfenolu na odpovídající C9 alkoholy.

Řada bakterií schopných biodegradace bisfenolu A byla nalezena v půdě, říční vodě nebo aktivovaném kalu ČOV<sup>77–82</sup>. Patří sem *Sphingomonas* sp. AO1, *Pseudomonas paucimobilis* FJ-4, druhy rodu *Pseudomonas* sp. a *Streptomyces* sp. a několik neidentifikovaných gramnegativních bakterií zahrnujících izoláty z aktivovaného kalu a říčních sedimentů. Obecně je popsána metabolická cesta degradace bisfenolu A některými druhy bakterií za aerobních podmínek na 4-hydroxybenzoovou kyselinu a 4-hydroxyacetofenon<sup>78,80,81</sup>. Gramnegativní aerobní bakterie, kmen MV1 (NRRL-B-18737), byly schopny oxidace alifatické methylové skupiny bisfenolu A (BPA) za vzniku a 1,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-2-olu (*I*; viz obr. 1) a 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-1-olu (*III*). Oba meziproducty jsou dále degradovány pomocí oxidace, dehydratce a štěpení až na výsledné produkty 4-hydroxybenzoovou kyselinu (HBA), 2-hydroxy-1-(4'-hydroxyfenyl)ethanon (*V*) a 2,2-bis(hydroxyfenyl)propanovou kyselinu (*VI*)<sup>79,80</sup>.

Bakterie izolované z aktivovaného kalu a říčního ekosystému (*Arthrobacter*, *Pseudomonas*, a zástupci *Enterobacteriaceae*) byly schopny metabolizovat bisfenol A cestou podobnou jako výše zmíněný izolát MV1<sup>78</sup>. Zhang a spol.<sup>83</sup> studovali degradaci bisfenolu A bakterií *Achromobacter xylosoxidans* izolovanou z městského odpadu zpracovávaného kompostováním. Degradční produkty byly identifikovány jako *p*-hydroxybenzaldehyd, *p*-hydroxybenzoová kyselina a *p*-hydrochinon. V případě *Sphingomonas* sp. AO1 Sasaki a spol.<sup>77</sup> potvrdil účast cytochro-



Obr. 1. Metabolická dráha degradace bisfenolu A gramnegativní aerobní bakterie: kmen MV1 (NRRL-B-18737); BPA bisfenol A; *I* 1,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-2-ol; *II* 4,4'-dihydroxy- $\alpha$ -metylstilben; *III* 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-1-ol; *IV* 2,3-bis(4-hydroxyfenyl)propan-1,2-diol; *V* 2-hydroxy-1-(4'-hydroxyfenyl)ethanon; *VI* 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propanová kyselina; HBAL 4-hydroxybenzaldehyd; HAP 4-hydroxyacetofenon; HBA 4-hydroxybenzoová kyselina

mu P450 při tomto degradačním procesu. Ike a spol.<sup>84</sup> se ve své práci zabýval změnou estrogenní aktivity degradačních produktů bisfenolu A, z nichž pouze 4-hydroxyacetofenon vykazoval slabou estrogenní aktivitu ve srovnání s bisfenolem A.

V anaerobních podmínkách probíhá degradace bisfenolu A velmi obtížně<sup>85</sup>. Ronen a Abeliovich<sup>82</sup> prokázali, že bisfenol A v anaerobních podmínkách kalu nebyl degradován ani po třech měsících inkubace.

#### 4.4. Plankton a degradace endokrinních disruptorů

Schopnost odstraňovat různé polutanty je známa i u některých řas. Hirooka a spol.<sup>86</sup> popsali degradaci bisfenolu A a odstranění jeho estrogenní aktivity zelenou řasou *Clorella fusca* var. *vacuolata*. Jako meziprodukt biodegradace byl identifikován monohydroxybisfenol A (cit.<sup>87</sup>). Ishihara a Nakajima<sup>88</sup> publikovali částečné odstranění bisfenolu A pomocí fytoplanktonních mořských jednobuněčných řas. Sethunathan a spol.<sup>89</sup> popsal vliv vysoké inokulační hustoty a biosorbce na degradaci alfa-endosulfanu (cyclodien insekticid) a jeho oxidačního produktu endosulfan sulfátu u řas *Chlorococcum* sp. a *Scenedesmus* sp.

#### 4.5. Degradace pomocí hub

Řada druhů hub je schopna degradace ED, avšak jen některé mají dostatečně vysoký degradační potenciál<sup>90</sup>. Mezi zvláště degradačně aktivní patří zástupci tvz. hub bílé hniloby, produkující nespecifické extracelulární ligninolytické enzymy: mangan peroxidasy (MnP), lignin peroxidasy (LiP) a lakasy (Lac). Díky těmto enzymům degradují lignin stejně dobře jako mnoho perzistentních environmentálních polutantů včetně ED látek jako např. nonylfenol<sup>91–93</sup>. Mnoho studií zabývajících se biodegradací ED pomocí těchto hub je zaměřeno především na aplikaci purifikovaných enzymů<sup>94–97</sup>.

Soares a spol.<sup>91</sup> studoval degradaci nonylfenolu čtyřmi zástupci ligninolytických hub (*Bjerkandera* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, a *Trametes versicolor*). Z počáteční koncentrace nonylfenolu 100 ppm, za přítomnosti glukosy jako kosubstrátu a statické kultivace, kultury *Bjerkandera* sp. a *T. versicolor* odstranily přibližně 96 % nonylfenolu během 15 dnů, kdežto úbytek nonylfenolu u kultur *P. ostreatus* a *P. chrysosporium* se pohyboval od 37 do 70 % a od 30 do 50 %. Ve studii zaměřené na vliv kultivačních podmínek během degradace bylo zjištěno, že *Bjerkandera* sp. BOL 13 odstraní v podmínkách třepané kultivace nonylfenol o koncentraci 50 ppm z 95 % během 5 dnů, zatímco při statické kultivaci její degradační rychlost dvaapůlkrát poklesne<sup>98</sup>. Naopak *T. versicolor* za třepané kultivace není schopen nonylfenol degradovat<sup>98</sup>.

Lee a spol.<sup>99</sup> publikovali 99% degradaci styrenu během 24 h ligninolytickým houbami *P. chrysosporium*, *T. versicolor* a *Daldinia concentrica*. Hlavními metabolity po degradaci *P. chrysosporium* byly 2-fenylethanol, kyse-

lina benzoová, cyclohexadien-1,4-dion, butanol a kyselina jantarová. Tyto metabolity již nevykazovaly estrogenní efekt. Houba *Stereum hirsutum* byla použita při degradaci látky methoxychlor [2,2,2-trichloro-1,1-bis(4-methoxyfenyl)ethan]<sup>100</sup>. Při otestování bylo zjištěno výrazné snížení estrogenní aktivity degradačních produktů identifikovaných jako mono- a dichloro deriváty 4-methoxyfenylethanu a 4-methoxyfenylethylenu. Majoritním produktem biodegradace bisfenolu A za pomoci basidiomycetů *S. hirsutum* a *Heterobasidium insulare*<sup>100</sup> byla 2-hydroxy-3-fenylpropanová kyselina. Obě houby degradovaly bisfenol A o počáteční koncentraci 100 ppm z 99 % v průběhu 7–14 dnů.

Další houby s kapacitou degradovat ED patří mezi zygomycety. Chai a spol.<sup>101</sup> izoloval 4 druhy, *Fusarium moniliforme* 2-2, *Fusarium sporotrichioides* NFRI-1012, *Aspergillus terreus* MT-13 a *Emericella nidulans* MT-98, schopné vysoce efektivní degradace bisfenolu A. Dalšími studovanými houbovými mikroorganismy jsou mikrozoofy z povrchových vod, jako např. *Clavariopsis aquatica* patřící mezi askomycety rodu *Massarina* a neidentifikovaný mitosporický houbový izolát označený jako UHH 1-6-18-4 (cit.<sup>102</sup>). Tyto organismy byly schopny degradovat technickou směs nonylfenolů stejně dobře jako 4-nonylfenol (4nNP).

Degradace nonylfenolu byla publikována i u kvasinkového izolátu druhu *Candida aquatextoris* původně izolovaného z kalu odpadní vody továrny textilního průmyslu. U tohoto mikroorganismu byl publikován dosud ojediněle růst na 4nNP o počáteční koncentraci 100 ppm za podmínek absence dalšího zdroje uhlíku<sup>103</sup>. 4nNP byl kompletně degradován během 14 dnů, což bylo doprovázeno vznikem 4-acetylfenolu a růstem mikroorganismu<sup>104</sup>.

#### 4.6. Zpracování fenolických endokrinních disruptorů enzymy degradujícími lignin

Mezi nejlépe známé a nejčastěji produkované oxidační enzymy ligninolytických hub spojené s degradací polutantů patří dva typy peroxidas: lignin peroxidasa (diarylpropan:hydrogen-peroxid oxidoreduktasa, EC 1.11.1.14) a mangan dependentní peroxidasa (MnP, Mn (II):hydrogen-peroxid oxidoreduktasa, EC 1.11.1.13). Tyto glykosylované hemové enzymy katalyzují jednoelektronovou oxidaci nefenolických aromatických látek za využití peroxidu vodíku jako oxidantu<sup>105</sup>. Dalším typem oxidativních enzymů hub je lakasa (benzenediol:oxygen oxidoreduktasa, EC 1.10.3.2), která náleží do rodiny polyfenol oxidas<sup>106</sup>. Výhodou lakasy oproti peroxidasám v její aplikaci při biodegradacích je schopnost oxidovat bez potřeby peroxidu vodíku či vysoké koncentrace iontů manganu<sup>106</sup>. Produkce těchto enzymů i jejich katalytické vlastnosti byly již předmětem mnoha přehledných článků<sup>107–110</sup> a jejich použití k detoxikaci endokrinně disruptivních chemikálií je zájmem mnoha studií posledních let<sup>92,111–113</sup>.

Hirano a spol.<sup>111</sup> prokázali, že bisfenol A je degradován kulturou houby *P. ostreatus* a její mangan peroxidasaou na fenol, 4-isopropenylfenol, 4-isopropylfenol a hexestrol.

Degradace bisfenolu A mangan peroxidásoú je iniciována odnětím jednoho elektronu ze substrátu a výsledný radikál projde dále náhodným štěpením na aromatickém kruhu a C-C vazbách do formy směsi fenolických výše popsaných látek. Mangan peroxidásoú kultury *P. chrysosporium* je schopná degradovat nonylfenol a bisfenol A (cit.<sup>97</sup>). Estrogenní aktivita příslušných vzorků, vyhodnocená dvou-hybridním kvasinkovým testem, byla použitou mangan peroxidásoú odstraněna, ačkoli této aktivity stále zbylo 40 % v čase, kdy bisfenol A zcela zmizel. Studována byla také oxidace nonylfenolu a bisfenolu A lakasou kultury *T. versicolor* s použitím redox mediátoru, 1-hydroxybenzotriazolu (HBT). 80 % estrogenní aktivity 17 $\beta$ -estradiolu a 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu bylo odstraněno během hodinového zpracování pomocí jak houbové MnP, tak lakasy<sup>113</sup>.

Degradace bisfenolu A lakasou kultury *T. villosa* probíhá oxidativní reakcí na dva produkty<sup>92</sup>, u nichž hlavním je vysokomolekulární dimer bisfenolu A (5,5'-bis-[1-(4-hydroxyfenyl)-1-methyl-ethyl]-bifenyl-2,2'-diol). Během oxidace bisfenolu A pomocí lakasy mohou být také formovány oligomery obsahující až 3–6 jednotek bisfenolu a 0–3 jednotky fenolu. Polymerizace bisfenolu A pokračuje buď připojením fenylových zbytků nebo transformací oligomeru za uvolnění 4-isopropenylfenolu<sup>92,114</sup>.

Pro zvýšení účinnosti bioremediačních procesů využívající purifikovaných enzymů byl vyvinut rotační reaktor na kontaminovanou půdu<sup>94</sup>. Lakasa kultury *Trametes* sp. byla takto použita pro degradaci nonylfenolu, oktylfenolu, bisfenolu A, a 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu o počáteční koncentraci 60  $\mu$ M (cit.<sup>64</sup>). Dalším možným řešením zvýšení účinnosti těchto procesů by mohla být fixace enzymů na nosič. Okazaki a spol.<sup>115</sup> a Michizoe a spol.<sup>116</sup> publikovali oxidace bisfenolu A lakasou zachycenou v reverzních micelách z bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát sodné soli.

## 5. Závěr

Endokrinní disruptory, látky s různou strukturou a schopností ovlivňovat hormonální systém, se díky nedostatečným čistícím mechanismům běžně vyskytují v životním prostředí. K částečným mikrobiálním degradačním endokrinních disruptorů může docházet jak v aktivovaném kalu ČOV, tak působením některých bakterií, řas a hub. Z hlediska širokého spektra působení se jako perspektivní nástroj při dekontaminacích znečištěných oblastí ukazují houby bílé hniloby, produkující velké množství extracelulárních enzymů schopných účastnit se biodegradačních procesů endokrinně aktivních látek. V tomto článku jsou popsány metody využívající purifikovaných enzymů a metody, které vzhledem ke schopnosti těchto hub tolerovat i větší množství toxických látek, využívající celé houbové kultury.

*Práce vznikla za podpory projektu Grantové agentury Akademie věd ČR KJB600200613, projektů Ministerstva*

*školy, mládeže a tělovýchovy ČR: Centrum environmentální mikrobiologie LC06066, Biorem 2B06156 a výzkumného záměru č. AV0Z50200510.*

## LITERATURA

- Halling-Sorensen B., Nielsen S. N., Lanzky P. F., Ingerslev F., Lutzhoft H. C. H., Jorgensen S. E.: *Chemosphere* 36, 357 (1998).
- Routledge E. J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G. C., Waldock M., Sumpter J. P.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559 (1998).
- Snyder S. A., Westerhoff P., Yoon Y., Sedlak D. L.: *Environ. Eng. Sci.* 20, 449 (2003).
- Kujalová H., Sýkora V., Pitter P.: *Chem. Listy* 101, 706 (2007).
- Hignite C., Azarnoff D. L.: *Life Sci.* 20, 337 (1977).
- Aherne G. W., English J., Marks V.: *Ecotox. Environ. Safe.* 9, 79 (1985).
- Aherne G. W., Briggs R.: *J. Pharm. Pharmacol.* 41, 735 (1989).
- Mitsumori K., Furukawa F., Sato M., Yoshimura H., Imazawa T., Nishikawa A., Takahashi M.: *J. Cancer Res. Clin.* 120, 131 (1994).
- Desbrow C., Routledge E. J., Brighty G. C., Sumpter J. P., Waldock M.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549 (1998).
- Jobling S., Nolan M., Tyler C. R., Brighty G., Sumpter J. P.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498 (1998).
- Snyder M. J., Mulder E. P.: *Aquat. Toxicol.* 55, 177 (2001).
- Soares A., Jonasson K., Terrazas E., Guieysse B., Mattiasson B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 719 (2005).
- Tanaka T., Taniguchi M., v knize: *Wastewater Treatment Using Enzymes* (Sakurai A., ed.), kap. 6. Research Signpost, 2003.
- Kang J. H., Katayama Y., Kondo F.: *Toxicology* 217, 81 (2006).
- Colborn T., Myers J. P., Dumanoski D.: *Nat. Hist.* 105, 42 (1996).
- Sonnenschein C., Soto A. M.: *J. Steroid Biochem.* 65, 143 (1998).
- Guenther K., Kleist E., Thiele B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 542 (2006).
- Van den Belt K., Verheyen R., Witters H.: *Sci. Total Environ.* 309, 127 (2003).
- Quinn B., Gagne F., Costello M., McKenzie C., Wilson J., Mothersill C.: *Aquat. Toxicol.* 66, 279 (2004).
- Larsson D. G. J., Dolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A. H., Olsson P. E., Forlin L.: *Aquat. Toxicol.* 45, 91 (1999).
- Pelley J.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 313A (2003).
- Tyler C. R., Jobling S., Sumpter J. P.: *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 319 (1998).
- Ternes T. A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R. D., Servos M.: *Sci. Total Environ.* 225, 81 (1999).

24. Ejlertsson J., Nilsson M. L., Kylin H., Bergman A., Karlson L., Oquist M., Svensson B. H.: *Environ. Sci. Technol.* **33**, 301 (1999).
25. Maki H., Masuda N., Fujiwara Y., Ike M., Fujita M.: *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2265 (1994).
26. Giger W., Brunner P. H., Schaffner C.: *Science* **225**, 623 (1984).
27. Ahel M., Molnar E., Ibric S., Giger W.: *Water Sci. Technol.* **42**, 15 (2000).
28. Ahel M., Giger W., Schaffner C.: *Water Res.* **28**, 1143 (1994).
29. White R., Jobling S., Hoare S. A., Sumpter J. P., Parker M. G.: *Endocrinology* **135**, 175 (1994).
30. Lavado R., Thibaut R., Raldua D., Martin R., Porte C.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **196**, 247 (2004).
31. Staples C. A., Naylor C. G., Williams J. B., Gledhill W. E.: *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2450 (2001).
32. Ying G. G., Williams B., Kookana R.: *Environ. Int.* **28**, 215 (2002).
33. Laws S. C., Carey S. A., Ferrell J. M., Bodman G. J., Cooper R. L.: *Toxicol. Sci.* **54**, 154 (2000).
34. Perez P., Pulgar R., Olea-Serrano M. F., Rivas A., Pazos P., Pedraza V., Olea N.: *J. Dent. Res.* **77**, 1209 (1998).
35. Tanaka H., Yakou Y., Takahashi A., Higashitani T., Komori K.: *Water Sci. Technol.* **43**, 125 (2001).
36. Brotons J. A., Oleaserrano M. F., Villalobos M., Pedraza V., Olea N.: *Environ. Health Perspect.* **103**, 608 (1995).
37. Biles J. E., Meneal T. P., Begley T. H., Hollifield H. C.: *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3541 (1997).
38. Olea N., Pulgar R., Perez P., Olea-Serrano F., Rivas A., Novillo-Fertrell A., Pedraza V., Soto A. M., Sonnenschein C.: *Environ. Health Perspect.* **104**, 298 (1996).
39. Beato M., Truss M., Chavez S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **784**, 93 (1996).
40. Kuiper G. G. J. M., Enmark E., Pelto-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5925 (1996).
41. Tremblay G. B., Tremblay A., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Labrie F., Giguere V.: *Mol. Endocrinol.* **11**, 353 (1997).
42. Kuiper G. G. J. M., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J. A.: *Endocrinology* **138**, 863 (1997).
43. Brzozowski A. M., Pike A. C. W., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engstrom O., Ohman L., Greene G. L., Gustafsson J. A., Carlquist M.: *Nature* **389**, 753 (1997).
44. Routledge E. J., Sumpter J. P.: *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 241 (1996).
45. Routledge E. J., Sumpter J. P.: *J. Biol. Chem.* **272**, 3280 (1997).
46. Nishikawa J., Saito K., Goto J., Daikayama F., Matsuo M., Nishihara T.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **154**, 76 (1999).
47. U.S. Environmental Protection Agency: Comparative evaluation of vitellogenin methods for medaka and zebra fish, EPA 68-W-01-023 (U.S. EPA 2003).
48. Tanaka S., Nakata Y., Kuramitz H., Kawasaki M.: *Chem. Lett.* 943 (1999).
49. Ohko Y., Ando I., Niwa C., Tatsuma T., Yamamura T., Nakashima T., Kubota Y., Fujishima A.: *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2365 (2001).
50. Chen P. J., Linden K. G., Hinton D. E., Kashiwada S., Rosenfeldt E. J., Kullman S. W.: *Chemosphere* **65**, 1094 (2006).
51. Rosenfeldt E. J., Linden K. G.: *Environ. Sci. Technol.* **38**, 5476 (2004).
52. Chang S., Waite T. D., Ong P. E. A., Schafer A. I., Fane A. G.: *J. Environ. Eng. - Asce* **130**, 736 (2004).
53. Ternes T. A., Meisenheimer M., McDowell D., Sacher F., Brauch H. J., Gulde B. H., Preuss G., Wilme U., Seibert N. Z.: *Environ. Sci. Technol.* **36**, 3855 (2002).
54. Yoon Y. M., Westerhoff P., Snyder S. A., Esparza M.: *Water Res.* **37**, 3530 (2003).
55. Nghiem L. D., Manis A., Soldenhoff K., Schafer A. I.: *J. Membr. Sci.* **242**, 37 (2004).
56. Schafer A. I., Nghiem L. D., Waite T. D.: *Environ. Sci. Technol.* **37**, 182 (2003).
57. Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S. A., Wert E. C.: *J. Membr. Sci.* **270**, 88 (2006).
58. Westerhoff P., Yoon Y., Snyder S., Wert E.: *Environ. Sci. Technol.* **39**, 6649 (2005).
59. Zwiener C., Frimmel F. H.: *Water Res.* **34**, 1881 (2000).
60. Pinkston K. E., Sedlak D. L.: *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4019 (2004).
61. Furhacker M., Scharf S., Weber H.: *Chemosphere* **41**, 751 (2000).
62. Staples C. A., Dorn P. B., Klecka G. M., O'Block S. T., Harris L. R.: *Chemosphere* **36**, 2149 (1998).
63. Tanghe T., Devriese G., Verstraete W.: *Water Res.* **32**, 2889 (1998).
64. Banat F. A., Prechtl S. B., Bischof F.: *Chemosphere* **41**, 297 (2000).
65. Ahel M., Giger W., Koch M.: *Water Res.* **28**, 1131 (1994).
66. Alcock R. E., Sweetman A., Jones K. C.: *Chemosphere* **38**, 2247 (1999).
67. Joss A.: *Water Res.* **39**, 4585 (2005).
68. Uguz C., Togan I., Eroglu Y., Tabak I., Zengin M., Iscan M.: *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **14**, 87 (2003).
69. Manzano M. A., Perales J. A., Sales D., Quiroga J. M.: *Water Res.* **33**, 2593 (1999).
70. Harries J. E., Sheahan D. A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Routledge E. J., Rycroft R., Sumpter J. P., Tylor T.: *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1993 (1996).
71. Routledge E. J., Waldock M., Sumpter J. P.: *Environ. Sci. Technol.* **33**, 371 (1999).
72. Ternes T. A., Kreckel P., Mueller J.: *Sci. Total Environ.* **225**, 91 (1999).

73. Fujii K., Kikuchi S., Satomi M., Ushio-Sata N., Morita N.: *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2057 (2002).
74. Gabriel F. L. P., Heidlberger A., Rentsch D., Giger W., Guenther K., Kohler H. P. E.: *J. Biol. Chem.* **280**, 15526 (2005).
75. Tanghe T., Dhooge V., Verstraete W.: *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 746 (1999).
76. Ushiba Y., Takahara Y., Ohta H.: *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **53**, 2045 (2003).
77. Sasaki M., Maki J., Oshiman K., Matsumura Y., Tsuchido T.: *Biodegradation* **16**, 449 (2005).
78. Ike M., Jin C. S., Fujita M.: *Water Sci. Technol.* **42**, 31 (2000).
79. Kang J. H., Kondo F.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**, 265 (2002).
80. Spivack J., Leib T. K., Lobos J. H.: *J. Biol. Chem.* **269**, 7323 (1994).
81. Lobos J. H., Leib T. K., Su T. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1823 (1992).
82. Ronen Z., Abeliovich A.: *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2372 (2000).
83. Zhang C., Zeng G. M., Yuan L., Yu J., Li J. B., Huang G. H., Xi B. D., Liu H. L.: *Chemosphere* **68**, 181 (2007).
84. Ike M., Chen M. Y., Jin C. S., Fujita M.: *Environ. Toxicol.* **17**, 457 (2002).
85. Voordeckers J. W., Fennell D. E., Jones K., Haggblom M. M.: *Environ. Sci. Technol.* **36**, 696 (2002).
86. Hirooka T., Akiyama Y., Tsuji N., Nakamura T., Nagase H., Hirata K., Miyamoto K.: *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 200 (2003).
87. Hirooka T., Nagase H., Uchida K., Hiroshige Y., Ehara Y., Nishikawa J., Nishihara T., Miyamoto K., Hirata Z.: *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 1896 (2005).
88. Ishihara K., Nakajima N.: *J. Mol. Catal.: B Enzym.* **23**, 419 (2003).
89. Sethunathan N., Megharaj M., Chen Z. L., Williams B. D., Lewis G., Naidu R.: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3030 (2004).
90. Yim S. H., Kim H. J., Lee I. S.: *Arch. Pharmacol. Res.* **26**, 805 (2003).
91. Soares A., Jonasson K., Terrazas E., Guieysse B., Mattiasson B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 719 (2005).
92. Fukuda T., Uchida H., Takashima Y., Uwajima T., Kawabata T., Suzuki M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 704 (2001).
93. Lee S. M., Koo B. W., Lee S. S., Kim M. K., Choi D. H., Hong E. J., Jeung E. B., Choi I. G.: *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 417 (2004).
94. Tanaka T., Tonosaki T., Nose M., Tomidokoro N., Kadomura N., Fujii T., Taniguchi M.: *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 312 (2001).
95. Saito T., Kato K., Yokogawa Y., Nishida M., Yamashita N.: *J. Biosci. Bioeng.* **98**, 64 (2004).
96. Kimura M., Michizoe J., Okazaki S., Furusaki S., Goto M., Tanaka H., Wariishi H.: *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 495 (2004).
97. Tsutsumi Y., Haneda T., Nishida T.: *Chemosphere* **42**, 271 (2001).
98. Lee S. M., Koo B. W., Choi J. W., Choi D. H., An B. S., Jeung E. B., Choi I. G.: *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 201 (2005).
99. Soares A., Guieysse B., Mattiasson B.: *Biotechnol. Lett.* **28**, 139 (2006).
100. Lee J. W., Lee S. M., Hong E. J., Jeung E. B., Kang H. Y., Kim M. K., Choi I. G.: *J. Microbiol.* **44**, 177 (2006).
101. Chai W., Handa Y., Suzuki M., Saito M., Kato N., Horiuchi C. A.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* **120**, 175 (2005).
102. Junghanns C., Moeder M., Krauss G., Martin C., Schlosser D.: *Microbiology - Sgm* **151**, 45 (2005).
103. Vallini G., Frassinetti S., Scorzetti G.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 336 (1997).
104. Vallini G., Frassinetti S., D'Andrea F., Catelani G., Agnolucci M.: *Int. Biodeter. Biodegr.* **47**, 133 (2001).
105. Reddy C. A.: *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 320 (1995).
106. Leonowicz A., Cho N. S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J.: *J. Basic Microbiol.* **41**, 185 (2001).
107. Hatakka A.: *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 125 (1994).
108. Hofrichter M.: *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 454 (2002).
109. Baldrian P.: *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 215 (2006).
110. Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S. N.: *Biotechnol. Adv.* **22**, 161 (2003).
111. Hirano T., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **64**, 1958 (2000).
112. Sakurai A., Toyoda S., Sakakibara M.: *Biotechnol. Lett.* **23**, 995 (2001).
113. Suzuki K., Hirai H., Murata H., Nishida T.: *Water Res.* **37**, 1972 (2003).
114. Uchida H., Fukuda T., Miyamoto H., Kawabata T., Suzuki M., Uwajima T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 355 (2002).
115. Okazaki S. Y., Michizoe J., Goto M., Furusaki S., Wariishi H., Tanaka H.: *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 227 (2002).
116. Michizoe J., Goto M., Furusaki S.: *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 67 (2001).

**Z. Křesinová, K. Svobodová, and T. Cajthaml**  
*(Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): Microbial Degradation of Endocrine Disruptors*

Recently, alkylphenols, bisphenols and several synthetic estrogens have been recognized as endocrine disruptors (ED). They can interfere with hormones and thus disrupt development of animals. Investigation of environmental pollution by these chemicals, studies of their toxicity and the ability of various microorganisms to decompose such compounds are now in progress. This work



summarizes findings on microbial degradation of ED in the last three decades with a special respect to the promising bioremediation agents – white rot fungi and degradation capacity of their ligninolytic enzymes. Most of the studies are focused on the degradation of ED by purified enzymes although these methods are technically demand-

ing and costly. On the other hand, the ED degradation with fungal cultures are also feasible. The work is aimed at identification of intermediates from ED degradation and their endocrine activities, which is important for better understanding of microbial degradation.

## APLIKÁCIA BIOSENZOROV PRI MONITOROVANÍ FERMENTAČNÝCH PROCESOV

MILAN VALACH<sup>a</sup> a ERNEST ŠTURDÍK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, <sup>b</sup> Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská Technická Univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava  
valach@fpharm.uniba.sk

Došlo 29.10.07, prepracované 27.5.08, prijaté 4.6.08.

Kľúčové slová: biosenzory, monitorovanie, vzorkovanie, fermentačné procesy

### Obsah

1. Úvod
2. Vzorkovanie
3. Monitorovanie fermentácií
4. Prietokový systém analýzy
5. Využitie biosenzorov pri monitorovaní fermentačných procesov
6. Záver

### 1. Úvod

Monitorovanie bioprocessov je primárnym zdrojom dát, ktoré slúžia na identifikáciu kľúčových procesových parametrov, preto zohráva nezastupiteľnú úlohu pri ich optimalizácii a aktívnom zasahovaní do priebehu procesu<sup>1,2</sup>. Bežne využívané monitorovacie zariadenia umožňujú sledovanie niektorých základných parametrov bioprocessov napr. koncentráciu rozpustného kyslíka a oxidu uhličitého, pH, teplotu, redoxný potenciál, otáčky miešadla, tvorbu peny a pod. Z novších aplikácií analytických techník v monitorovaní bioprocessov možno spomenúť „on-line“ sledovanie koncentrácie biomasy *in situ* s využitím optickej denzitometrie a fluorimetrie<sup>3,4</sup> alebo sledovanie množstva tvorby inklúzných teliesok počas produkcie proteínov pomocou merania impedancie<sup>5</sup>. Uvedené parametre poskytujú však len nepriame informácie o priebehu fermentačných procesov. Veľmi cenné informácie nám poskytuje hlavne monitorovanie koncentrácie substrátov a produktov počas priebehu bioprocessov a práve na tieto účely sa štandardne využíva metóda HPLC, ktorá je založená na účinnej separácii jednotlivých zložiek komplexných médií. Najnovším trendom

v aplikovanom „on-line“ monitorovaní rôznych analytov sa stáva využitie biosenzorov.

Biosenzory ako analytické detektory predstavujú príkladné spojenie interdisciplinárnych poznatkov biológie, biochémie, fyzikálnej a analytickej chémie. Spoločnou črtou princípu práce biosenzorov je interakcia biologického komponenta so stanovovaným substrátom, ktorá je zdrojom impulzu spracovateľného prevodníkom na elektronický signál úmerný koncentrácii stanovovaného analytu<sup>6</sup>. Výhody týchto zariadení sú rýchlosť, špecifickosť a mobilita stanovenia s minimálnou resp. žiadnou predúpravou analyzovaných vzoriek. Vôbec prvým biosenzorom bol detektor skonštruovaný Clarkom a Lyonsom<sup>7</sup> v roku 1962. L. C. Clark je však skôr známy ako vynálezca kyslíkového senzora<sup>8</sup>. Pôvodný motív na využitie Clarkovho kyslíkového článku bolo sledovanie koncentrácie rozpustného kyslíka v krvi počas klinických zásahov. Spomínaný autor na povrch kyslíkového senzora imobilizoval enzým glukózooxidázu a tento prvý biosenzor stanovoval koncentráciu glukózy na základe úbytku kyslíka spotrebovaného pri enzymatickej reakcii. Takýmto analytickým zariadením sa rozšíri špecifita i rozsah stanoviteľných substrátov oproti senzorum založeným na princípe fyzikálnochemického prevodníka. Rôznymi kombináciami biologickej časti s prevodníkom možno docieľiť veľké množstvo rôznych konštrukcií. Nezanedbateľnými prednosťami sú tiež možnosti jednoduchšej automatizácie či kontinualizácie merania a hlavne cenová nenáročnosť. Informácie o chovaní sa biosystému získané v čo najkratšom čase sú nevyhnutné pre dokonalejšie modelovanie a účinnejšie riadenie procesu<sup>9</sup>. Včasným zásahom do bioprocessu na základe rýchlo získaných informácií možno vo veľkovýrobnej praxi predísť značným ekonomickým stratám.

### 2. Vzorkovanie

Úlohou vzorkovania je rýchly a spoľahlivý odber reprezentatívnej vzorky fermentačného média. Špecifickým problémom pri vzorkovaní prebiehajúceho bioprocessu je potreba zachovať aseptickosť prostredia, ktorá je nevyhnutnou podmienkou pre optimálne pokračovanie celého procesu. Najjednoduchším riešením je priamy odber vzorky pomocou katétra zavedeného do fermentora<sup>10</sup>. Aby vzorka poskytovala reprezentatívne údaje o zložení fermentačného média v momente odberu, musia byť metabolické reakcie rýchlo zastavené, napr. prídavkom chloramínu<sup>11</sup>, rýchlym znížením teploty, alebo znížením pH (cit.<sup>12</sup>). Aplikácia biosenzorov v monitorovaní však neumožňuje takto chemicky upravovať vzorku, pretože inaktivačné činidlá by nepriaznivo ovplyvňovali aj analytické charakteristiky samotného biosenzora. Okrem toho

väčšina štandardných analytických metód vyžaduje odstránenie tuhých zložiek z analyzovanej matrice, preto je význam priameho odberu vzoriek z fermentačného zariadenia spojený s následnou inaktiviáciou metabolických aktivít diskutabilný<sup>13</sup>. Z uvedeného dôvodu sa pri vzorkovaní fermentačných procesov častejšie využívajú metódy, pri ktorých je vzorkovanie spojené so separáciou biomasy. Medzi najpoužívanejšie patria dialýza<sup>14</sup> a mikrofiltrácia. Semipermeabilný efekt pórovitej membrány umožňuje efektívne separovať biomasu a iné vysokomolekulové komponenty pri odbere vzoriek z fermentačného média, čím dochádza hneď po odbere vzorky k zamedzeniu metabolickej aktivity, ktorá by mohla ďalej ovplyvňovať zloženie odoberanej vzorky.

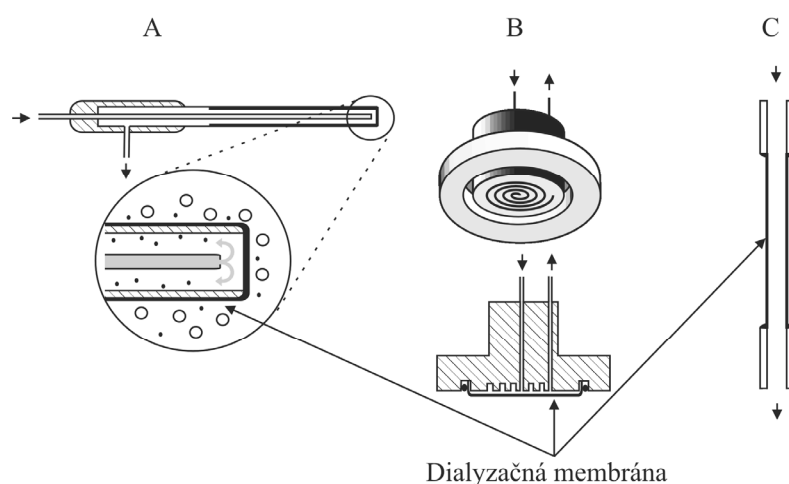
Pri dialýze sa ako hnacia sila separácie uplatňuje len koncentračný gradient, umožňujúci prestup separovaných zložiek z fermentačného média do akceptornej fázy, ktorá obyčajne pozostáva len z vody alebo z príslušného tlmivého systému. Vzhľadom na nekvantitatívny charakter dialyzačnej separácie vyžadujú tieto systémy presné určenie koeficientov prestupu separovaných zložiek pri používaných prevádzkových parametroch systému. Preto si takéto zariadenia vyžadujú dôkladnú kalibráciu. V literatúre bolo opísané zariadenie úspešne pracujúce na báze spojenia dialyzačnej sondy s biosenzormi pri simultánnom monitorovaní glukózy a laktátu v prietokovom usporiadaní<sup>15</sup>. Taktiež bol pripravený senzor na kombinované stanovenie glukózy, glutamátu a cholínu využívajúci príslušné oxidázy imobilizované na mikroelektródach umiestnených na spoločnom sklenenom čipe vytvárajúcom prietokovú celú. Takto pripravený systém bol spojený s mikrodialyzačnou sondou<sup>16</sup>. Rôzne typy konštrukcie dialyzačných sond sú znázornené na obr. 1.

Pri filtrácii je hnacou silou separácie tlakový gradient pred resp. za filtračnou membránou. Porozita mikrofiltráčnej membrány (0,1–10  $\mu\text{m}$ ) umožňuje prestup všetkých

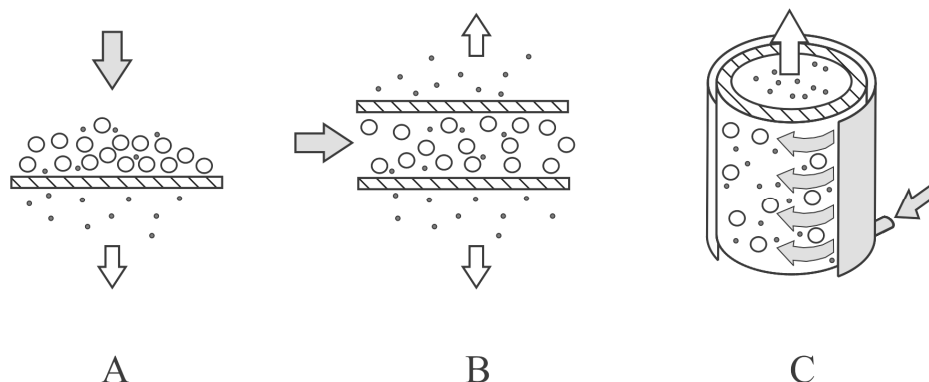
rozpusťných zložiek. Pri použití ultrafiltrácie (póry < 100 nm) porozita membrány limituje aj prestup rozpustných makromolekulových komponentov. Koncentračné pomery vo vzorkách pripravených filtráciou zodpovedajú (na rozdiel od dialýzy) skutočným koncentráciám zložiek rozpustených vo fermentačnom médiu. Hlavnou nevýhodou filtrácie je zanášanie filtračnej membrány. Tento problém je možné minimalizovať pomocou tangenciálnej a „cross-flow“ filtrácie, pri ktorých prúdi filtrované médium paralelne s povrchom filtračnej membrány, na rozdiel od kolmého prúdenia pri štandardnej filtrácii (obr. 2).

Práve *ex-situ* filtrácia bola použitá aj pri uplatnení biosenzora postaveného na báze inkorporácie enzýmu alkoholdehydrogenázy do polypyrolismiového polyméru pri monitorovaní etanolovej fermentácie. Autori inkorporovali senzor do prietokového sekvenčného analyzátora umožňujúceho plne automatické a reprodukovateľné riedenia vzoriek a štandardov. Celý monitorovací systém bol potom veľmi prakticky prepojený na fermentor pomocou kombinácie uzavretej slučky so vstavaným „cross-flow“ filtračným zariadením a jednoduchkej odbublínovacej komory (odstraňovanie CO<sub>2</sub> vzniknutého počas fermentácie). Životaschopnosť tohto zariadenia bola otestovaná pri „on-line“ monitorovaní vínneho kvasenia vo vinárskych závodoch v maďarskej tokajskej oblasti (celkový objem fermentora 45 hl)<sup>17</sup>. Na „on-line“ monitorovanie etanolovej fermentácie pomocou biosenzora bolo tiež úspešne použité aj filtračné zariadenie s tangenciálnym tokom pri vädzaného média<sup>18</sup>.

Všeobecne však možno povedať, že medzi najpoužívanejšie automatizované spôsoby vzorkovania fermentačných procesov patria hlavne filtračné metódy a dialyzačné zariadenia. Menej využívané postupy separácie biomasy sú založené na mikrocentrifugácii, ktorá nachádza uplatnenie v plne automatických zariadeniach pre „on-line“ monitorovanie<sup>19</sup>.



Obr. 1. Konštrukcie sond používaných na dialyzačné vzorkovanie; A – koaxiálna sonda, B – planárna sonda, C – sonda na báze dutého vlákna



Obr. 2. **Principiálne zobrazenie rôznych spôsobov filtrácie;** A – klasická filtrácia s kolmým tokom média na filtračnú membránu, B – „cross-flow“ filtrácia s rovnobežným tokom, C – filtrácia s tangenciálnym tokom. Tmavá šípka označuje tok suroviny a svetlá tok filtrátu

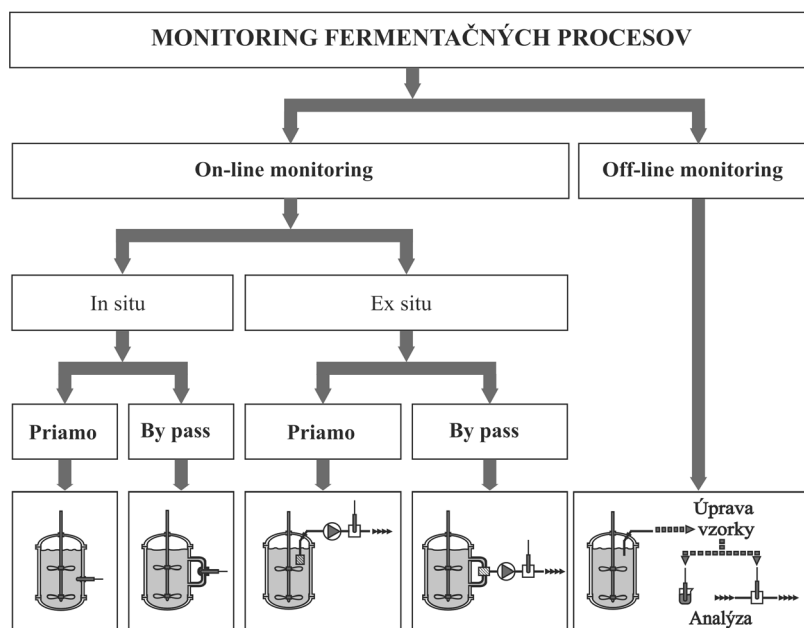
### 3. Monitorovanie fermentácií

Na základe spôsobu integrácie senzorov do sledovania fermentačného procesu môžeme monitorovacie techniky rozdeliť na „off-line“ a „on-line“. „Off-line“ technika monitorovania fermentačných procesov je založená na manuálnom odbere vzorky z monitorovaného systému, pričom následné spracovanie vzorky a samotné stanovenie prebieha na inom mieste zväčša v laboratóriu. Hlavnou nevýhodou „off-line“ systému je dlhé časové oneskorenie medzi momentom odberu vzorky a analýzou, ktoré v mnohých prípadoch znemožňuje efektívne zasahovať do priebehu procesov vyznačujúcich sa vysokou dynamikou. Napríklad pri sledovaní priebehu fermentačných procesov s použitím baktérií by vo väčšine prípadov časové oneskorenie nemalo presahovať niekoľko minút vzhľadom na krátku generačnú dobu. Pri použití rýchlych biokonverzných enzýmových systémov by sa časové oneskorenie malo približovať k sekundám. Miernou modifikáciou „off-line“ monitoringu je „at-line“ monitoring<sup>20</sup>, pri ktorom je meracie zariadenie umiestnené v tesnej blízkosti sledovaného procesu, ale stále je potrebná manuálna manipulácia s analyzovaným materiálom. „On-line“ monitorovanie rieši časové oneskorenie „off-line“ monitorovania priamou aplikáciou detekčného člena do fermentačnej nádoby (*in-situ* usporiadanie), kde sú na detektor kladené vysoké stabilitné nároky. *In-situ* aplikácie biosenzorov sú veľmi zriedkavé. Je to dané problémami s ich sterilizáciou, nízkou stabilitou biokomponentov voči pôsobeniu určitých fyzikálno-chemických faktorov. Pri *ex-situ* „on-line“ usporiadaní je detektor umiestnený mimo fermentačného zariadenia vo vhodnom prietokovom usporiadaní, ktoré je pripojené cez vzorkovací modul slúžiaci zároveň aj na predúpravu vzorky. Takéto usporiadanie umožňuje zabezpečiť pre funkciu biosenzora optimálne podmienky (obr. 3).

### 4. Prietokový systém analýzy

Najrozšírenejšou prietokovou technikou využívanou v analytickej praxi je metóda prietokovej injekčnej analýzy (Flow Injection Analysis – FIA). Metóda bola zavedená v polovici 70. rokov Růžičkom a Hansenom<sup>21</sup>. Modifikácie FIA vzhľadom na svoju jednoduchú automatizovateľnosť a reprodukovateľnosť dominujú medzi prietokovými metódami využívanými pre „on-line“ monitorovanie rôznych procesov. FIA je založená na včlenení malého objemového pulzu analyzovanej vzorky (5–100  $\mu$ l) do laminárneho toku mobilnej fázy (obr. 4). V priebehu transportu medzi dávkovacím ventilom a detekčnou časťou dochádza k postupnej disperzii pulzu vzorky v mobilnej fáze, čo spôsobuje zníženie maximálnej koncentrácie v zóne vzorky a zároveň rozšírenie zóny. Tento proces vedie k automatickému nariadeniu vzorky, ktoré je v mnohých prípadoch potrebné pre analýzu s využitím biosenzorov s ohľadom na ich obmedzený dynamický rozsah. Kontakt vzorky s detektorom trvá reprodukovateľný časový úsek, pričom nie je potrebné ustálenie rovnováhy, čo umožňuje skrátiť čas analýzy. Okrem biosenzorov sa vo FIA aplikáciách používajú najčastejšie IR<sup>22</sup>, spektrofotometrické<sup>23</sup>, MS<sup>24</sup>, PIF (photochemically induced fluorescence)<sup>25</sup>, a vodivostné<sup>26</sup> detektory.

Veľmi úspešnou metodikou vyvinutou pri odstraňovaní nedokonalostí klasického FIA systému je sekvenčná injekčná analýza (Sequential Injection Analysis – SIA), kde je spojitý tok nosného média nahradený sekvenciou: nosné médium, vzorka prípadne potrebné činidlá na detekciu v jednom prúde, čo je v tomto prípade umožnené automatickým nasávaním jednotlivých zložiek cez selekčný ventil pomocou piestového čerpadla umožňujúceho priamy aj spätný tok<sup>27</sup> (obr. 4). Pomocou tejto metodiky možno aj jednoducho a veľmi reprodukovateľne riediť vzorky, prípadne štandardy priamo počas analýzy v automatizovanom režime naprogramovaním patričnej sekvencie jednotlivých



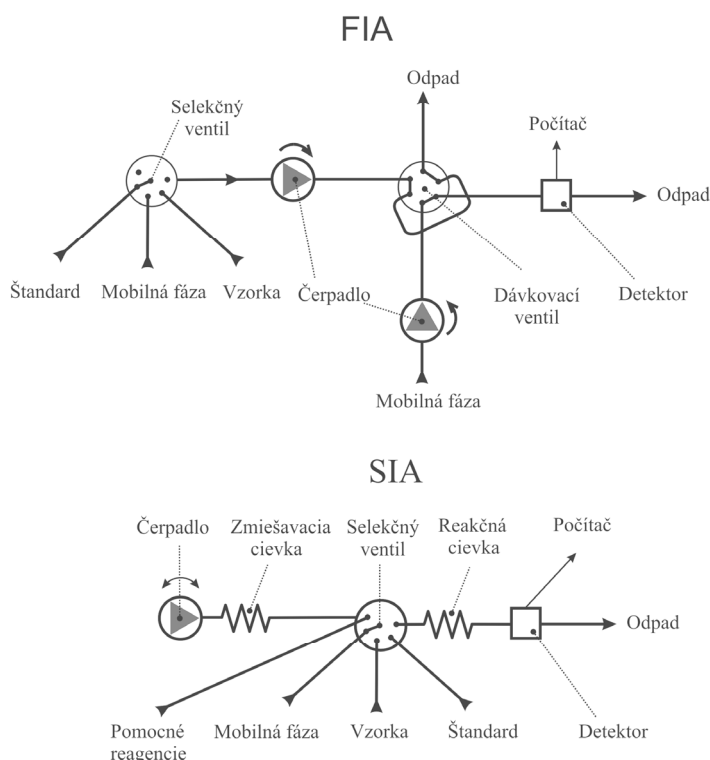
Obr. 3. Schematické znázornenie možností spôsobov monitorovania fermentačných procesov

krokov<sup>28</sup>. Naproti tomu v klasických FIA zostavách muselo byť riadenie vzoriek často riešené pomocou delenia toku<sup>29,30</sup> alebo s použitím rôznych zmiešavacích komôr<sup>31</sup>, čo značne komplikovalo celú zostavu. Rozšírenie prietokových injekčných techník v posledných rokoch dokumentuje ich významné postavenie v snahách o automatizáciu, zrýchlenie a miniaturizáciu zariadení slúžiacich na reprodukovateľnú aplikáciu, prípadne predúpravu analyzovaných matric<sup>32</sup>.

Najnovším trendom miniaturizácie prietokových meracích systémov je vývoj takzvaných „lab on a chip“ zariadení. Vo všeobecnosti ide o prípravu sofistikovane navrhnutých čipov obsahujúcich zostavu mikro kanálikov vyrobených kombináciou technológie fotolitografie a leptania<sup>33</sup>, poprípade s použitím lasera<sup>34</sup>. Keďže pri práci s takýmito zariadeniami sa manipuluje s extrémne malými objemami či už vzoriek, činidiel alebo nosných médií, je samozrejme potrebné požívať adekvátne vybavenie pre vytváranie prietoku cez opísané zariadenia. Najčastejšie sa používajú piestové SIA mikrodávkovacie zariadenia dodávajúce do systému presné objemy na úrovni nanolitrov<sup>35</sup> alebo tiež elektroosmoticky indukovaný tok<sup>36</sup> vyvolaný usmerneným pohybom iónov, pri ktorom zároveň dochádza aj k elektroforetickej separácii analyzovanej vzorky<sup>37</sup>. Detekčný systém používaný v biočipoch býva veľmi často založený na elektrochemickom princípe, pričom na zvýšenie selektivity detekcie slúži tiež uplatnenie biokomponentov poskytujúcich špecifické interakcie (princíp biosenzora).

## 5. Využitie biosenzorov pri monitorovaní fermentačných procesov

Biosenzor je zariadenie pozostávajúce z biologickej časti, ktorá sa nachádza v tesnom kontakte s fyzikálnochemickým prevodníkom alebo je súčasťou prevodníka. Podľa definície a klasifikácie IUPAC by sa mali okrem biosenzorov rozlišovať bioanalytické systémy, ktoré vyžadujú pri meraní ďalšie operácie a biosondy, ktoré sú buď na jedno použitie alebo nemôžu sledovať koncentráciu analytu kontinuálne. Fyzikálnochemický prevodník je schopný detegovať zmeny, ktoré vznikajú po interakcii biokomponenta so substrátom, takže biointerakcia sa prevádza na vhodný analytický signál, ktorým obyčajne býva elektrický prúd alebo potenciál (obr. 5). Najfrekvencovanejším prevodníkom je ampérometrický prevodník v spojení so sledovaním priebehu redoxných procesov. Tento prevodník je polarizovaný určitým potenciálom a biokomponent pri oxidácii substrátu odovzdáva elektróny elektróde (pri redukcii opačne) nie vždy len priamo, ale často aj prostredníctvom iných molekúl, ktorými môžu byť kosubstrát, kofaktor alebo mediátor, pričom veľkosť tečúceho prúdu je priamo úmerná koncentrácii analytu. Potenciometrický prevodník umožňuje merať zmenu potenciálu, vyvolanú koncentračným gradientom iónov, ktoré vznikajú činnosťou enzýmov imobilizovaných na povrchu elektród. Zmena potenciálu je úmerná logaritmu koncentrácie analytu. Kalorimetrické biosenzory, nazývané aj termistory, poskytujú univerzálny detekčný princíp, pretože uvoľňovanie alebo spotreba tepla je typická pre všetky bioche-

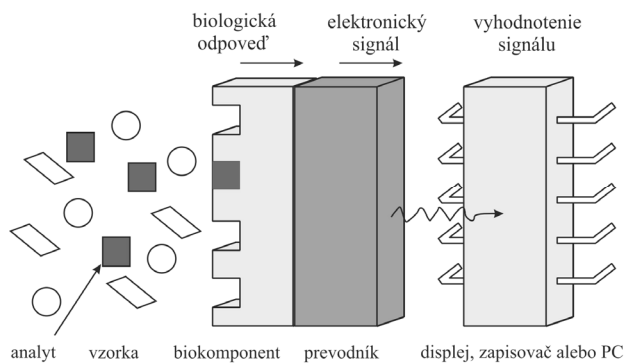


Obr. 4. Schéma dvoch základných systémov používaných pri prietokovom spôsobe analýzy; FIA – prietoková injekčná analýza, SIA – sekvenčná injekčná analýza

mické deje. Prístroj je konštruovaný tak, že jedna vetva je referenčná a v druhej vetve je imobilizovaný biokatalyzátor, pričom sa zaznamenáva rozdiel teplôt (rádovo  $10^{-3}$  °C), ktorý je úmerný koncentrácii stanovovanej látky<sup>38</sup>. Biosenzory s optickým prevodníkom fungujú tak, že biokatalyzátor produkuje alebo spotrebúva látku s optickými vlastnosťami a koncentrácia analytu sa určuje na základe merania vhodnej optickej veličiny, napríklad absorpcie, emisie svetla, fluorescencie, atď. Okrem opísaných spôsobov detekcie biointerakcií sa ešte v menšej miere používajú aj konduktometrické a piezoelektrické prevodníky.

Biologická časť (enzýmy, bunky, protilátky, atď.) sa vyznačuje špecifitou interakcie so stanovovanou látkou. Citlivosť senzora pritom závisí na biologickej časti, ale aj na použítom prevodníku. Pri enzymatických biosenzoroch plní funkciu biologickej časti senzora enzým alebo aj viac enzýmov. Takéto senzory sa vyznačujú väčšinou výbornou selektivitou a sú určené na špecifické sledovanie jedného substrátu, resp. malej skupiny látok podobnej povahy. Publikovaný bol prietokový systém založený na špecifických enzýmoch izolovaných z mikroorganizmov (*Erwinia sp.*, *Gluconobacter sp.*) schopný monitorovať súčasne hladinu glukózy, glycerolu a etanolu vo vzorkách vína. Využitý bol ampérometrický spôsob detekcie, pričom jednotlivé senzory boli namontované v spoločnej prietokovej

cele a boli zapojené do viacerých potenciostatov. Každý potenciostat poskytoval signál prislúchajúci jednému senzoru t.j. jednému analytu. Z hľadiska konštrukcie boli jednotlivé senzory pripravené zmiešaním enzýmu s redoxným polymérom (mediátor elektrónového transportu) a sieťovacím číničom na povrchu uhlíkovej elektródy<sup>39</sup>. Na ampérometrickom spôsobe detekcie bol založený aj senzor schopný enantioselektívneho stanovenia D-amino-kyselín nachádzajúcich sa vo vzorkách mlieka. Senzor bol



Obr. 5. Základný princíp funkcie biosenzora

Tabuľka I  
Príklady použitia biosenzorov pri monitorovaní rôznych analytov

Analyt	Biologický komponent	Prevod signálu	Typ imobilizácie	Aplikácia	Lit.
Etanol	alkoholdehydrogenáza	ampérometrický	Inkorporácia do polypyrol-osmiového polyméru	fermentačná výroba vína	17
Glukóza	glukózadehydrogenáza	ampérometrický	zosieťovanie s hydrogélom	analýza vzoriek vína	39
Acetát	acetátkináza pyruvátkináza laktátdehydrogenáza	ampérometrický	zosieťovanie na povrchu uhlíkovej elektródy	fermentačná výroba vína	42
Glycerol	glycerolkináza	kalorimetrický	väzba na modifikované sklené guľičky	konverzia glycerolu na 1,3-propándiol	41
D-Aminokyseliny	oxidáza D-aminokyselín	ampérometrický	zosieťovanie na povrchu uhlíkovej elektródy + nafion	analýzy ovocných džúsov a mlieka	40
Glutamát					
Kys. jablčná	malátdehydrogenáza	ampérometrický	väzba na modifikované sklené guľičky	jablčno-mliečna fermentácia	43
Kys. mliečna	laktátoxidáza	ampérometrický	zosieťovanie na povrchu nylonovej membrány	jablčno-mliečna fermentácia	43
BSK <sup>a</sup>	<i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	ampérometrický	inkorporácia do sol-gélu	hodnotenie kvality odpadových vôd	46
Metylparatión	<i>Flavobacterium sp.</i>	optický	adsorpcia na filter zo sklenených vlákien	analýza organofosfátových pesticídov	54

<sup>a</sup> Biologická spotreba kyslíka

vyrobený progresívnou „screen-printed“ technológiou nanášania jednotlivých aktívnych vrstiev na seba<sup>40</sup>. Pomocou biosenzora postaveného na báze enzýmového termistora s glycerolkinázou (EC 2.7.1.30) imobilizovanou na upravených sklenených guľôčkach bola monitorovaná hladina substrátu počas mikrobiálnej konverzie glycerolu na 1,3-propándiol. Výborná operačná aj skladovacia stabilita tohto senzora umožňovali jeho aplikáciu v plne automatizovanom FIA systéme vybavenom dokonca aj zariadením pre automatické riedenie vzoriek<sup>41</sup>. Na monitorovanie acetátu vo vzorkách octu a hroznového vína bol pripravený trojenzýmový senzor imobilizáciou acetátkinázy (EC 2.7.2.1), pyruvátkinázy (EC 2.7.1.40) a laktátdehydrogenázy (EC 1.1.1.27) zosieťovaním na povrchu uhlíkovej elektródy pomocou polyetylénglykoldiglycidyléteru. Takýto senzor pracoval na ampérometrickom princípe detekcie a vyznačoval sa veľmi dobrou selektivitou<sup>42</sup>. V prietokovom FIA usporiadaní boli použité aj senzory na monitorovanie jablčno-mliečnej fermentácie počas výroby vína. Pracovali na ampérometrickom spôsobe detekcie. Obsah kyseliny mliečnej bol monitorovaný senzorom, ktorý obsahoval imobilizovanú laktátoxidázu (1.13.12.4) na povrchu nylonovej membrány a kyselina jablčná bola detegovaná s využitím malátdehydrogenázy (EC 1.1.1.40) imobilizovanej na povrchu upravených sklenených guľôčok integrovaných do miniatúrneho prietokového reaktora<sup>43</sup>.

Mikrobiálne biosenzory obsahujú v úlohe biologickej zložky mikrobiálne bunky buď intaktne, permeabilizované, inak upravené alebo mŕtve. Tieto senzory sú menej špecifickejšie ako enzýmové, keďže bunky obsahujú viac druhov enzýmov katalyzujúcich rôzne reakcie, preto sa okrem detekcie jedného analytu používajú aj pri nešpecifických stanoveniach širších skupín látok alebo ich konkrétnych vlastností (napr. toxicita). Úspešne sa používajú pri hodnotení kvality odpadových vôd meraním biologickej spotreby kyslíka (BSK) (cit.<sup>44</sup>). V tomto prípade efektívne nahrádzajú klasické kultivačné merania, ktoré boli veľmi časovo náročné (BSK<sub>5</sub> – 5 dní, resp. BSK<sub>7</sub> – 7 dní), čo samozrejme neumožňovalo adekvátnu kontrolu niektorých prebiehajúcich procesov. Naproti tomu sa meranie BSK pomocou biosenzorov skraca len na pár minút<sup>45</sup>. Keďže pri stanovení BSK ide o sledovanie širšej skupiny látok prevažne organickej povahy, tak sa na prípravu biosenzorov založených na Clarkovom kyslíkovom senzore používa častejšie viacero druhov mikroorganizmov súčasne kvôli schopnosti detekcie čo najširšej palety substrátov. Najčastejšie sú pritom používané bunky *Trichosporon cutaneum*<sup>46</sup>, *Bacillus subtilis*<sup>47</sup>, *Pseudomonas sp.*<sup>48,49</sup> ale aj zmesové kultúry získané z aktivovaných kalov<sup>50</sup>. Okrem živých buniek boli tiež úspešne pripravené aj senzory s použitím tepelne usmrtených buniek<sup>51,52</sup> s porovnateľnými výsledkami. Ďalej boli mikrobiálne senzory úspešne aplikované aj pri monitorovaní iných analytov.

Biosenzor postavený na báze buniek *Gluconobacter oxydans* bol použitý na stanovenie obsahu cukrov v lignocelulóзовých hydrolyzátoch<sup>53</sup>. Na optickom princípe detekcie bol pripravený senzor na detekciu organofosfátových pesticídov s použitím buniek *Flavobacterium sp.*, ktoré boli uchytené na filtri zo sklenených vlákien a spojené s miniatúrnym spektrofotometrom pomocou optického vlákna<sup>54</sup>.

Dôležitým obmedzením masového používania biosenzorov pri monitorovaní rozličných biotechnologických procesoch je ich nízka tepelná a operačná stabilita. Dlhodobá stabilita imobilizovaného biokomponenta má mnoho spoločného aj so stabilitou konformácie imobilizačnej matrice alebo s jej denaturáciou počas prevádzky a skladovania, hoci vplyv môžu mať aj iné slabšie interakcie. Z tohto dôvodu je zaujímavou výzvou pri vytváraní imobilizačného materiálu hľadanie vhodných aditív, ktoré by obmedzili proces zmenšovania pórov. Jedným s takýchto aditív je napríklad hydroxyetylkarboxymetyl celulóзовý polymér používaný pri vytváraní hybridného organicko-anorganického silikátového gélu<sup>55</sup>. Príklady úspešnej aplikácie biosenzorov pri monitorovaní rôznych analytov sú prehľadne zosumarizované v tabuľke I.

## 6. Záver

Možnosť aktívneho riadenia a udržiavania fermentačných procesov na úrovni maximálnej produktivity je veľmi úzko spätá s efektívnym monitorovaním ich priebehu. Dôležité je pritom, aby namerané údaje boli získané v čo najkratšom časovom horizonte po odbere vzorky, pretože len v takom prípade majú relevantnú výpovednú hodnotu o momentálnom stave celého systému. Ideálnym riešením eliminácie časového oneskorenia výsledkov analýz vzoriek získavaných klasickou „off-line“ cestou je aplikácia „on-line“ monitorovania, resp. jeho modifikácií. Podstatou „on-line“ monitorovania je najčastejšie použitie prietokových techník odberu vzorky, jej reprodukovateľnej úpravy a tiež samotnej analýzy spojenej podľa možností v jednom prúde tesne za sebou. Pri odbere vzorky je dôležitá dôkladná separácia biomasy ako i enzýmových aktivít zapríčínujúcich skreslenie nameraných výsledkov. Pri samotnej analýze by mali byť pritom používané čo najselektívnejšie detekčné systémy, aby bolo možné sledovať potrebné analyty aj bez použitia ďalších separačných techník predlžujúcich dobu stanovenia. V úlohe špecifických detektorov sa stále častejšie používajú biosenzory, pre ktoré nie je potrebná prakticky žiadna predúprava prúdu analyzovanej vzorky okrem riedenia.

*Podakovanie patrí Vedeckej grantovej agentúre MŠ SR a SAV za podporu riešenia projektov VEGA 1/4299/07 a 1/4452/07, a tiež agentúre APVV za podporu projektu VMSP-P-0052-07.*

## LITERATÚRA

1. Dochain D., Perier M.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 56, 147 (1997).
2. Montague G.: *Monitoring and Control of Fermenters*, 51. IchemE, UK 1995.
3. Vallejo L. F., Brokelmann M., Marten S., Trappe S., Cabrera-Crespo J., Hoffmann A., Gross G., Weich H. A., Rinas U.: *J. Biotechnol.* 94, 185 (2002).
4. Veal D. A., Deere D., Ferrari B., Piper J., Attfield P. V.: *J. Immun. Meth.* 243, 191 (2000).
5. Upadhyay P., Patra A. K., Mukhopadhyay R., Panda A. K.: *Biotechnol. Lett.* 23, 839 (2001).
6. Mulchandani A., Bassi A. S.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 15, 105 (1995).
7. Clark L. C., Lyons C.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102, 29 (1962).
8. Clark L. C.: *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 2, 41 (1956).
9. Schügerl K.: *J. Biotechnol.* 85, 149 (2001).
10. Baxter P. J., Christian G. D., Růžička J.: *Chem. Anal.* 40, 455 (1995).
11. Hakanson H., Nilsson M., Mattiason B.: *Anal. Chim. Acta* 249, 61 (1991).
12. Larsson G., Tornkvist M.: *J. Biotechnol.* 49, 69 (1996).
13. Vaidyanathan S., Macoloney G., Vaughan J., McNeil B., Harvey L. M.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 19, 277 (1999).
14. Moscone D.: *Compr. Anal. Chem.* 44, 579 (2005).
15. Petrou P. S., Moser I., Jobst G.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 613 (2003).
16. Gáspár S., Wang X., Suzuki H., Csöregi E.: *Anal. Chim. Acta* 525, 75 (2004).
17. Niculescu M., Erichsen T., Sukharev V., Kerényi Z., Csöregi E., Schuhmann W.: *Anal. Chim. Acta* 463, 39 (2002).
18. Buttler T., Johansson K., Gorton L., Marko-Varga G.: *Anal. Chem.* 65, 2628 (1993).
19. Turner C., Thornhill N. F., Fish N. M.: *Biotechnol. Tech.* 7, 19 (1993).
20. Arnold S. A., Gaensakoo R., Harvey L. M., McNeil B.: *Biotechnol. Bioeng.* 80, 405 (2002).
21. Růžička J., Hansen E. H.: *Anal. Chim. Acta* 99, 37 (1978).
22. Kornmann H., Valentinotti S., Duboc P., Marison I., von Stockar U.: *J. Biotechnol.* 113, 231 (2004).
23. Alves E. R., Fortes P. R., Borges E. P., Zagatto E. A. G.: *Anal. Chim. Acta* 564, 231 (2006).
24. Li H. Q., Jiku F., Schröder H. F.: *J. Chromatogr., A* 889, 155 (2000).
25. Coly A., Aaron J.-J.: *Anal. Chim. Acta* 392, 255 (1999).
26. Karmarkar S. V.: *J. Chromatogr., A* 850, 303 (1999).
27. Paseková H., Polášek M., Solich P.: *Chem. Listy* 93, 354 (1999).
28. Economou A., Panoutsou P., Themelis D. G.: *Anal. Chim. Acta* 572, 140 (2006).



29. Luca G. C., Reis B. F.: *Spectrochim. Acta, Part A* 60, 579 (2004).
30. Sakai T., Piao S., Teshima N., Kuroishi T., Grudpan K.: *Talanta* 63, 893 (2004).
31. Gálvez A. M., Mateo J. V. G., Calatayud J. M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, 535 (2002).
32. Růžička J., Hansen E.: *Trends Anal. Chem.* 17, 69 (1998).
33. McCreedy T.: *Trends Anal. Chem.* 19, 396 (2000).
34. Cheng J.-Y., Wei C.-W., Hsu K.-H., Young T.-H.: *Sens. Actuators, B* 99, 186 (2004).
35. Greenwood P. A., Greenway G. M.: *Trends Anal. Chem.* 21, 726 (2002).
36. Culbertson C. T., Ramsey R. S., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* 72, 2285 (2000).
37. Zhang Q., Xu J.-J., Chen H.-Y.: *J. Chromatogr., A* 1135, 122 (2006).
38. Sethi S. R.: *Biosens. Bioelectron.* 9, 243 (1994).
39. Niculescu M., Mieliauskiene R., Laurinavicius V., Csöregi E.: *Food Chem.* 82, 481 (2003).
40. Wcislo M., Compagnone D., Trojanowicz M.: *Bioelectrochemistry* 71, 91 (2007).
41. Štefuca V., Voštiar I., Šefčovičová J., Katrlík J., Mastihuba V., Greifová M., Gemeiner P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 1170 (2006).
42. Mieliauskiene R., Nistor M., Laurinavicius V., Csöregi E.: *Sens. Actuators, B* 113, 671 (2006).
43. Esti M., Volpe G., Micheli L., Delibato E., Compagnone D., Moscone D., Palleschi G.: *Anal. Chim. Acta* 513, 357 (2004).
44. Liu J., Mattiasson B.: *Water Res.* 36, 3786 (2002).
45. Rastogi S., Rathee P., Saxena T. K., Mehra N. K., Kumar R.: *Curr. Appl. Phys.* 3, 191 (2003).
46. Jia J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 1023 (2003).
47. Qian Z., Tan T. C.: *Water Res.* 33, 2923 (1999).
48. Yoshida N., Hoashi J., Morita T., McNiven S. J., Nakanura H., Karube I.: *J. Biotechnol.* 88, 269 (2001).
49. Chee G.-J., Nomura Y., Ikebukuro K., Karube I.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 67 (2005).
50. Liu J., Olsson G., Mattiasson B.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 562 (2004).
51. Qian Z., Tan T. C.: *Water Res.* 32, 801 (1998).
52. Tan T. C., Lim E. W. C.: *Sens. Actuators, B* 107, 546 (2005).
53. Tkáč J., Gemeiner P., Švitel J., Benikovský T., Šturdík E., Vala V., Petruš L., Hrabárová E.: *Anal. Chim. Acta* 420, 1 (2000).
54. Kumar J., Jha S. K., D'Souza S. F.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 2100 (2006).
55. Xiao W. J., Choi M. M. F.: *Anal. Chim. Acta* 514, 219 (2004).

**M. Valach<sup>a</sup> and E. Šturdík<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava* <sup>b</sup>*Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Application of Biosensors in Monitoring Fermentation Processes**

The article is focused on principal aspects of monitoring fermentation processes. Problems of sampling associated with the separation of biomass are explained mainly on the basis of various types of filtration and flow dialysis methods. The analytical flow methods FIA and SIA are briefly described with respect to their use in on-line monitoring. Some applications of biosensors in practical measurements are presented.

## CENA MERCK

### 12. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu firmy Merck 2009“

Ve úterý 3. února 2009 úspěšně proběhl v nových krásných prostorách Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice již 12. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck“. Tuto soutěž letos výborně zorganizovali kolegové z Katedry analytické chemie FChT Univerzity Pardubice ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické za tradiční a účinné podpory firmy Merck, s.r.o. Význam této akce podtrhlo i její slavnostní zahájení děkanem FChT panem prof. Ing. Petrem Lošťákem, DrSc. 18 účastníků ze 7 předních analytických pracovišť v České republice dokázalo, že kvalita vědecko-výzkumné práce v oblasti analytické chemie má v naší republice bezesporu vzrůstající trend a že stejný potěšitelný trend má i schopnost mladých vědeckých pracovníků z této oblasti prezentovat své poznatky na úrovni snesoucí mezinárodní srovnání. Všechny přednesené příspěvky byly rozhodně důstojnou reprezentací jak přednášejících, tak i vysílajících pracovišť a autor tohoto příspěvku s potěšením využívá této možnosti, aby všem soutěžícím bez rozdílu poděkoval za odvedenou práci, za kterou se rozhodně nemusí stydět.

1. místo získala Pavlína Novotná z Ústavu analytické chemie Fakulty chemicko-inženýrské, VŠCHT v Praze za práci „Konformační studie poly-gama-benzyl-L-glutamátu metodou vibračního cirkulárního dichroismu“. 2. místo získala Veronika Mlejová z Katedry analytické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice za práci „Aplikace vybraných mikroextrakčních technik při stanovení rostlinných silic“ a 3. místo získal Dalibor Hůska z Ústavu chemie a biochemie Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně za práci „Plně automatizovaná izolace celkové mRNA z *in vitro* kultivovaných rostlin ve spojení s elektrochemickou detekcí“.

Fotografie z celého průběhu soutěže, výsledky a další informace je možné najít na internetových stránkách <http://kalch.upce.cz/merck09/index.htm>. Zde je jistě namístě poděkovat celému týmu kolegů z Univerzity Pardubice,



Foto: Vítězové soutěže „O cenu firmy Merck 2009“ zleva: prof. RNDr. J. Barek, CSc., předseda odborné skupiny analytické chemie České společnosti chemické, manažerka prodejního týmu firmy Merck paní Ing. Lenka Ungrmanová, Bc., Dalibor Hůska (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně), Veronika Mlejová (Univerzita Pardubice), Pavlína Novotná (VŠCHT v Praze) a doc. Ing. Karel Ventura, CSc., předseda organizačního výboru letošní soutěže.

jmenovitě doc. Ing. Karlovi Venturovi, CSc., Ing. Martinu Adamovi, Ph.D., Ing. Petrovi Česlovi, Ph.D., Ing. Ivě Ulbrichové, CSc. a Ing. Bohuslavu Dvořákovi za dokonalé organizační zabezpečení celé akce a za vytvoření neobyčejně příjemné a přátelské atmosféry, která vyvrcholila kulinářskými hody v Mexické restauraci. Děk všem účastníkům patří pochopitelně i firmě Merck a jejím zástupcům přítomným na soutěži, jmenovitě paní Ing. Lence Ungrmanové, Bc., manažerce prodejního týmu a paní Ing. Marcelce Kubáskové, oblastní zástupkyni firmy Merck.

Na závěr nezbývá než sdělit, že 13. ročník této soutěže se uskuteční na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v únoru 2010 a můžeme se tedy těšit na další setkání v Českých Budějovicích.

Jiří Barek

# VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ ACIFLUORFENU, NITROFENU A OXYFLUORFENU NA STŘÍBRNÉ TUHÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ A UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODĚ

VÍT NOVOTNÝ a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
novotny1@natur.cuni.cz

Došlo 24.11.08, přijato 12.12.08.

Klíčová slova: acifluorfen, nitrofen, oxyfluorfen, voltametrie, stříbrná amalgámová elektroda, uhlíková pastová elektroda

## Úvod

Nitrované difenylethery jsou důležitou a široce používanou skupinou herbicidů. Jsou intenzivně používány na ochranu mnoha plodin před pleveľy<sup>1–6</sup>. Jedná se o inhibitory protoporphyrinogenoxidas<sup>7–9</sup>. Jako většina ostatních agrochemikálií však mají nežádoucí účinky na zdraví člověka a kvalitu životního prostředí. Zkoumané látky jsou vysoce toxické pro vodní studenokrevné organismy<sup>10</sup>, zvláště bezobratlé. Pro člověka představují riziko zejména pro svou genotoxicitu<sup>11–15</sup>. Současný stav poznání neumožňuje odhadnout neškodnou koncentraci genotoxických látek<sup>16</sup>, a proto je žádoucí vyvinout metody pro sledování genotoxických látek v životním prostředí v co nejnižších koncentracích. Vzhledem ke snadné elektrochemické redukovatelnosti zkoumaných herbicidů již byly vypracovány metody pro polarografické stanovení těchto látek<sup>17,18</sup>. Rovněž bylo studováno jejich elektrochemické chování pomocí cyklické voltametrie na elektrodě ze skelného uhlíku, a to ve vodném i nevodném prostředí<sup>19</sup>. Stanovení těchto látek na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě či uhlíkové pastové elektrodě dosud nebyla věnována pozornost. Cílem této práce proto bylo ověřit použitelnost diferenční pulsní voltametrie (DPV) na meniskem modifikované tuhé stříbrné amalgámové elektrodě (m-AgSAE) a uhlíkové pastové elektrodě (CPE) pro stanovení zkoumaných herbicidů s cílem dosáhnout co nejnižší meze detekce. Použitelnost CPE byla v této práci z časových důvodů testována pouze na acifluorfenu, její testování na dalších studovaných herbicidech bude následovat.

## Experimentální část

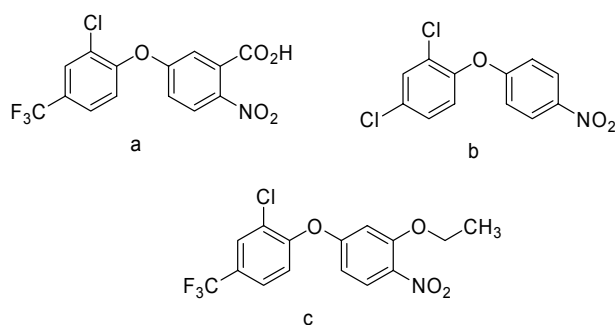
### Reagencie

Zásobní roztok oxyfluorfenu (OF, 2-chlor-1-(3-ethoxy-4-nitrofenoxy)-4-(trifluormethyl)-benzen, CAS Reg. č. 50594-66-6, viz obr. 1a) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> byl připraven rozpuštěním 0,0362 g této látky (99%, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Německo) ve 100 mL methanolu. Roztoky o nižších koncentracích byly připraveny přesným ředěním zásobního roztoku methanolem.

Zásobní roztok acifluorfenu (AF, 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)fenoxy]-2-nitrobenzoová kyselina, CAS Reg. č. 50594-66-6, viz obr. 1b) o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> byl připraven rozpuštěním 0,0182 g této látky (99%, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Německo) ve 250 mL vody. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku vodou.

Zásobní roztok nitrofenu (NF, 2,4-dichlorfenyl-4-nitrofenylether, CAS Reg. č. 1836-75-5, viz obr. 1c) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> byl připraven rozpuštěním 0,0284 g této látky (99%, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Německo) ve 100 mL methanolu. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě v chladničce.

Další použité chemikálie (kyselina boritá, octová kyselina (99%), kyselina fosforečná (85%), hydroxid sodný, chlorid draselný, methanol, vše p. a.) byly získány od Lachema Brno, ČR. Brittonovy – Robinsonovy (BR) pufrů o požadovaném pH byly připraveny smísením 0,2 M-NaOH s roztokem obsahujícím 0,04 mol L<sup>-1</sup> kyselinu boritou, fosforečnou a octovou. Hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 3510 (Jenway, Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005) kalibrovanou standardními vodnými roztoky



Obr. 1. Strukturní vzorce acifluorfenu (a), nitrofenu (b) a oxyfluorfenu (c)

\* Vít Novotný získal 1. cenu v soutěži O cenu firmy Merck 2008 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

pufří. V případě vodně-methanolických roztoků se tudíž jedná pouze o orientační hodnoty. Pro přípravu vodných roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore, USA). Používané roztoky byly uchovávány v chladničce ve skleněných nádobách.

#### Aparatura

Při všech voltametrických technikách byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 4.0 (obojí Polaro-Sensors, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows 98 (Microsoft Corp.). Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení s referenční argentochloridovou elektrodou (1 M-KCl) typu RAE 113 (Monokrystaly, Turnov) a platinovou drátkovou pomocnou elektrodou. Při elektrochemické redukci acifluorfeny, nitrofeny a oxyfluorfeny byla jako pracovní elektroda používána m-AgSAE. Pro srovnání byla ke stanovení acifluorfeny rovněž použita CPE.

m-AgSAE je elektroda tvořená sloupcem amalgamu připraveného z práškového stříbra uzavřeného ve skleněné trubičce, který je na povrchu elektrody smočen meniskem rtuť. Byla vyvinuta pro použití při moderních voltametrických metodách, zejména tam, kde použití kapalné rtuťi zakazují právní úpravy. Jejimi výhodami jsou mechanická robustnost umožňující její použití v průtokových systémech či terénních měřeních, dlouhá životnost a nízká cena. Oproti rtuťové kapající elektrodě poskytuje poněkud vyšší meze detekce a často dochází k její pasivaci. Reprodukovatelnost měření se však dá velmi snadno udržet jednoduchým a technicky snadno realizovatelným elektrochemickým obnovováním povrchu elektrody. V této práci byla použita m-AgSAE od firmy Polaro Sensors, Praha. Elektrochemická příprava elektrody byla prováděna podle postupu uvedeného v práci<sup>20</sup>. Tento postup zahrnoval následující operace:

Amalgamace – ponořením elektrody do malé nádoby se rtuťí asi na 15 s se obnovil meniskus elektrody. Amalgamace byla prováděna každý týden, v případě zhoršeného chování elektrody, které nebylo možno jiným způsobem odstranit, i dříve.

Elektrochemická aktivace v roztoku 0,2 M-KCl vložením potenciálu  $-2200$  mV na elektrodu za míchání po dobu 5 min. Aktivace byla prováděna po amalgamacii a při přerušení práce s elektrodou delším než jedna hodina.

Regenerace, prováděná před každým změřením voltamogramu, spočívala ve střídavém vkládání potenciálu  $E_{in, reg}$  a potenciálu  $E_{fin, reg}$ . Experimentálně nalezené a ověřené hodnoty těchto potenciálů pro jednotlivé látky a pH jsou uvedeny v tabulce I. Potenciál byl vkládán ve 300 pulsech trvajících 50 ms.

Voltametrické stanovení acifluorfeny bylo pro srovnání provedeno rovněž na uhlíkové pastové elektrodě. Tato elektroda je tvořena směsí uhlíku a pastovací kapaliny. Při přípravě CPE jsou široké možnosti použití různých forem uhlíku a různých pastovacích kapalin. V tomto případě bylo použito směsi 250 mg mikrokuliček ze skelného uhlíku o průměru 0,4–12  $\mu\text{m}$  (Alpha Aesar, USA) a 100  $\mu\text{L}$  minerálního oleje (Fluka Biochemika, Švýcarsko). Mezi hlavní výhody pastových elektrod patří velice snadná regenerace pasivovaného povrchu elektrody prostým vytlačení částí pasty a ořetením o filtrační papír. Dalšími výhodami jsou jednoduchá robustní konstrukce a snadná možnost chemické či biologické modifikace elektrody<sup>21</sup>.

#### Pracovní postupy

Při měření voltametrických křivek bylo v případě nitrofeny a oxyfluorfeny postupováno, pokud není uvedeno jinak, následujícím způsobem: do odměrné baňky

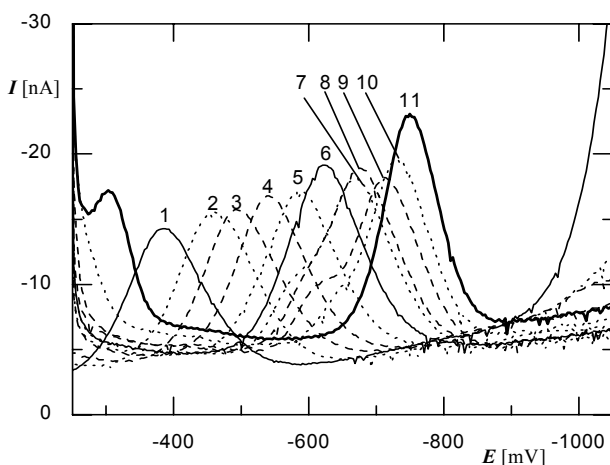
Tabulka I

Použité hodnoty regeneračních potenciálů [mV] pro jednotlivé látky a pH

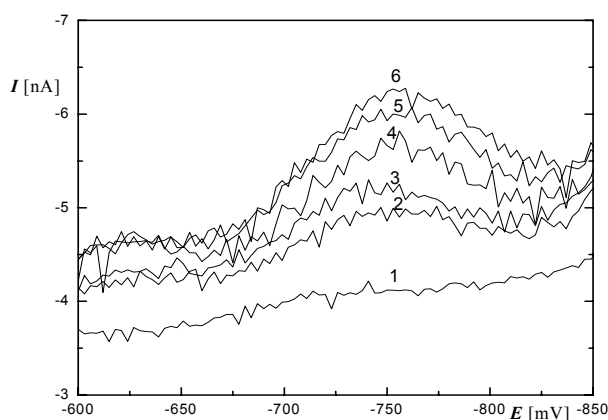
pH	Acifluorfen		Oxyfluorfen		Nitrofen	
	$E_{in, reg}$	$E_{fin, reg}$	$E_{in, reg}$	$E_{fin, reg}$	$E_{in, reg}$	$E_{fin, reg}$
2	200	-500	-150	-1000	100	-900
3	-100	-1000	-150	-1000	0	-900
4	-100	-1000	-150	-1200	0	-900
5	-100	-1100	-150	-1200	0	-1000
6	-100	-1100	-150	-1200	0	-1000
7	-200	-1100	-150	-1250	-100	-1000
8	-300	-1200	-300	-1350	-100	-1000
9	-300	-1200	-300	-1350	-100	-1000
10	-300	-1200	-300	-1350	-200	-1100
11	-300	-1200	-300	-1350	-200	-1200
12	-300	-1200	-300	-1500	-200	-1200

o objemu 10 mL bylo odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku zkoumané látky v methanolu, přidán methanol do celkového objemu 5 mL a nakonec byl roztok doplněn BR pufrům o příslušném pH po značku. Takto připravený roztok byl po promíchání převeden do polarografické nádoby, zbaven kyslíku pětiminutovým probubláním dusíkem a poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs vody a methanolu ve stejném poměru jako analyzovaný roztok, tj. 1:1. Všechny křivky byly měřeny třikrát. V případě acifluorfeny bylo do odměrné baňky o objemu 10 mL odpipetováno příslušné množství zásobního vodného roztoku zkoumané látky

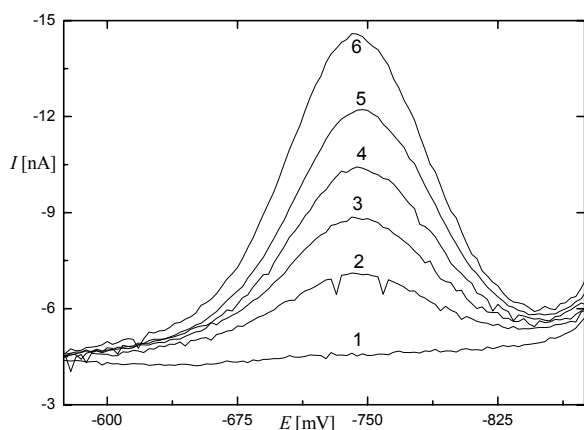
a doplněno roztokem BR pufru o příslušném pH po rýsku. Při měření voltamogramů acifluorfeny na CPE bylo bubláno 10 min dusíkem, čímž došlo k dokonalému odstranění kyslíku z roztoku. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. Při DPV na m-AgSAE i CPE byly na elektrody vkládány pulsy o šířce 80 ms a modulační amplitudě  $-50$  mV, byla použita rychlost polarizace  $20$  mV  $s^{-1}$ . Mez stanovitelnosti ( $L_D$ ) byla počítána podle vzorce  $L_D = 3s/a$ , kde  $s$  je směrodatná odchylka signálu pro 10 paralelních stanovení sledované látky při koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu kalibrační závislosti a  $a$  je směrnice kalibrační přímky v nejnižším koncentračním rozmezí<sup>22</sup>.



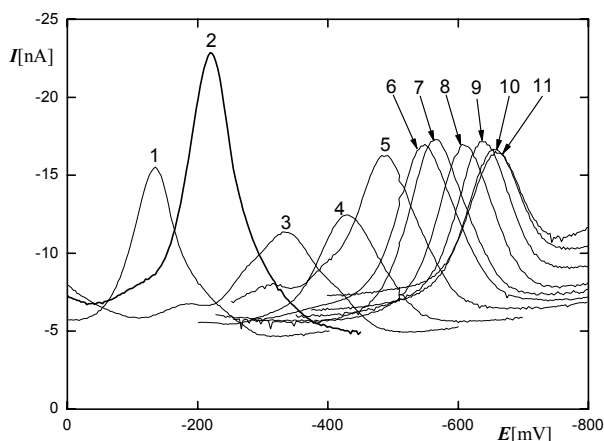
Obr. 2. DP voltamogramy oxyfluorfeny ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ ) na m-AgSAE v prostředí BR pufru – methanol (1:1); pH BR pufru: 2,0 (1), 3,0 (2), 4,0 (3), 5,0 (4), 6,0 (5), 7,0 (6), 8,0 (7), 9,0 (8), 10,0 (9), 11,0 (10), 12,0 (11)



Obr. 4. DP voltamogramy oxyfluorfeny na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 12 – methanol (1:1);  $c(\text{OF}) = 0$  (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $1 \cdot 10^{-6}$  (6) mol  $L^{-1}$



Obr. 3. DP voltamogramy oxyfluorfeny na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 12 – methanol (1:1);  $c(\text{OF}) = 0$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5),  $1 \cdot 10^{-5}$  (6) mol  $L^{-1}$



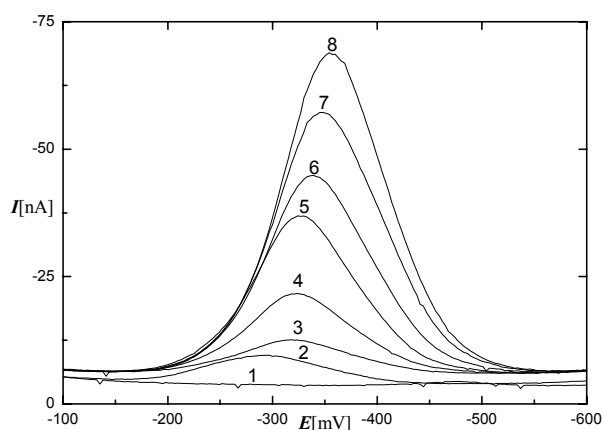
Obr. 5. DP voltamogramy nitrofeny ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ ) na m-AgSAE v prostředí BR pufru – methanol (1:1); pH BR pufru: 2,0 (1), 3,0 (2), 4,0 (3), 5,0 (4), 6,0 (5), 7,0 (6), 8,0 (7), 9,0 (8), 10,0 (9), 11,0 (10), 12,0 (11)

## Výsledky a diskuse

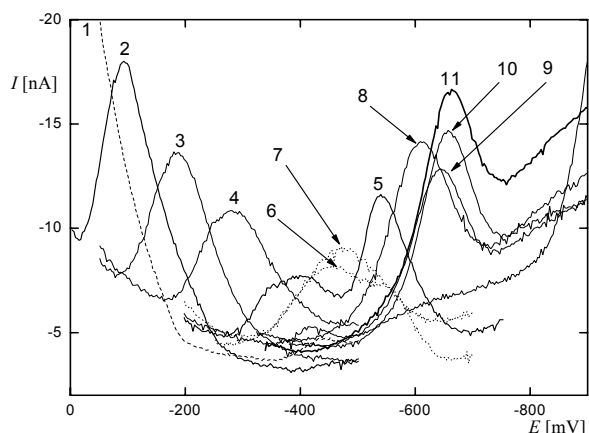
Vliv pH na chování oxyfluorfenu ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) při DP voltametrii na m-AgSAE byl studován ve směsi methanolu a BR pufru v poměru 1:1 v rozmezí pH použitého BR pufru 2–12. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje obr. 2. Látka poskytuje v celém rozsahu pH jeden pík, v rozmezí pH 8–12 je patrný náznak druhého píku. Potenciál píku s klesajícím pH roste, proud píku s rostoucím pH vzrůstá. Nejlépe vyhodnotitelné voltamogramy byly získány v roztoku, který obsahoval BR pufr o pH 12 a methanol (1:1). Koncentrační závislosti byly

v tomto prostředí změřeny v rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (obr. 3) a  $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (obr. 4). Pro koncentraci nižší než  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  již nebylo možno získané voltamogramy vyhodnotit. Parametry získaných koncentračních závislostí jsou uvedeny v tabulce II.

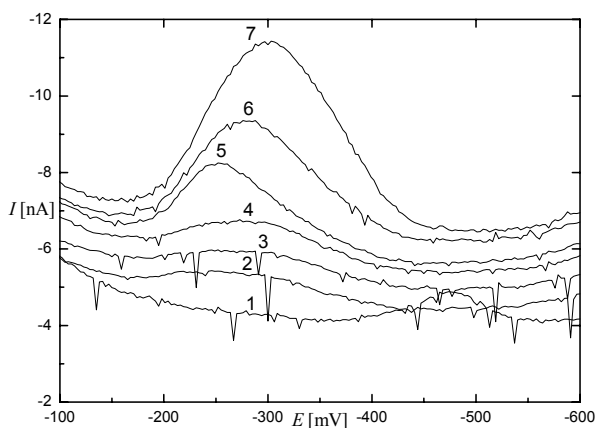
Vliv pH na chování nitrofluorfenu ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) při DPV na AgSAE byl studován v základním elektrolytu tvořeném směsí methanolu a BR pufru v poměru 1:1 v rozmezí pH použitého BR pufru 2–12. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje obr. 5. Látka poskytuje v celém rozsahu pH pouze jeden pík. Potenciál píku se se stoupajícím pH posouvá k negativnějším hodnotám.



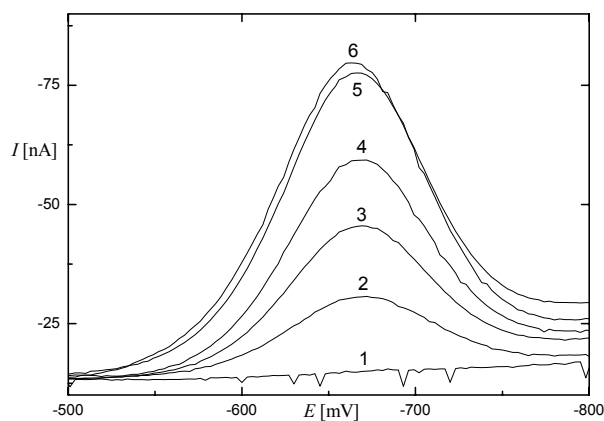
Obr. 6. DP voltamogramy nitrofluorfenu na m-AgSAE v prostředí BR pufru pH 3 – methanol (1:1);  $c(\text{NF}) = 0$  (1),  $8 \cdot 10^{-6}$  (2),  $1 \cdot 10^{-5}$  (3),  $2 \cdot 10^{-5}$  (4),  $4 \cdot 10^{-5}$  (5),  $6 \cdot 10^{-5}$  (6),  $8 \cdot 10^{-5}$  (7),  $1 \cdot 10^{-4}$  (8)  $\text{mol L}^{-1}$



Obr. 8. DP voltamogramy acifluorfenu ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH: 2,0 (1), 3,0 (2), 4,0 (3), 5,0 (4), 6,0 (5), 7,0 (6), 8,0 (7), 9,0 (8), 10,0 (9), 11,0 (10), 12,0 (11)



Obr. 7. DP voltamogramy nitrofluorfenu v prostředí BR pufru o pH 3 – methanol (1:1) na m-AgSAE;  $c(\text{NF}) = 0$  (1),  $6 \cdot 10^{-7}$  (2),  $8 \cdot 10^{-7}$  (3),  $1 \cdot 10^{-6}$  (4),  $2 \cdot 10^{-6}$  (5),  $4 \cdot 10^{-6}$  (6),  $6 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol L}^{-1}$



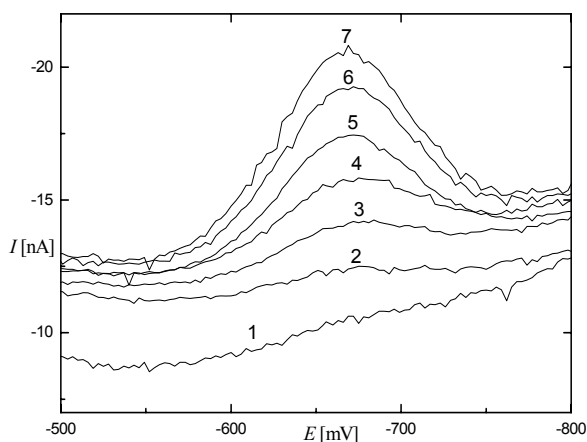
Obr. 9. DP voltamogramy acifluorfenu na m-AgSAE v BR pufru o pH 12;  $c(\text{AF}) = 0$  (1),  $2 \cdot 10^{-5}$  (2),  $4 \cdot 10^{-5}$  (3),  $6 \cdot 10^{-5}$  (4),  $8 \cdot 10^{-5}$  (5),  $1 \cdot 10^{-4}$  (6)  $\text{mol L}^{-1}$

Nejvyšší proud píku a nejlépe vyhodnotitelné voltamogramy byly získány v roztoku, který obsahoval BR pufr o pH 3 a methanol (1:1). Koncentrační závislosti byly v tomto prostředí proměřeny v rozmezí  $8 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (obr. 6) a  $6 \cdot 10^{-7}$ – $6 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (obr. 7). Pro koncentraci nižší než  $6 \cdot 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> již nebylo možno získané voltamogramy vyhodnotit. V tabulce II jsou uvedeny charakteristiky kalibrační závislosti a dosažená mez detekce.

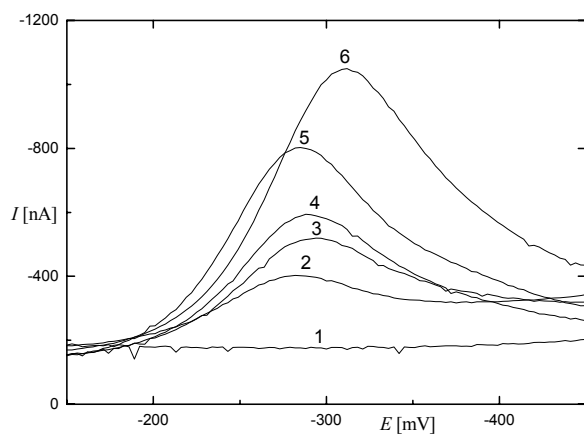
Vliv pH na chování acifluorfenu ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) při DP voltimetrii na AgSAE byl studován v BR pufru při pH 2–12 (viz obr. 8). Acifluorfen poskytuje v celém rozsahu pH jeden dobře vyvinutý pík, jehož výška poněkud závisí na pH. Při určitých pH je patrný ještě další, špatně

vyvinutý a analyticky nevyužitelný pík. Koncentrační závislosti byly proměřeny při použití pufru o pH 12 v rozmezí  $2 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (obr. 9) a  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (obr. 10). Ve vyšším koncentračním rozmezí je patrná nelinearita kalibrační závislosti. Pro koncentraci nižší než  $1 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> již nebylo možné získané voltamogramy vyhodnotit. Dosažená hodnota  $L_D$   $3 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (uvedeno v tab. II) je zřetelně vyšší než pro zbylé dvě látky na této elektrodě, zřejmě v důsledku přítomnosti disociovatelné karboxylové skupiny.

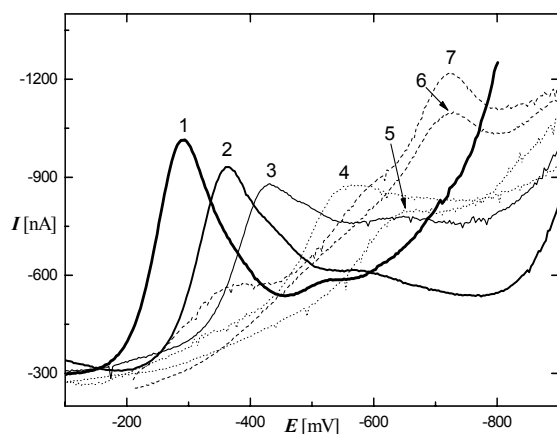
Vliv pH na chování acifluorfenu ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) při DPV na CPE byl studován v BR pufru o pH 2–12 (viz obr. 11). Látka poskytuje v celém rozsahu pH jeden dobře



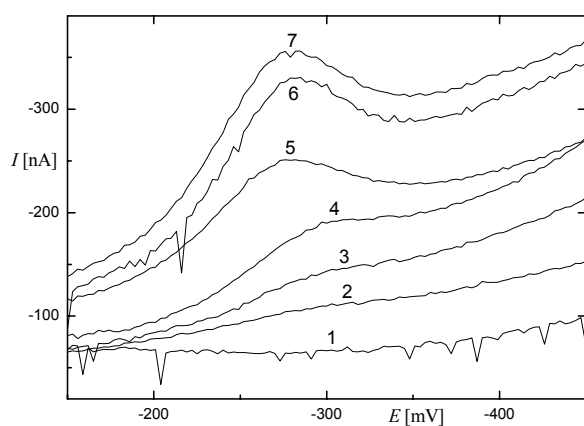
Obr. 10. DP voltamogramy acifluorfenu na m-AgSAE v BR pufru o pH 12;  $c(\text{AF}) = 0$  (1),  $1 \cdot 10^{-6}$  (2),  $2 \cdot 10^{-6}$  (3),  $4 \cdot 10^{-6}$  (4),  $6 \cdot 10^{-6}$  (5),  $8 \cdot 10^{-6}$  (6),  $1 \cdot 10^{-5}$  (7) mol L<sup>-1</sup>



Obr. 12. DP voltamogramy acifluorfenu na CPE v BR pufru o pH 2;  $c(\text{AF}) = 0$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5),  $1 \cdot 10^{-5}$  (6) mol L<sup>-1</sup>



Obr. 11. DP voltamogramy acifluorfenu ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) na CPE. Měřeno v BR pufru, pH: 2,0 (1), 3,0 (2), 4,0 (3), 5,0 (4), 6,0 (5), 9,0 (6), 12,0 (7)



Obr. 13. DP voltamogramy acifluorfenu na CPE v roztoku BR pufru o pH 2;  $c(\text{AF}) = 0$  (1),  $1 \cdot 10^{-7}$  (2),  $2 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $6 \cdot 10^{-7}$  (5),  $8 \cdot 10^{-7}$  (6),  $1 \cdot 10^{-6}$  (7) mol L<sup>-1</sup>

Tabulka II

Parametry kalibračních závislostí pro voltmetrické stanovení studovaných látek ve sledovaném koncentračním rozmezí

Látka/elektroda	$c$ [mol L <sup>-1</sup> ]	Směrnice [nA L mol <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	Směrodatná odchylka [nA]	Korelační koeficient	$L_D$ [mol L <sup>-1</sup> ]
Acifluorfen/m-AgSAE	$1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$-6,7 \cdot 10^5$	0,23 <sup>a</sup>	0,7	-0,9978	$3 \cdot 10^{-6}$
Acifluorfen/CPE	$1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$	$-1,1 \cdot 10^8$	11,1 <sup>a</sup>	16	-0,9577	$5 \cdot 10^{-7}$
Nitrofen/m-AgSAE	$6 \cdot 10^{-7}$ – $6 \cdot 10^{-6}$	$-7,1 \cdot 10^5$	-0,40 <sup>a</sup>	0,2	-0,9667	$9 \cdot 10^{-7}$
Oxyfluorfen/m-AgSAE	$2 \cdot 10^{-7}$ – $10 \cdot 10^{-7}$	$-9,5 \cdot 10^5$	-0,40 <sup>b</sup>	0,1	-0,9667	$3 \cdot 10^{-7}$

<sup>a</sup> t-Testem bylo potvrzeno, že na 95% hladině významnosti tento úsek není odlišný od nuly; <sup>b</sup> t-Testem bylo potvrzeno, že na 95% hladině významnosti je tento úsek odlišný od nuly

vyvinutý a analyticky využitelný pík, jehož výška klesá s rostoucím pH. Potenciál tohoto píku se s rostoucím pH posouvá k zápornějším hodnotám. Při pH 6 a vyšším se ani proud ani potenciál píku již prakticky nemění. Při určitých pH se objevuje ještě náznak dalšího, špatně vyvinutého a analyticky nevyužitelného píku při negativnějších potenciálech. Kalibrační závislosti byly proměřeny při pH 2 v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (obr. 12) a  $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (obr. 13). Pro koncentraci nižší než  $4 \cdot 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> již nebylo možno získané voltamogramy vyhodnotit. Při optimálním pH poskytuje acifluorfen v důsledku velké plochy elektrody na CPE vysokou hodnotu signálu, což umožňuje docílit nižší limit detekce než na m-AgSAE. Charakteristiky kalibrační závislosti a  $L_D$  jsou uvedeny v tab. II.

Z této tabulky je patrné, že ve všech případech jsou tyto závislosti ve sledovaném koncentračním rozmezí lineární. Protože cílem práce bylo stanovení co nejnižších koncentrací, nebyly tyto závislosti studovány ve vyšších koncentračních rozmezích, kde lze očekávat odchylky od linearity.

## Závěr

Byly nalezeny optimální podmínky pro DPV stanovení oxyfluorfenu na m-AgSAE (BR pufr pH 12 – methanol (1:1)) umožňující dosažení meze detekce  $3 \cdot 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Jako optimální pro DPV stanovení nitrofenu na m-AgSAE se ukázal základní elektrolyt o složení BR pufr pH 3: methanol (1:1) a v tomto prostředí bylo dosaženo meze detekce  $9 \cdot 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. DPV stanovení acifluorfenu na m-AgSAE při použití BR pufru pH 12 poskytuje mez detekce  $3 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Pro srovnání bylo rovněž prostudováno voltametrické chování acifluorfenu v prostředí BR pufru o pH 2–12 pomocí DPV na CPE. V prostředí BR pufru o pH 2 bylo dosaženo meze detekce  $5 \cdot 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Tato hodnota je téměř o řád nižší než pro DPV stanovení této látky na m-AgSAE, což zřejmě souvisí s větší plochou uhlíkové pastové elektrody. (Vypočtený poměr geometrických ploch m-AgSAE a CPE je přibližně 1:18). Svou roli

však může hrát i odlišný mechanismus elektrochemické redukce nitroskupiny na amalgamové a pastové elektrodě, který se odráží i v různém počtu pozorovaných píků a v nižší opakovatelnosti potenciálů píku na CPE. Tento mechanismus bude předmětem dalšího studia.

*Autoři děkují za finanční podporu MŠMT ČR (projekt LC06035 a MSM 021620857) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt 332/2005/B-CH/PřF a projekt 6107/2007/B-CH/PřF).*

## LITERATURA

- Zhang Z. P.: *Weed Biol. Management* 3, 197 (2003).
- South D. B., Gjerstad D. H.: *South. J. Appl. Forest.* 1, 36 (1980).
- Johnson W. O., Kollman G. E., Swithenbank C., Yih R. Y.: *J. Agric. Food Chem.* 26, 285 (1978).
- Colborn T., Short P.: *Toxicol. Ind. Health* 15, 241 (1999).
- Aspelin A. L.: *Pesticide Industry - Sales and Usage: 1994 and 1995 Market Estimates. Report no. 733-R-97-002.* United States Environmental Protection Agency, Washington DC 1997.
- Lee D., Oliver L. R.: *Weed Sci.* 30, 520 (1982).
- Lee H. J., Duke S. O.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 2610 (1994).
- Corradi H. R., Corrigall A. V., Boix E., Mohan C. G., Sturrock E. D., Meissner P. N., Acharya K. R.: *J. Biol. Chem.* 281, 38625 (2006).
- Matsumoto H., Lee J. J., Ishizuka K.: *Pest. Biochem. Physiol.* 47, 113 (1993).
- Banhawy M., Soliman F., Abdel-Rehim S., Hamada H.: *Proc. Egypt. Acad. Sci.* 46, 99 (1996).
- Hassanein H. M. A., Banhawy M. A., Soliman F. M., Abdel-Rehim S. A., Müller W. E. G., Schröder H. C.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 78 (1999).
- Kale P. G., Petty B. T., Walker S., Ford J. B., Dehkordi N., Tarasia S., Tasié B. O., Kale R., Sohni Y. R.: *Environ. Mol. Mutagen.* 25, 148 (1995).
- Environmental Protection Agency: *Federal Register* 50, 22202 (1992).



14. Ahrens W. H.: *Herbicide Handbook*, 7. vyd. Weed Science Society of America, Champagne, Illinois 1994.
15. Hurt S. S., Smith J. M., Hayes A. W.: *Toxicology* 29, 1 (1983).
16. Dybing E., Doeb J., Grotenc J., Kleiner J., O'Brien J., Renwick A. G., Schlatter J., Steinbergh P., Tritscheri A., Walkerj R., Younesk M.: *Food Chem. Toxicol.* 40, 237 (2002).
17. Rupp E., Zhong Q., Zuman P.: *Electroanalysis* 4, 11 (1992).
18. Rupp E., Zuman P., Šestáková I., Horák V.: *J. Agric. Food Chem.* 40, 2016 (1992).
19. Orr G. L., Elliott M., Hogan M. E.: *J. Agric. Food Chem.* 31, 1192 (1983).
20. Yosypchuk B.: *Disertační práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 2003.
21. Švancara I., Vtřas K., Barek J., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 311 (2001).
22. Hayashi Y., Matsuda R., Ito K., Nishimura W., Imai K., Maeda M.: *Anal. Sci.* 21, 167 (2005).

**V. Novotný and J. Barek** (*Charles University in Prague, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry*): **Voltammetric Determination of Acifluorphen, Nitrophen and Oxyfluorphen with Solid Silver Amalgam and Carbon Paste Electrodes**

Optimum conditions are described for the determination of micromolar and submicromolar concentrations of herbicides Acifluorphen, Oxyfluorphen and Nitrophen by differential pulse voltammetry (DPV) on non-toxic solid silver amalgam electrode with modified meniscus in Britton-Robinson buffers at different pH. The detection limits are in the range  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. DPV determination of Acifluorphen in BR buffer at pH 2 using a carbon paste electrode was developed with a detection limit of  $5 \cdot 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>.

## VÝVOJ NEINVAZIVNÍ DIAGNOSTIKY *Asthma bronchiale*

KAMILA SYSLOVÁ<sup>a\*</sup>, JAN PŘECH<sup>a</sup>,  
JINDŘIŠKA LEBEDOVÁ<sup>b</sup>, DANIELA  
PELCLOVÁ<sup>b</sup> a PETR KAČER<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup> Klinika nemocí z povolání, 1. lékařská fakulta, Universita Karlova, Na Bojišti 1, 120 00 Praha 2  
kamila.syslova@vscht.cz

Došlo 1.6.07, přepracováno 1.4.08, přijato 17.4.08.

Klíčová slova: *Asthma bronchiale*, cysteinylované leukotrieny, LC-MS, kondenzát vydechaného vzduchu, imunoseparace

### Úvod

*Asthma bronchiale* je civilizační onemocnění, jehož výskyt v moderní populaci neustále roste jako důsledek zvyšujícího se počtu alergenů v životním prostředí. Včasná diagnostika uvedeného onemocnění hraje důležitou roli z hlediska zahájení účinné terapie a minimalizace poškození pacienta. V současné době v praxi používané diagnostické metody spočívají v kombinaci invazivních (bronchiální biopsie<sup>1</sup>, bronchoalveolární laváž<sup>2</sup>) a semi-invazivních metod (metoda indukovaného sputa<sup>3</sup>), které jsou pro pacienta zatěžující a u některých pacientů, zejména dětí a seniorů, mohou být až stresovou záležitostí. Analýza dechového kondenzátu je poměrně novou metodou, jež představuje alternativní cestu, kterou lze charakterizovat jako zcela neinvazivní a pro pacienta nezatěžující. Kondenzát vydechaného vzduchu (KVV) je kapalnou matricí, která odráží složení bronchoalveolární extracelulární plicní tekutiny, jejíž složení koresponduje s ději odehrávajícími se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách. Látky obsažené ve vydechaném vzduchu se nacházejí ve dvou fázích – v plynné a v kapalné (ve formě aerosolů). V plynné fázi jsou vedle dusíku, kyslíku, oxidu uhličitého, oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého přítomny látky s dostatečnou tenzí par při tělesné teplotě a atmosférickém tlaku – voda, peroxid vodíku, uhlovodíky a řada dalších organických látek. Molekuly málo těkavých látek se do KVV dostávají jako aerosolové částice, které jsou strhávány z povrchu sliznice proudem vzduchu. Aerosolové části-

ce a látky těkavé při tělesné teplotě mohou být zkondenzovány při dýchání přes chladicí zařízení – kondenzátor vydechaného vzduchu, které je dostupné na specializovaných klinických pracovištích. Vzniklá kapalina je označována jako kondenzát vydechaného vzduchu a obsahuje celou řadu z medicínského hlediska zajímavých látek – eikosanoidy (metabolity kyseliny arachidonové), peptidy, enzymy, DNA ad., kterých bylo k dnešnímu dni identifikováno<sup>4</sup> více než 200. Některé z nich jsou považovány za citlivé biomarkery plicních onemocnění (leukotrien B<sub>4</sub> – LTB<sub>4</sub>, cysteinylované leukotrieny C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> a E<sub>4</sub> – LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, 8-isoprostan aj.). Na základě stanovení jejich obsahu v KVV lze posoudit typ probíhajícího patologického procesu, rozsah onemocnění, případně úspěšnost terapeutického postupu. V případě *Asthma bronchiale* představují skupinu biomarkerů obsažených v KVV cysteinylované leukotrieny (cys LTs), jejichž koncentrace je v důsledku probíhající alergické reakce v dýchacích cestách a plicích významně zvýšena. Jedná se o metabolity kyseliny arachidonové, která je obsažena v buněčných membránách jako součást membránových fosfolipidů<sup>5,6</sup>. Činností enzymu 5-lipoxygenasy se kyselina arachidonová přeměňuje na nestabilní epoxidový leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), který může být dále přeměňován podle jedné ze dvou možných enzymatických drah. Při zánětlivých procesech v organismu se působením LTA<sub>4</sub> hydrolasy syntetizuje ve zvýšeném množství leukotrien B<sub>4</sub>. Paralelní cestu pak představuje dráha, která je ve zvýšené míře preferována v průběhu alergických reakcí, kdy účinkem enzymu LTC<sub>4</sub> syntetasy vzniká první člen z rodiny cysLTs, a to leukotrien C<sub>4</sub>. K cysLTs dále řadíme leukotrien D<sub>4</sub> a leukotrien E<sub>4</sub>. Cys LTs se postupně přeměňují v řadě LTC<sub>4</sub> → LTD<sub>4</sub> → LTE<sub>4</sub> působením enzymů  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasy (LTC<sub>4</sub> → LTD<sub>4</sub>) a dipeptidasy (LTD<sub>4</sub> → LTE<sub>4</sub>)<sup>7</sup>.

V řadě prací bylo popsáno stanovení cys LTs v různých tělních tekutinách (krevní plasma, moč, likvor a KVV) s využitím rozdílných analytických metod, jako je RIA (Radioimmunoassay)<sup>8</sup>, EIA (Enzyme Immunoassay)<sup>9–12</sup>, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)<sup>13</sup>, případně GC-MS<sup>14,15</sup> nebo LC-MS. Biochemickými metodami lze stanovit řádově nižší koncentrace látek, než jakých je dnes dosahováno použitím hmotnostně-spektrometrických metod (GC-MS, LC-MS), nicméně meze detekce těchto instrumentálních metod se v průběhu posledního desetiletí dostaly na úroveň piko-, femto-, případně attomolů, což je plně postačující pro detekci většiny biologicky aktivních látek vyskytujících se v lidském organismu. Fyziologické koncentrace cys LTs v KVV se pohybují v rozmezí 1 až 200 pg ml<sup>-1</sup>. Spojení kapalinové, případně plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem poskytuje oproti biochemickým metodám nejenom kvantitativní informaci, ale rovněž i informaci strukturní (kvalitativní), která je při

\* Kamila Syslová získala s touto prací 1. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

využití MS<sup>n</sup> technik vysoce specifická. Tím jsou vyloučeny falešně pozitivní či negativní výsledky, které se v důsledku „zkřížených reakcí“ vyskytují u imunochemických nebo enzymatických metod. Nevýhodou techniky GC-MS je tepelný převod látky do plynné fáze, který u termolabilních látek komplikuje získání obou typů informace.

Předkládaná práce popisuje metodu kombinující specifickou separaci – imunoafinitní extrakci – s vysoce selektivní detekcí (LC-MS) při stanovení cys LTs v matrici KVV. Cys LTs jako biomarkery *Asthma bronchiale* stanovené uvedenou metodou mohou sloužit k diferenciální diagnostice uvedeného onemocnění, což nabízí alternativu k existujícím diagnostickým metodám. Vyvinutá metoda, respektující řadu omezení vyplývajících z nízké stability cys LTs, byla úspěšně testována v klinických studiích zabývajících se diagnostikou bronchiálního astmatu a posouzením změn koncentrací cys LTs v důsledku denního biorytmu organismu, případně monitorováním astmatické reakce při histaminovém testu.

## Experimentální část

### Chemikálie

Chemikálie byly komerčního původu: cysteinylované leukotrieny (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), [20, 20, 20 <sup>2</sup>H<sub>3</sub>] leukotrien E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>-d<sub>3</sub>) – (Biomol, Německo), afinitní sorbent pro cysteinylované leukotrieny – (Cayman chemicals, USA), acetonitril, voda, methanol, (čistota LC/MS) – (Riedel de Haën, Německo), kyselina mravenčí, triethylamin (p.a.) – (Aldrich, USA).

### Odběr dechového kondenzátu

KVV byl získáván prostřednictvím kondenzátoru vydechovaného vzduchu EcoScreen – (Jaeger, Německo) a byl shromažďován do polypropylenových sběrných nádobek (5 ml). Bezprostředně po odběru vzorku bylo do 1 ml KVV přidáno 250 pg LTE<sub>4</sub>-d<sub>3</sub>. Nepřítomnost slin v KVV se prokazovala testem na α-amylasu (aktivita < 0,1 %) pomocí soupravy Biolatest Kit – (Pliva-Lachema, Česká republika).

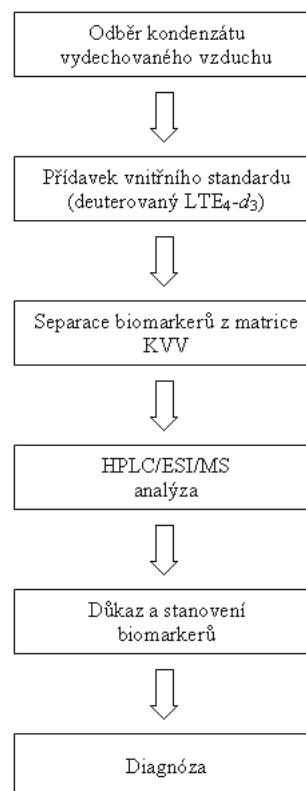
### Imunoafinitní separace

Imunoafinitní extrakce byla prováděna následujícím postupem: k 1 ml KVV označenému LTE<sub>4</sub>-d<sub>3</sub> bylo přidáno 50 μl afinitního sorbentu pro cys LTs. Suspenze byla míchána na třepače po dobu 60 min. Následně byl sorbent odstředěn (500 ot. min<sup>-1</sup>, 10 min) a promyt 2 × 1 ml deionizované vody. K promytému sorbentu byl přidán methanol (2 × 0,5 ml) a po pětiminutovém protřepání byl sorbent odstředěn při 2500 ot. min<sup>-1</sup>. Z methanolických podílů byl odpařen methanol proudem dusíku. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn v 50 μl mobilní fáze a podroben LC-ESI-MS analýze.

LC-ESI-MS byla realizována v systému vybaveném dvěma vysokotlakými pumpami Varian ProStar 210 (Varian, USA), autosamplerem Varian 410 (Varian, USA). Chromatografické dělení vzorku (nastříkované množství 20 μl) bylo realizováno na koloně Hypercarb Thermo (Thermo, USA) 100 × 2,1 mm × 5 μm s použitím mobilní fáze o složení acetonitril : voda = 70 : 30 (v/v) s pH upraveným triethylaminem na hodnotu 11 a průtokem 250 μl min<sup>-1</sup>. Přístroj byl vybaven trojitým kvadrupólovým analyzátozem Varian 1200L (Varian, USA). Při měření bylo použito negativní elektrosprejové ionizace (ESI) v MRM módu. Podmínky na hmotnostním spektrometru byly následující: napětí na kapiláře –70 V, tlak kolizního plynu argonu 0,2 Pa, napětí na jehle –4500 V, teplota sušícího plynu 300 °C (dusík, 117 kPa) a teplota zmlžovacího plynu 50 °C (vzduch, 345 kPa).

## Výsledky a diskuse

Analýza specifických látek (biomarkerů) obsažených v KVV je poměrně novou, rychle se rozvíjející oblastí v oboru lékařské diagnostiky. Biomarkery jsou označovány látky produkované organismem, jejichž fyziologická koncentrace zdravého organismu je dostatečně odlišná od



Obr. 1. Schéma metody stanovení cysteinylovaných leukotrienů jako markerů *Asthma bronchiale*

koncentrace patologicky zvýšené v důsledku poškození organismu. Mezi nejvýznamnější skupinu biomarkerů obsažených v KVV patří cys LTs, které jsou považovány za biomarkery bronchiálního astmatu. Zvýšený výskyt cys LTs v určitém místě organismu signalizuje probíhající alergickou reakci. Výhodou stanovení uvedených látek v KVV ve srovnání s krevní plasmou nebo močí je skutečnost, že jejich množství odráží bezprostřední alergickou reakci probíhající výhradně v plicích a není zkreslena případnými dalšími alergickými procesy odehrávajícími se na jiném místě organismu.

Diagnostika založená na stanovení cys LTs jako markerů bronchiálního astmatu však není triviální záležitostí, což dokazuje absence standardizované metody pro jejich stanovení, přestože metod pro kvalitativní i kvantitativní analýzu prokazujících možnost diferenciální diagnostiky *Asthma bronchiale* byla v literatuře publikována celá řada<sup>8–12</sup>. Důvodem chybějící standardizované metody je především nerespektování nízké stability cys LTs za laboratorních podmínek, přítomnost enzymů zodpovědných za vzájemnou přeměnu jednotlivých markerů ( $LTC_4 \rightarrow LTD_4 \rightarrow LTE_4$ ) v matrici KVV a chemické změny odehrávající se v průběhu přípravy vzorku pro stanovení.

Nově vyvinutá metoda kombinuje rychlou separační metodu (imunoafinitní extrakci cys LTs z matrice KVV s vysoce selektivní metodou stanovení, LC-ESI-MS), která respektuje veškerá výše uvedená omezení a lze ji charakterizovat jako vysoce reprodukovatelnou a přesnou. Předkládaná metoda (obr. 1) je vhodná nejen k diagnostickým účelům, ale rovněž pro monitorování průběhu onemocnění, případně sledování efektivity farmakoterapie. V tomto ohledu může kombinace imunoafinitní separace s LC-ESI-MS aspirovat na metodu, která by se mohla stát standardní pro stanovení cys LTs v KVV jako prostředku pro neinvazivní diagnostiku onemocnění *Asthma bronchiale*.

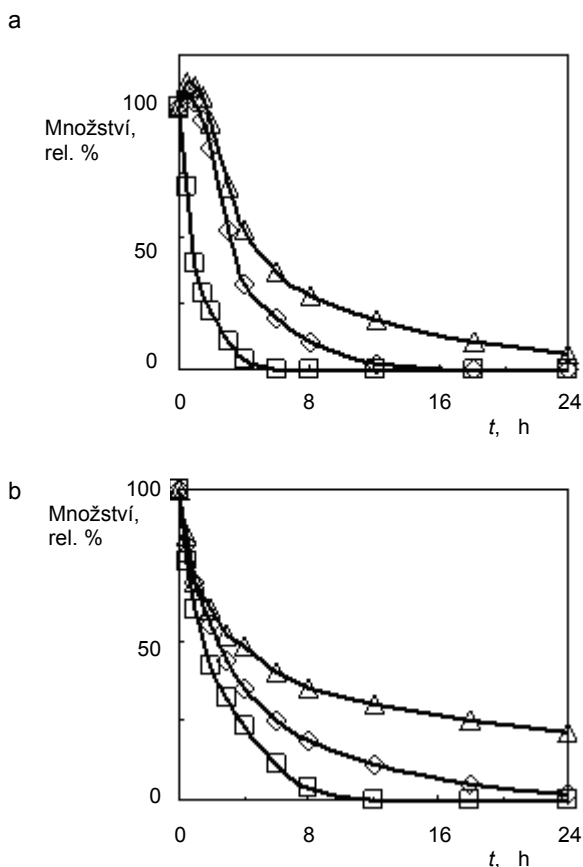
#### Stabilita cysteinylovaných leukotrienů v KVV

Biomarkery *Asthma bronchiale* – cys LTs jsou známy jako málo stabilní látky, které jsou za přítomnosti příslušných enzymů schopné vzájemné přeměny. Primární snahou při vývoji metody stanovení těchto látek v KVV bylo postihnout jejich chování v uvedené biologické matrici a nalézt postup přípravy vzorku vhodného pro hmotnostně-spektrometrickou analýzu umožňující zachytit koncentraci analytů ve vzorku bezprostředně po jeho odebrání.

Odběr KVV se provádí na specializovaném pracovišti vybaveném zařízením pro jeho odběr (viz Experimentální část). Již při odběru KVV je potřeba zachovat standardní postup respektující nízkou stabilitu řady látek v této matrici. K stanovení cys LTs postačuje odebrat KVV v množství alespoň 1 ml, jež se získá za dobu pěti až deseti minut pacientova klidného dýchání ústy přes kondenzátor vydechovaného vzduchu. Vhodné je provést test na kontaminaci vzorku slinami, ke které by mohlo dojít v důsledku špatně provedeného odběru KVV, neboť ve slinách se vyskytuje významné množství cys LTs, a byl by tak nale-

zen falešně pozitivní výsledek. Kontrolu kontaminace je možné provést prostřednictvím stanovení  $\alpha$ -amylasy ve vzorku.

Vzhledem k citlivosti biomarkerů k celé řadě faktorů je ideální ihned po odběru provést označení vzorku isotopicky značeným vnitřním standardem (přídavek 250 pg deuterovaného analogu  $LTE_4 - LTE_4-d_3$  do 1 ml KVV). Standardizace isotopicky značeným analogem využívá zcela identického fyzikálního, chemického a biologického chování známého množství standardu, který ale při hmotnostně-spektrometrické analýze vykazuje odlišné chování v detektoru v důsledku nahrazení vodíku deuteriem (v tomto případě na 3 místech molekuly). Tato skutečnost umožňuje velice přesné provedení kvantifikace a monitorování změn ve složení vzorku, ke kterým došlo v průběhu jeho zpracování (stable-isotope-dilution assay). KVV (matrice s majoritním podílem vody) bezprostředně po odběru vykazuje hodnotu pH v rozmezí 7,2–7,7. Hodnota pH KVV se však v krátkém časovém intervalu snižuje (pH 6,0–6,5) jako důsledek absorpce  $CO_2$  ze vzduchu<sup>15</sup>, což může být jednou z příčin změn, které se v uvedené matrici odehrávají po jejím odebrání. Bylo prokázáno, že



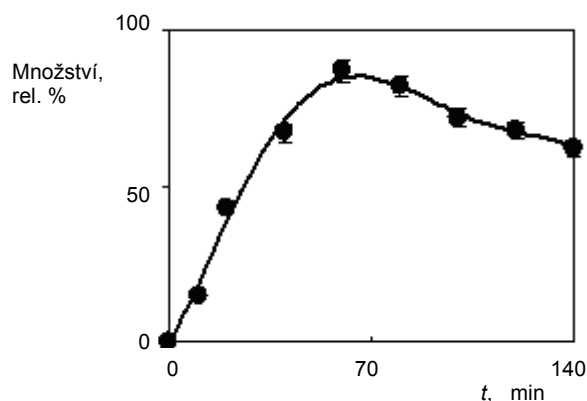
Obr. 2. Stabilita cysteinylovaných leukotrienů v kondenzátu vydechovaného vzduchu (A) a v mobilní fázi (B) při 25 °C; □  $LTC_4$ , ◇  $LTD_4$ , △  $LTE_4$

při uchovávání KVV pod inertní atmosférou (argon) se pH nemění, nicméně u cys LTs se tento parametr nejevil jako zásadní. Rovněž nebyl prokázán vliv světla na stabilitu cys LTs v KVV. Parametr, který významně ovlivňuje obsah těchto biomarkerů, je teplota. Bylo prokázáno, že za laboratorní teploty se obsah cys LTs velice rychle mění a to v důsledku 1) jejich vzájemné přeměny a 2) omezené teplotní stability. Chování cys LTs v KVV a organických rozpouštědlech (mobilní fáze použitá při LC analýze) je zachyceno na obr. 2, z kterého je zřejmý vliv teploty na obsah jednotlivých cys LTs. V matrici KVV byla vedle rozpadu jednotlivých látek (velmi dobře patrného v mobilní fázi) sledována i jejich přeměna v řadě  $LTC_4 \rightarrow LTD_4 \rightarrow LTE_4$  katalyzovaná přítomnými enzymovými systémy. Dále bylo zjištěno, že při teplotě  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  je možné uchovávat KVV beze změny obsahu sledovaných látek po dobu 3 měsíců (rovněž teplota  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  se jevila jako vyhovující). Naproti tomu teplota  $4\text{ }^\circ\text{C}$  k uskladnění KVV nebyla dostatečně nízká. Proces vzájemných přeměn a odbourávání odpovídající teplotní závislosti rychlostních konstant obou procesů se sice zpomaloval, ale přesto probíhala degradace sledovaných biomarkerů v obou maticích v horizontu jednotek hodin. Zlomovou teplotou pro stabilitu látek je zřejmě převedení vodné matrice z kapalného do pevného stavu (teplota  $0\text{ }^\circ\text{C}$ ). S ohledem na uvedenou skutečnost byl posuzován parametr „cyklus rozmrazování – zamrazování“. Při každém obratu uvedeného cyklu se snižuje množství cys LTs v KVV o 8–9 %.

#### Imunoafinitní separace

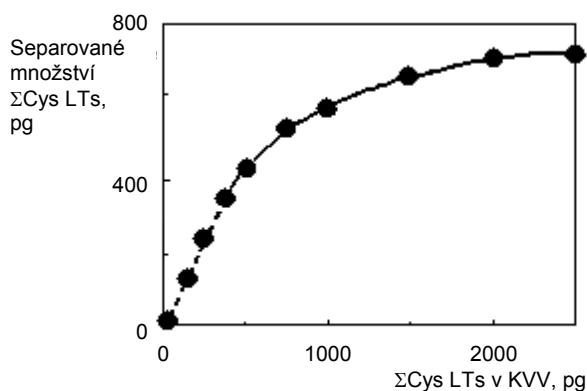
Vzhledem k velmi nízké koncentraci cys LTs v KVV a složitosti této matrice je vhodné sledované látky před samotnou LC-MS analýzou separovat, případně zkoncentrovat. Principem imunoafinitní extrakce je vysoce specifická reakce mezi antigenem (v tomto případě cys LTs) a protilátkou (v tomto případě myší protilátka proti  $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$  zakotvenou na Sepharose 4B). Imunoafinitní separace byla realizována přidávkem sorbentu ( $50\text{ }\mu\text{l}$ ) do 1 ml KVV (vazebná kapacita imunoafinitního sorbentu byla stanovena na 100 ng cys LTs na 1 ml sorbentu). Typický časový průběh imunoextrakce je znázorněn na obr. 3, kde je zachycena závislost výtěžku na době imunoextrakce. Z grafu je zřejmé, že s prodlužujícím se časem imunoextrakce roste výtěžek cys LTs z KVV, nicméně paralelně s tím se tyto látky rozkládají v důsledku negativního vlivu teploty ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ). Po dosažení maxima výtěžnosti začne proces rozkladu převažovat. Na základě uvedené závislosti byla zvolena optimální doba imunoseparace (60 min).

Neméně důležitým parametrem je poměr množství imunoafinitního sorbentu a cys LTs, resp. objemu KVV (množství cys LTs v KVV se v klinických vzorcích pohybuje v intervalu  $50\text{--}250\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  KVV). Závislost množství imunoextrakcí separovaných cys LTs na jejich původním množství přítomném v KVV je zachycena na obr. 4. Uvedená závislost má charakter Langmuirovy adsorpční iso-

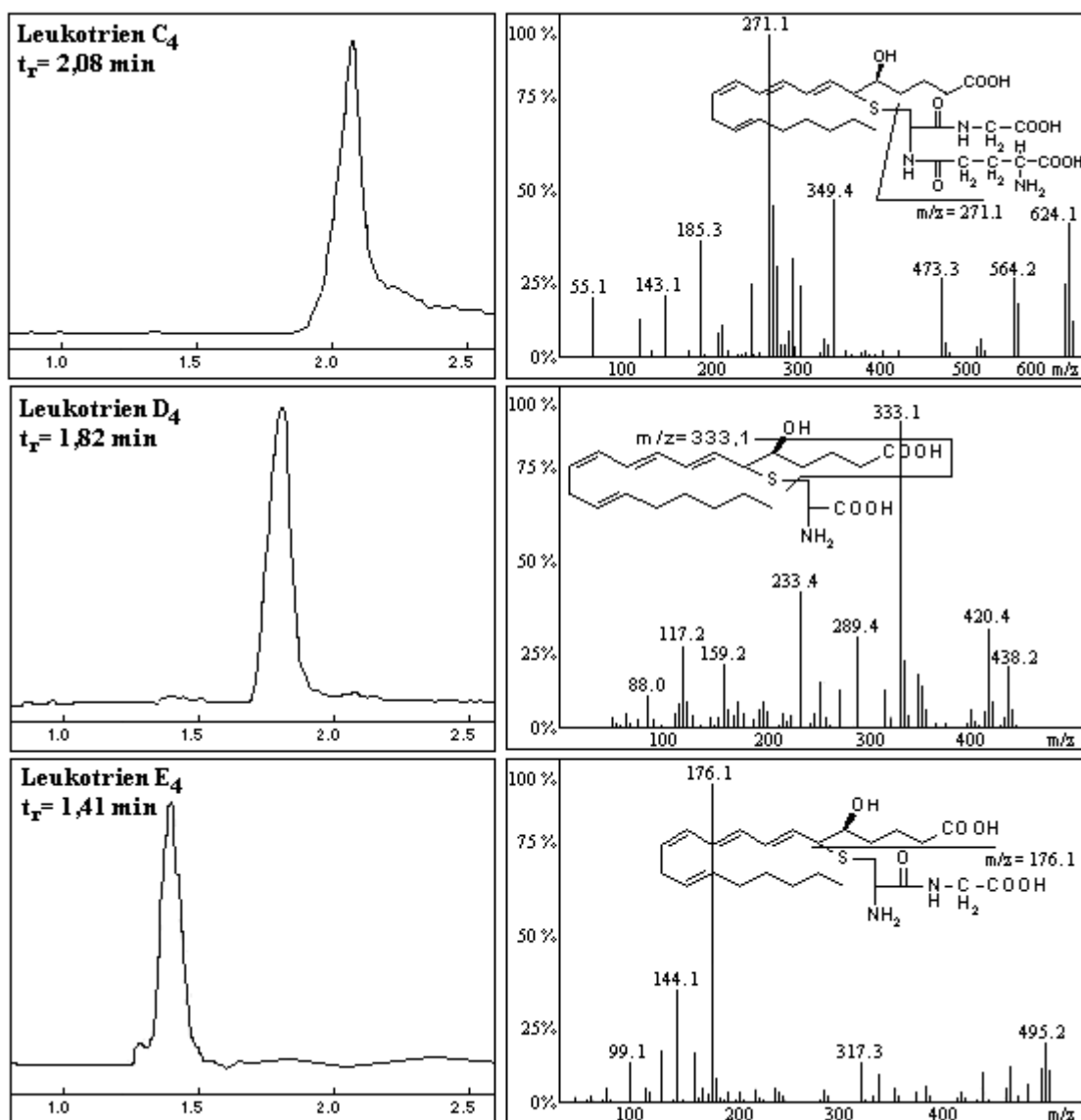


Obr. 3. Výtěžek cys LTs v závislosti na době imunoextrakce

termy s oblastí lineární, v které s rostoucím množstvím cys LTs v matrici se zvyšuje množství zachycené protilátkou na povrchu sorbentu, a oblast nelineární, kde poměr množství cys LTs k protilátce je natolik velký, že množství zachycených látek se již téměř nemění s rostoucím množstvím markerů v matrici. Z hlediska přesnosti metody bylo v klinických analýzách používáno  $50\text{ }\mu\text{l}$  sorbentu, což odpovídá imunoextrakční separaci probíhající v lineární části závislosti, která je na obr. 4 zachycena čárkovaně. Po separaci imunoafinitního sorbentu centrifugací ( $500\text{ ot. min}^{-1}$ ) a oddělení horní vrstvy byl sorbent promyt  $2 \times 1\text{ ml}$  vody (separace zbylých nenavázaných látek z KVV) a následně byla vazba antigen – protilátka rozvolněna methanolem. Vzorek k nástřiku do analytického systému LC-ESI-MS byl získán odpařením methanolu proudem dusíku do sucha a jeho rozpuštěním v mobilní fázi



Obr. 4. Imunoseparace: Závislost separovaného množství cys LTs na jejich obsahu v kondenzátu vydechovaného vzduchu



Obr. 5. Chromatogramy a kolizní spektra cysteinylovaných leukotrienů

(standardně používáno 50  $\mu$ l). Uvedeným postupem bylo možné separovat 80–90 % cys LTs přítomných v klinickém vzorku. Podíl nespecifických reakcí s imunoafinitním sorbentem byl zanedbatelný.

Imunoafinitní sorbent bylo možné regenerovat opakovaným promytím následujícími rozpouštědly: voda (1 ml)  $\rightarrow$  85 % ethanol (1 ml)  $\rightarrow$  0,1 M fosfátový pufr (pH 4; 1 ml)  $\rightarrow$  voda (1 ml). Takto zregenerovaný imunoafinitní sorbent byl připraven k opakovanému použití k imunoextrakci bez měřitelné ztráty sorpční kapacity. Experimentálně bylo ověřeno použití sorbentu v deseti po sobě následujících cyklech.

Z hlediska diagnostiky *Asthma bronchiale* byl použí-

ván, jako isotopicky značený standard  $LTE_4-d_3$ , který umožnil monitorovat ztráty cys LTs v průběhu celé metody, nicméně neumožňoval postihnout následnou reakci jednotlivých cys LTs v průběhu imunoseparace ( $LTC_4 \rightarrow LTD_4 \rightarrow LTE_4$ ). Tento nedostatek, který ovšem není významný z hlediska diferenciální diagnostiky *Asthma bronchiale*, by bylo možné odstranit přidáním všech isotopicky značených cys LTs a monitorovat tak jejich ztráty nezávisle. Nicméně sumární hodnota cys LTs byla získána s maximální relativní chybou 5,6 % a pro jednotlivé cys LTs nepřesáhla 6,5 %.

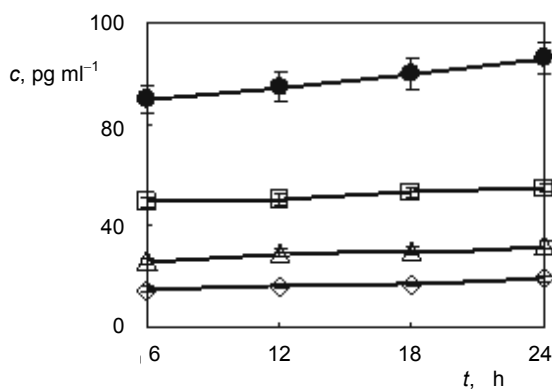
Tabulka I

Parametry MRM modu včetně hodnoty kolizní energie cysteinylovaných leukotrienů pro hmotnostně-spektrické stanovení

Biomarker	MRM	Kolizní energie [eV]
	Q1→Q3	
LTC <sub>4</sub>	624,1 → 271,1	27
LTD <sub>4</sub>	495,2 → 176,1	21
LTE <sub>4</sub>	438,2 → 333,1	19
LTE <sub>4</sub> -d <sub>3</sub>	441,2 → 336,1	19

## LC-ESI-MS

Nedávný bouřlivý vývoj v oblasti LC-MS umožňuje dnes bezproblémovou separaci a paralelní detekci množství analytů v značně složitých maticích. Z tohoto důvodu stejně jako pro svou velkou citlivost a schopnost přinést vysoce specifické strukturní informace se LC-MS stává metodou první volby v analýze biologických matic. Stanovení pikogramových množství cys LTs v poměrně složité tělní tekutině KVV je problémem řešitelným metodou LC-MS, a to i z hlediska budoucí rutinní praxe. Kapalinová chromatografie byla při analýze cys LTs realizována na koloně Hypercarb a sloužila 1) nejen k oddělení látek od čela analýzy, kde by v důsledku případné koeluce soli a endogenních složek matrice mohlo docházet k potlačení signálu hmotnostního detektoru (signal suppression effect) negativním vlivem na probíhající ionizaci, 2) ale rovněž k separaci jednotlivých cys LTs (LTC<sub>4</sub> – t<sub>R</sub> = 1,4 min, LTD<sub>4</sub> – t<sub>R</sub> = 1,8 min a LTE<sub>4</sub> – t<sub>R</sub> = 2,0 min; viz obr. 6) a dalších prostanoidů (leukotrien B<sub>4</sub> – t<sub>R</sub> = 2,8 min, 8-isoprostan – t<sub>R</sub> = 2,2 min, mrtvý čas kolony = 0,8 min). Podmínky chromatografické analýzy byly optimalizovány



Obr. 6. Změna hladiny cysteinylovaných leukotrienů v průběhu denního biorytmu; □ LTC<sub>4</sub>, ◇ LTD<sub>4</sub>, △ LTE<sub>4</sub>, ● Σ Cys LTs

s ohledem na omezení na straně hmotnostního detektoru (průtok mobilní fáze kompatibilní s použitou ionizací), ale rovněž s důrazem na citlivost detektoru.

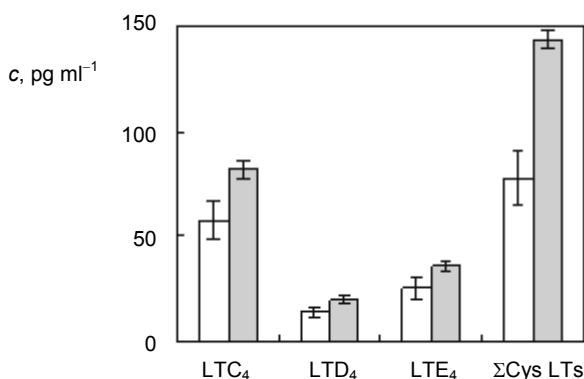
Hmotnostně-spektrická detekce byla realizována negativní elektrosprejovou ionizací ve vysoce selektivním módu MRM. Na prvním kvadrupólu byl izolován quasimolekulární ion (deprotonovaný molekulární ion) [M-H]<sup>-</sup> příslušného cys LT, který byl použit jako prekurzor pro následnou kolizně-indukovanou disociaci (CID) na druhém kvadrupólu. V „kolizní“ cele (Q2) docházelo k selektivnímu rozpadu molekuly za vzniku dceřiného spektra (obr. 5), z kterého byl na třetím kvadrupólu izolován specifický ion (dceřiný) s nejvyšším zastoupením. Podmínky MRM ve formě typických rozpadových reakcí a energie kolizně-indukované disociace pro jednotlivé cys LTs jsou zachyceny v tabulce I. Kolizní energie, stejně jako další parametry na hmotnostním spektrometru, byly optimalizovány z hlediska získání maximální citlivosti vyvinuté metody (viz experimentální část).

Pro jednotlivé cys LTs byla sestrojena kalibrační závislost poměru ploch leukotrienu a vnitřního standardu na koncentraci daného analytu. Získané experimentální body byly v rozmezí limitu kvantifikace až 1000 pg zpracovány metodou lineární regrese s přesností (udáno Pearsonovým korelačním koeficientem) pro LTC<sub>4</sub> ≥ 0,9993, LTD<sub>4</sub> ≥ 0,9996 a LTE<sub>4</sub> ≥ 0,9991. Ekvivalentní kalibrační závislosti byly získány z matrice KVV přidáním odpovídajícího množství cys LTs do uvedené matrice, z které byly následně separovány imunoextrakčním postupem a kvantifikovány LC-ESI-MS/MS. Kalibrační křivky připravené využitím matrice KVV se vyznačovaly lineární závislostí v rozmezí limitu kvantifikace – 1000 pg s korelačním koeficientem pro LTC<sub>4</sub> ≥ 0,9955; LTD<sub>4</sub> ≥ 0,9983 a LTE<sub>4</sub> ≥ 0,9947. Shodností kalibračních křivek získaných z matrice KVV a mobilní fáze se prokázala absence vlivu matrice na kalibrační závislost. Správnost metody byla stanovena pro pět sérií vzorků (počet vzorků v jedné sérii n = 6), jednotlivé série se lišily množstvím cys LTs (25, 50, 75, 100 a 250 pg) v matrici KVV. Správnost metody pro jednotlivé cys LTs, limit kvantifikace, limit detekce a přesnost jsou uvedeny v tab. II.

Tabulka II

Charakteristiky metody kombinující imunoextrakci s LC-ESI-MS pro stanovení cysteinylovaných leukotrienů

	LTC <sub>4</sub>	LTD <sub>4</sub>	LTE <sub>4</sub>
Mez detekce, pg ml <sup>-1</sup>	2	1	1
KVV			
Mez kvantifikace, pg ml <sup>-1</sup>	16	6	5
KVV			
Správnost, %	93,5	94,2	95,4
Přesnost, %	90,3	90,9	91,6

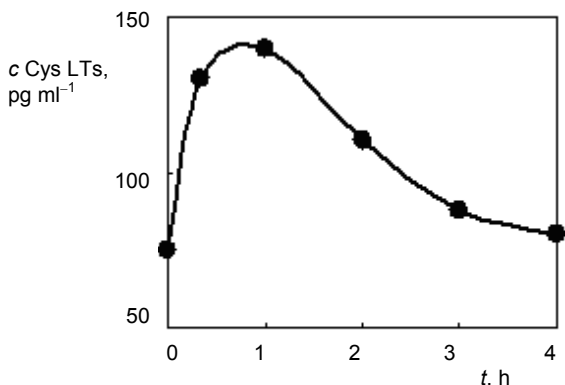


Obr. 7. Výsledky klinické studie – diferenciální diagnostika *Asthma bronchiale*; □ kontrolní skupina, ■ *Asthma bronchiale*

#### Klinická studie

Vyvinutá metoda byla použita pro analýzu klinických vzorků, přičemž bylo nutné zmapovat chování biologického systému s ohledem na produkci cys LTs v průběhu denního biorytmu. Ve skupině 10 dobrovolníků (věk  $18 \pm 1$ , nekuřáci, bez diagnózy *Asthma bronchiale*) byly odebrány čtyři vzorky KVV vždy v průběhu jednoho dne (v 6, 12, 18 a 24 h). U všech subjektů byl prokázán zcela shodný trend ve vývoji koncentrací cys LTs, které se v průběhu dne zvyšovaly a na svou původní koncentrační hladinu se vracely až v době spánku (obr. 6). V průběhu dne (18 až 20 hodin bez spánku) se suma cys LTs zvýšila v průměru o 25,4 %. Pro diferenciální diagnostiku *Asthma bronchiale* je proto nutné respektovat tuto skutečnost a dodržovat stejný čas odběru (v klinických studiích byly vzorky odbírány vždy mezi 8. a 12. hodinou).

Cílem klinické studie bylo ověřit možnost diferenciál-



Obr. 8. Monitorování hladiny cys LTs v kondenzátu vydechaného vzduchu během histaminového (bronchoprovokačního) testu

ní diagnostiky *Asthma bronchiale*. Byla prováděna u 20 osob s touto diagnózou a stejně početnou kontrolní skupinou. Výsledky byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny na obr. 7, z kterého je zřejmé, že existuje významný rozdíl mezi hodnotami koncentrací některých leukotrienů (především C<sub>4</sub> a E<sub>4</sub>) u osob s diagnostikovaným onemocněním, který je zvýrazněn u sumárních hodnot cys LTs. Význam leukotrienu D<sub>4</sub> pro diferenciální diagnostiku *Asthma bronchiale* nebyl zcela potvrzen, ačkoliv i u tohoto biomarkeru byl zaznamenán rozdíl v jeho průměrné hodnotě, která byla vyšší u pozitivně diagnostikovaných subjektů, nicméně rozdíl v konfidenčních intervalech byl statisticky nevýznamný.

Vyvinutá diagnostická metoda byla použita rovněž v klinickém experimentu, jehož cílem bylo ověřit možnost monitorování průběhu alergického onemocnění, případně terapeutického postupu. U skupiny dobrovolníků (10) byl proveden bronchoprovokační test podáním histaminu. KVV byl odebrán před histaminovým testem a potom v časových intervalech 30, 60, 120, 180 a 240 min. Výsledek testu je zachycen na obr. 8, z kterého je zřejmé, že organismus na histamin reagoval zvýšenou produkcí cys LTs, jejichž hladina se po dosažení maxima koncentrace vracela na svou původní hodnotu. Z daného testu vyplývá, že uvedená metoda v sobě zahrnuje i možnost sledování účinnosti terapeutických postupů.

#### Závěr

Byla vyvinuta metoda pro detekci a kvantifikaci cys LTs jako potenciálních biomarkerů *Asthma bronchiale* v KVV. Stanovení cys LTs v uvedené matici umožňuje monitorovat děje odehrávající se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách nezávisle na procesech probíhajících v celém organismu, jak je tomu při stanovení biomarkerů v krevní plasmě nebo moči. Ačkoliv v nedávné době byla vyvinuta řada metod pro stanovení cys LTs v KVV a prokázána možnost diferenciální diagnostiky *Asthma bronchiale*, neexistuje dosud standardizovaný postup pro stanovení jejich koncentračních hladin a výsledky z různých pracovišť vykazují značnou nesourodost. Předkládaná práce si kládla za cíl identifikovat možné zdroje uvedených inkonsistencí a respektovat je při vývoji metody stanovení a návrhu metodiky měření od odběru vzorku až po získání validních dat v podobě koncentrací jednotlivých cys LTs v uvedené matici a jejich korelaci s fyziologickými/patologickými procesy odehrávajícími se v plicích, případně dýchacích cestách. Vyvinutá metoda kombinující imunoextrakční separaci s hmotnostně-spektrometrickou detekcí respektuje celou řadu omezení plynoucích ze složitosti matrice a nízké stability cys LTs. Je charakterizována dobrou přesností a vysokou reprodukovatelností.



## Seznam symbolů a zkratek

cys LTs	cysteinylované leukotrieny – LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> a LTE <sub>4</sub>
LTA <sub>4</sub>	leukotrien A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	leukotrien B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	leukotrien C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	leukotrien D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	leukotrien E <sub>4</sub>
KVV	kondenzát vydechaného vzduchu
MRM	monitorování více reakcí – Multiple Reaction Monitoring
ESI	elektrosprejová ionizace
CID	kolizně indukovaná disociace – Collision Induced Dissociation

## LITERATURA

- Jeffery P. K., Laitinen A., Venge P.: *Respir. Med.* 94, S9 (2000).
- Reynolds H. Y., *Lung* 178, 271 (2000).
- Holz O., Kips J., Magnussen H.: *Eur. Respir. J.* 16, 355 (2000).
- Čáp P., Pehal F., Petrů V., Musil J.: *Alergie* 3, 275 (2001).
- Musiek E. S., Cha J. K., Yin H., Zacker W. E., Terry E. S., Porter N. A., Montine T. J., Morrow J. D.: *J. Chromatogr., B* 95, 799 (2004).
- Dworski R., Peebles Stokem R., Sheller J. R., v knize: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation. Analysis of Exhaled Breath Condensate* (Montuschi P., ed.), kap. 12. CRC Press, Boca Raton 2005.
- Montuschi P., v knize: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation. Analysis of Exhaled Breath Condensate* (Montuschi P., ed.), kap. 2. CRC Press, Boca Raton 2005.
- Lindgren J. A., Hammarström S., Goetz E. J.: *FEBS Lett.* 152, 83 (1983).
- Hanazawa T., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1175 (2001).
- Antczak A., Montuschi P., Kharitonov S. A., Gorski P., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 301 (2002).
- Baraldi E., Carraro S., Alinovi R., Pesci A., Ghiso L., Bodini A., Piacentini G., Zacchello F., Zanconato S.: *Thorax* 58, 505 (2003).
- Csoma Z., Kharitonov S. A., Balint B., Bush A., Wilson N. M., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1345 (2002).
- Alison J. MacFarlane, Dworski R., Sheller J. R., Pavord I. D., Barry Kay A., Barnes N. C.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1553 (2000).
- Čáp P., Chládek J., Pehal F., Malý M., Petrů V., Barnes P. J., Montuschi P.: *Thorax* 59, 456 (2004).
- Effros R. M., Miller J., Dubbing M., Shaker R., v knize: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation. Analysis of Exhaled Breath Condensate* (Montuschi P., ed.), kap. 12. CRC Press, Boca Raton 2005.

**K. Syslová<sup>a</sup>, J. Přech<sup>a</sup>, J. Lebedová<sup>b</sup>, D. Pelclová<sup>b</sup>, and P. Kačer<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, <sup>b</sup> Department of Occupational Medicine, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague): **Development of a Non-Invasive Diagnostic Method for Bronchial Asthma**

A method was developed for rapid and accurate determination of cysteinylleukotrienes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), essential biomarkers of bronchial asthma, in exhaled breath condensate. The method consists of an immunoseparation procedure combined with selective and sensitive detection by LC-ESI-MS in the multiple reaction monitoring mode (MRM) and using a stable-isotope-dilution assay. The precision of the method was around 94 %. The mean accuracy was higher than 90 % for the content of cysteinylleukotrienes in the concentrate up to 250 pg ml<sup>-1</sup>. The method was tested on patients with occupational bronchial asthma and compared with healthy subjects. The differences between the two groups were significant.

## ANALÝZA ANTIOXIDANTŮ V CHMELU A PIVU

MARTIN FIDLER\* a LENKA KOLÁŘOVÁ

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. legii 565, 532 10 Pardubice*  
martin.f@centrum.cz, lenka.kolarova@upce.cz

Došlo 30.5.07, přepracováno 3.3.08, přijato 12.6.08.

**Klíčová slova:** flavonoidy, chmel, pivo, antioxidační aktivita

### Úvod

Jednou z možností, jak chránit organismus před vlivem volných radikálů, je působení antioxidantů. Antioxidanty jsou molekuly, které mohou zabráňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek. Mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají spolu s potravou, má antioxidační vlastnosti. Velký význam se přikládá zejména polyfenolickým sloučeninám. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaj, víno, chmel, aromatické a léčivé rostliny a další. V řadě experimentálních studií bylo zjištěno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než u antioxidačních vitamínů<sup>1</sup>. Rovněž byl prokázán vztah mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě či v nápojích a prevencí některých onemocnění, např. kardiovaskulárních chorob, neurologických poruch nebo procesů stárnutí<sup>2</sup>. Polyfenolické látky obsažené v pivu mají široké spektrum příznivých účinků na lidské zdraví, účinky jsou nejen antioxidační, ale i protirakovinotvorné, antimikrobiální a protizánětlivé. Dále hrají polyfenolické látky významnou úlohu v bránění procesu oxidačních změn během chmelovaru a skladování.

Většinu přírodních antioxidantů přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy. Proto se snažíme charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků jako celku. Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity, TAA). Existuje velké množství metod pro stanovení TAA, přičemž nejčastěji používanou metodou je TEAC<sup>1</sup> (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Tato metoda určuje antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní určitému množství standardu

Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu odpovídající antioxidační aktivitě testované látky o koncentraci 1 mmol l<sup>-1</sup>. Směsné vzorky se hodnotí jako látkové množství Troloxu odpovídající aktivitě 1 g či 1 ml vzorku. Tato metoda může být aplikována na měření čistých látek, vodných roztoků i nápojů.

Antioxidační aktivitu látek lze měřit metodami chemickými a fyzikálními<sup>1</sup>. Chemické metody spočívají v použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Nejčastěji se využívají metody založené na eliminaci kyslíkových (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC<sup>3,4</sup>) nebo syntetických stabilních (ABTS, DPPH) radikálů.

Metoda využívající schopnost antioxidantů zřádit radikálový kation ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)<sup>5</sup> je jednou ze základních metod pro stanovení antioxidační aktivity. Základem metody je generování radikál kationu ABTS<sup>•+</sup>, k čemuž lze využít např. peroxidisíran draselný, MnO<sub>2</sub>, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dichlorid) či systém H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidasa. V této práci byl použit peroxidisíran draselný, který reaguje s ABTS ve stechiometrickém poměru 2:1 (ABTS:K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Nadbytek ABTS je nutný pro zachování stability reakční směsi. Pokud je poměr [ABTS]/[ABTS<sup>•+</sup>] roven 50, pak se absorbance samotné reakční směsi s časem nemění, pokud je však tento poměr blízký nule, je reakční směs nestabilní a dochází ke znatelnému poklesu absorbance v závislosti na čase<sup>6</sup>.

Další metoda využívá schopnosti antioxidantů zřádit radikál DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), což je stabilní volný radikál, který může být díky své struktuře akceptorem atomu vodíku, čímž přechází do formy stabilní diamagnetické molekuly.

Antioxidační aktivitu lze také posuzovat na základě redukční schopnosti látky. Na principu redoxní reakce je založena metoda FRAP<sup>8</sup> (Ferric Reducing Antioxidant Power), kde se využívá schopnost antioxidantů redukovat železité komplexy (např. Fe<sup>III</sup>-TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin), které jsou téměř bezbarvé a po redukcii vytváří barevné produkty. Metoda má svá omezení spočívající v tom, že měření probíhá při velmi nízké hodnotě pH (3,6), dále nejsou zachyceny polyfenolické látky reagující s komplexem pomalu.

Fyzikální metody stanovení antioxidační aktivity nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek, ale změnu fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovází. Příkladem je elektronová spinová rezonance, stanovení redoxního potenciálu či chemiluminiscence.

\* Martin Fidler tuto práci úspěšně prezentoval v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

## Experimentální část

Tato práce je zaměřena na sledování antioxidační aktivity u 20 vybraných vzorků pív (tab. I), mezi kterými byli zástupci světlých ležáků (P1–P13), světlých výčepních pív (P14, P15), pív speciálních (P16), tmavých pív (P17, P18) a pív nealkoholických (P19, P20). Dále byla sledována antioxidační aktivita chmelových extraktů a granulí (tab. II). Chmelové extrakty připravené extrakcí ethanolem či nadkritickou tekutinou (CO<sub>2</sub>) byly dodány firmami Flaveko s.r.o. (F1–F3) a Favea s.r.o. (K1–K4), granulovaný chmel (G1–G3) byl dodán Chmelařským institutem s.r.o. (Žatec).

Pro měření antioxidační aktivity byly použity metody využívající eliminaci syntetických radikálů (ABTS a DPPH), dále metoda založená na redoxních vlastnostech železitého komplexu (FRAP). U všech metod byla spektrofotometricky měřena změna absorbance na UV spektrofotometru Specol 11 (Carl-Zeiss, Německo).

Pro srovnání výsledků jednotlivých metod byla použita standardní látka, Trolox, která byla rozpuštěna v methanolu a z tohoto zásobního roztoku byla ředěním připravena kalibrační řada obsahující 0,005–0,05 μmol Troloxu pro metodu používající ABTS, 0,01–0,08 μmol Troloxu pro metodu používající DPPH a 0,02–0,1 μmol Troloxu pro metodu FRAP (vše absolutní množství Troloxu v nadávkovaném objemu). Toto rozmezí koncentrací bylo určeno experimentálně. Pro studované vzorky bylo absolutní množství Troloxu odečteno z kalibrační křivky (závislost změny absorbance na absolutním množství Troloxu v nadávkovaném množství) a přepočteno na hodnotu TEAC, která byla vztažena na jednotku vzorku (v případě piva na 1 ml, v případě chmelových extraktů a granulí na 1 g).

### Metoda používající ABTS

Radikál kation ABTS<sup>•+</sup> byl připraven reakcí ABTS diamonné soli ( $c = 3,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) a K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ( $c = 0,06 \text{ mol l}^{-1}$ ).

Roztok se nechal reagovat 12–16 h za nepřístupu světla při laboratorní teplotě. Takto vzniklý roztok byl smíchán s čerstvě připraveným octanovým pufrům (pH 4,3) v poměru 39:1 (pufr:ABTS). Ke 2 ml této reakční směsi bylo přidáno 25 μl vzorku. Po promíchání se roztok nechal reagovat 30 min a byl proměřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Původně modrozelený roztok se odbarvil na světle zelený až čirý. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

### Metoda používající DPPH

Ze zásobního roztoku DPPH ( $c = 0,2 \text{ mol l}^{-1}$ ) v methanolu byl připraven pracovní roztok o koncentraci  $c = 100 \text{ μmol l}^{-1}$  obsahující octanový pufr (pH 4,3) v poměru 1:2 (DPPH:pufr). K analýze bylo odebráno 1,9 ml této reakční směsi, ke které bylo přidáno 100 μl vzorku. Úbytek absorbance byl měřen při vlnové délce 515 nm

Tabulka II  
Seznam studovaných vzorků chmelových extraktů (K, F) a granulovaného chmele (G)

Označení	Vzorek
K1	CO <sub>2</sub> extrakt
K2	CO <sub>2</sub> standardizovaný extrakt
K3	CO <sub>2</sub> isomerizovaný extrakt
K4	ethanolový extrakt
F1	ethanolový extrakt
F2	CO <sub>2</sub> extrakt
F3	CO <sub>2</sub> isomerizovaný extrakt
G1	odrůda – Žatecký červeňák
G2	odrůda – Agnus
G3	odrůda – Premiant

Tabulka I

Seznam studovaných vzorků pív

Označení	Vzorek piva	Označení	Vzorek piva
P1	Braník ležák	P11	Velkopopovický kozel - medium
P2	Budweiser - sv. ležák	P12	Zlatopramen 11°
P3	Velkopopovický kozel - premium	P13	Krušovice jubilejní ležák
P4	Staropramen ležák	P14	Klasik
P5	Gambrinus premium	P15	Krušovice Mušketýr
P6	Pilsner Urquell	P16	Bud Superstrong
P7	Stella Artois	P17	Staropramen černý
P8	Radegast premium	P18	Krušovice černé
P9	Starobrno ležák	P19	Radegast Birell
P10	Pernštejn - sv. ležák	P20	Staropramen nealko

v 30 s intervalech po dobu 10 min pro studium průběhu reakce antioxidantů s DPPH. Pro zjištění celkové antioxidační aktivity byl změřen úbytek absorbance po 30 min od začátku reakce. Původně fialový roztok byl působením antioxidantů odbarven na světle fialový až čirý. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

#### Metoda FRAP

Při této metodě se pracuje ve vodném prostředí. Reakční směs byla připravena smícháním roztoků  $\text{FeCl}_3$  ( $c = 20 \text{ mmol l}^{-1}$ ), TPTZ s přidávkou kyseliny chlorovodíkové ( $c = 10 \text{ mmol l}^{-1}$ ) a octanového pufru (pH 3,6) v poměru 1:1:10 ( $\text{FeCl}_3$ : TPTZ:pufr). Ke 2 ml reakční směsi bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  vzorku. Na rozdíl od předchozích metod byl měřen nárůst absorbance při vlnové délce 593 nm po 10 min od začátku reakce. Změna absorbance byla přepočtena pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství Troloxu.

#### Výsledky a diskuse

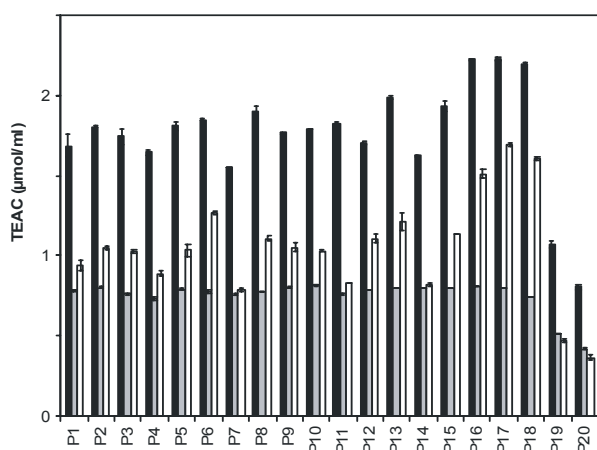
Všemi metodami bylo proměřeno celkem 20 vzorků pív (tab. I). U každého vzorku byly provedeny celkem čtyři experimenty a vypočtena průměrná hodnota. Na základě rovnice regrese kalibrační křivky závislosti změny absorbance na látkovém množství Troloxu byla změna absorbance přepočtena na ekvivalentní množství Troloxu. Hodnota celkové antioxidační aktivity byla vztažena na jednotku vzorku (1 ml piva).

Grafické znázornění a srovnání výsledků je uvedeno na obr. 1. Z něj je patrné, že ze světlých pív má nejvyšší antioxidační aktivitu pivo speciální (P16), což je 16-ti

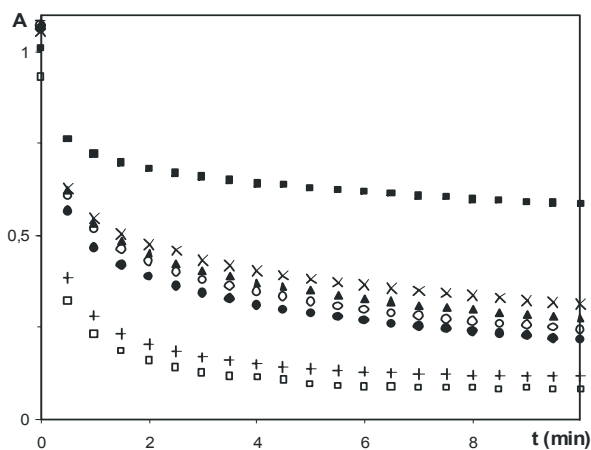
stupňové pivo, které obsahuje více mladiny a tím i více látek vykazujících antioxidační aktivitu. Ležáky a světlá výčepní piva mají antioxidační aktivitu přibližně srovnatelnou v závislosti na výrobcí. Nejmenší antioxidační aktivitu mají piva nealkoholická (P19, P20), která se od ostatních pív liší technologickým postupem výroby. Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity dosahují piva tmavá (P17, P18), která jsou vyrobená odlišným způsobem s využitím jiného chmelu i sladu. Výsledné hodnoty antioxidační aktivity změřené za použití různých metod se číselně nerovnejí. Je to způsobeno tím, že každá reakční směs reaguje s různými antioxidanty různými mechanismy. Nejpřesnější by měla být metoda ABTS, kde činidlo reaguje se všemi látkami vykazujícími antioxidační aktivitu. Prenylované flavonoidy a některé další polyfenolické látky reagují s DPPH pomalu, případně nereagují vůbec, proto jsou hodnoty antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH nižší. Nižší hodnoty vykazuje i metoda FRAP, kde je měřena spíše redukční schopnost látek, která na rozdíl od dalších dvou použitých metod nemusí korelovat přímo s antioxidační aktivitou. Pro orientační srovnání vzorků se stejnou povahou jsou však dostačující všechny použité metody. Mezi výsledky získanými různými metodami neexistuje žádný matematický vztah.

Průběh reakce DPPH se vzorky pív je znázorněn na obr. 2, kde jsou pro ilustraci vybráni zástupci jednotlivých tříd pív – světlá výčepní, ležáky, tmavá a nealkoholická. Z obrázku jasně vyplývá, že nealkoholická piva (P20) reagují s DPPH velice pomalu, zatímco piva černá (P17) a pivo speciální (P16) reagují z počátku velice rychle a po cca 3 min se jejich absorbance už prakticky nemění.

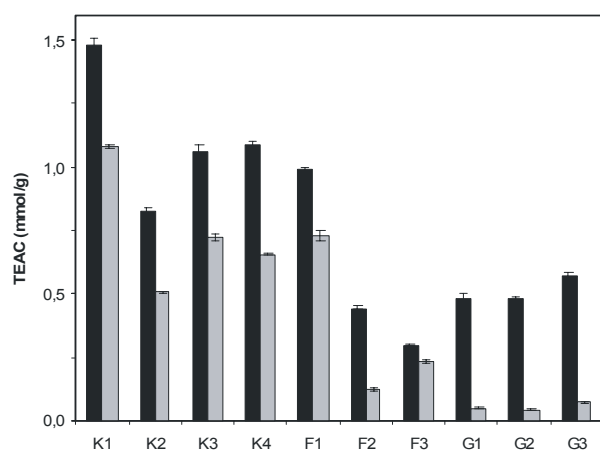
Dále byly proměřeny chmelové extrakty a granule (tab. II). Uvedené vzorky nejsou rozpustné ve vodě, proto bylo stanovení antioxidační aktivity provedeno pouze metodami ABTS a DPPH. Metodu FRAP lze použít pouze ve



Obr. 1. Antioxidační aktivita studovaných vzorků pív vyjádřená v TEAC; porovnání výsledků získaných s využitím metod  $\square$  DPPH,  $\blacksquare$  ABTS a  $\square$  FRAP



Obr. 2. Průběh reakce radikálu DPPH s vybranými vzorky pív;  $\blacktriangle$  P3,  $\circ$  P8,  $\bullet$  P12,  $\times$  P14,  $+$  P16,  $\square$  P17,  $\blacksquare$  P20



Obr. 3. Antioxidační aktivita chmelových extraktů a granulí vyjádřená v TEAC; porovnání výsledků získaných s využitím metod ABTS a DPPH; ■ ABTS, □ DPPH

vodném prostředí. Chmelové extrakty a granule byly rozpuštěny v methanolu (ABTS:  $c = 1 \text{ g l}^{-1}$ , DPPH:  $c = 0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) a proměřeny. Celkem byly provedeny čtyři experimenty a průměrné hodnoty byly pomocí kalibrační křivky závislosti změny absorbance na látkovém množství Troloxu přepočteny na TEAC. Hodnoty TEAC byly vztaženy na jednotku vzorku, v tomto případě na 1 g extraktu či granulí. Na obr. 3 je uvedeno srovnání výsledků získaných s využitím obou metod (ABTS a DPPH). Jak je patrné, nejvyšší antioxidační aktivitu má chmelový extrakt K1, který byl připraven extrakcí nadkritickou tekutinou ( $\text{CO}_2$ ) a tudíž by obsah polyfenolických látek neměl být tak vysoký jako u alkoholových extraktů. Při přípravě tohoto extraktu byl pravděpodobně využit přídavek alkoholu, který podpořil jejich extrakci. Standardizovaný a isomerizovaný  $\text{CO}_2$  extrakt (K2 a K3) má přibližně stejnou antioxidační aktivitu jako alkoholové extrakty (K4 a F1). Nejnížší hodnoty TEAC byly pozorovány u extraktů připravených extrakcí nadkritickou tekutinou bez přídavku alkoholu (F2 a F3). Vzorky granulovaného chmele vykazují přibližně stejnou antioxidační aktivitu pro všechny odrůdy, přičemž číselné hodnoty v porovnání s chmelovými extrakty jsou podstatně nižší.

## Závěr

Celková antioxidační aktivita fenolických látek obsažených v pivu a chmelu byla změřena metodami využívajícími schopnosti antioxidantů zhaset syntetické radikály ABTS a DPPH. Byla také odzkoušena a úspěšně použita metoda FRAP, u které působením antioxidantů dochází

k redukci železitého komplexu na železnatý. Tato metoda je vhodná pro měření ve vodném prostředí, proto nemohla být použita pro zjištění antioxidační aktivity polyfenolických látek obsažených ve chmelových extraktech a granulích, které nejsou ve vodě rozpustné. Tato metoda byla použita pouze u vzorků piva. Metodami ABTS a DPPH byly proměřeny vzorky piva i chmelových extraktů a granulí. Všechny získané výsledky byly přepočteny na ekvivalentní množství standardní látky (Trolox) a vzájemně porovnány. Metoda ABTS poskytuje nejvyšší hodnoty, jelikož radikál kation reaguje se všemi látkami vykazujícími antioxidační aktivitu. U metody DPPH jsou hodnoty antioxidační aktivity nižší, protože nereaguje s prenylovanými flavonoidy a některými dalšími polyfenolickými látkami. Nižší hodnoty vykazuje i metoda FRAP, kde je měřena spíše redukční schopnost látek, která nemusí korelovat přímo s antioxidační aktivitou.

## LITERATURA

1. Paulová H., Bochoráková H., Táborská E.: Chem. Listy 98, 174 (2004).
2. Gliszczynska-Swiglo A.: Food Chem. 96, 131 (2006).
3. Ou B. X., Huang D. J., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K.: J. Agric. Food Chem. 50, 3122 (2002).
4. Ou B. X., Hampsch-Woodill M., Prior R. L.: J. Agric. Food Chem. 49, 4619 (2001).
5. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Free Radical Biol. Med. 26, 1231 (1999).
6. Cano A., Hernandez-Ruiz J., Garcia-Canovas F., Acosta M., Arnao M. B.: Phytochem. Anal. 9, 196 (1998).
7. Yokozawa T., Chen C. P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G. I., Nishioka I.: Biochem. Pharmacol. 56, 213 (1998).
8. Benzie I. F. F., Strain J. J.: Anal. Biochem. 239, 70 (1996).

**M. Fidler and L. Kolářová** (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice): **Analysis of Beer and Hop Antioxidants**

This work is focused on the determination of antioxidant activity of polyphenolics in hop and beer. Methods based on their radical-scavenging activity and ferric reducing antioxidant power were used for the purpose. All the methods were optimized and applied to hop extract and beer samples. The results obtained by different methods were compared and discussed.

# VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ HERBICIDU BIFENOXU NA STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ MODIFIKOVANÉ RTUŤOVÝM MENISKEM

DANA CABALKOVÁ<sup>a\*</sup>, JIŘÍ BAREK<sup>a</sup>, JAN  
FISCHER<sup>a</sup>, TOMÁŠ NAVRÁTIL<sup>b</sup>, KAROLINA  
PECKOVÁ<sup>a</sup> a BOGDAN YOSYPCHUK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2, <sup>b</sup> Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, AV ČR, v.v.i. Dolejškova 3, 182 23 Praha 8  
barek@natur.cuni.cz

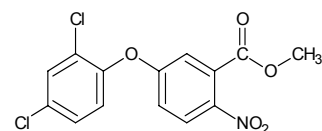
Došlo 15.8.08, přijato 8.9.08.

Klíčová slova: Bifenox, voltametrie, stříbrná pevná amalgámová elektroda

## Úvod

Bifenox (methyl 5-(2,4-dichlorfenoxy)-2-nitrobenzoát, CAS Name: methyl-5-(2,4-dichloro-phenoxy)-2-nitrobenzoate, CAS Registry number: 42576-02-3, viz obr. 1) patří do skupiny herbicidů odvozených od difenyletheru, jejichž herbicidní účinek spočívá v kompetitivní inhibici enzymu protoporphyrinogen oxidasy<sup>1</sup>. Je to látka neperzistentní (poločas rozkladu v půdě je 5–7 dní), avšak je prokázáno jeho cytotoxické<sup>2</sup>, hepatotoxické<sup>3</sup> a genotoxické<sup>4</sup> působení a je tedy potenciální škodlivinou i pro člověka stojícího na vrcholu potravního řetězce. Právě z těchto důvodů je potřebné hledat metody stanovení jeho stopových množství v pitné i povrchové vodě a v potravinách rostlinného i živočišného původu.

Z analytických metod převládá pro stanovení Bifenoxu plynová chromatografie<sup>5–15</sup>. Nejužívanějším detektorem je detektor hmotnostní, ale použít lze i jiné detektory (např. ECD, AED, NPD). Druhou nejběžnější metodou je chromatografie kapalinová<sup>16–21</sup>. Využívá se systému s obrácenými fázemi a hmotnostního detektoru či UV detekce (převážně detektoru s diodovým polem). Pozornost byla věnována i TLC (cit.<sup>22</sup>) a RP-HPTLC (cit.<sup>23</sup>).



Obr. 1. Strukturální vzorec Bifenoxu

Přítomnost nitroskupiny v molekule Bifenoxu a její snadná redukovatelnost umožňují stanovení tohoto herbicidu elektrochemickými metodami, jejichž výhodami oproti mnohem populárnějším metodám chromatografickým jsou např. nižší pořizovací i provozní náklady a možnost stanovení ve velmi širokém koncentračním rozmezí od  $10^{-3}$  do  $10^{-12}$  mol  $l^{-1}$ . Elektrochemické chování Bifenoxu bylo již dříve sledováno pomocí DC polarografie a cyklické voltametrie<sup>24,25</sup> na rtuťových elektrodách. Jako základní elektrolyty byly použity tetraalkylamonium hexafluorofosfáty v acetonitrilu či dimethylsulfoxidu. Za těchto podmínek dochází k jednoelektronové reverzibilní redukci nitroskupiny na radikál-anion následované při negativnějších potenciálech třielektronovou ireverzibilní redukcí radikál-aniontu na hydroxylaminoderivát. Druhá redukce je silně ovlivněna koncentrací a typem tetraalkylamoniového kationtu základního elektrolytu. S rostoucí velikostí kationtu dochází k posunu půlvolného potenciálu redukce k negativnějším hodnotám a totéž platí pro zředěnější roztoky tetraalkylamonium hexafluorofosfátů. DC polarografii a diferenční pulsní polarografii na kapající rtuťové elektrodě (DME) byl studován vliv pH na chování Bifenoxu v prostředí 33% ethanolu. V rozmezí pH 2–12 byl Bifenox redukován v jedné čtyřelektronové vlně odpovídající redukci nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu. V kyselějším prostředí byla tato vlna doprovázena při negativnějších potenciálech dvouelektronovou vlnou redukce hydroxylaminoskupiny na aminoskupinu. V silně kyselém roztoku došlo k překryvu těchto dvou vln a Bifenox byl redukován pouze v jedné šestielektronové vlně<sup>26</sup>.

Ideálními elektrodami pro elektrochemické redukce jsou pochopitelně elektrody rtuťové, avšak obavy z toxicity rtuti a přísné ekologické a bezpečnostní předpisy vedou k vývoji nových elektrodových materiálů, mezi nimiž vynikají netoxické pevné amalgámové elektrody<sup>27,28</sup>, které se již dříve osvědčily při voltametrickém stanovení stopových množství různých pesticidů a dalších ekotoxických a genotoxických látek<sup>29–37</sup>. Cílem této práce bylo nalezení optimálních podmínek pro stanovení mikromolárních a submikromolárních koncentrací Bifenoxu pomocí diferenční pulsní voltametrie (DPV) na stříbrné pevné

\* Dana Cabalková tuto práci úspěšně prezentovala v soutěži O cenu firmy Merck 2008 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

amalgámové elektrodě modifikované rtuťovým meniskem (m-AgSAE) s co nejnižší mezi stanovitelností.

## Experimentální část

### Reagencie

Zásobní roztok Bifenoxu (methyl-5-(2,4-dichlor-fenoxy)-2-nitrobenzoát, 99%, Sigma-Aldrich, Německo) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 0,0342 g látky ve 100 ml methanolu za pomoci ultrazvuku.

Brittonovy-Robinsonovy (BR) pufrů o potřebném pH byly připraveny smísením  $0,2 \text{ mol l}^{-1}$  NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci  $0,04 \text{ mol l}^{-1}$  (všechny tyto chemikálie čistoty p. a., Lachema Brno, ČR). Hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005) (vše Jenway, Essex, Velká Británie).

### Aparatura

Při voltametrických měřeních byl použit počítačem řízený systém Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 2.0, (Polaro-Sensors, Praha, ČR). Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla stříbrná pevná amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem (Polaro-Sensors, ČR) o průměru amalgámového disku  $520 \mu\text{m}$ . Jako referentní elektroda sloužila elektroda argentchloridová ( $3 \text{ mol l}^{-1}$  KCl) a jako pomocná byla použita platinová drátková elektroda. Při DP voltametrické byla používána polarizační rychlost  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , pulsy o šířce 100 ms a modulační amplituda  $-50 \text{ mV}$ . Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 řízeném počítačem pomocí ovládacího programu UV-Visible ChemStation verze 9.01 (Agilent, USA) v křemenných květech měrné tloušťky 1 mm.

### Pracovní postupy

Při voltametrických měřeních bylo do odměrné baňky na 10 ml odměřeno příslušné množství roztoku Bifenoxu v methanolu, 1 ml BR pufru o příslušném pH a roztok byl doplněn po rysku methanolem. Takto připravený roztok byl po promíchání převeden do polarografické nádoby a zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Následně byl proveden záznam voltametrické křivky. Všechny křivky byly měřeny třikrát a poté statisticky vyhodnoceny. Mez stanovitelnosti ( $L_Q$ ) byla počítána programem ADSTAT, který ji počítá pomocí hodnoty signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního grafu dostatečně malá a rovná číslu 0,1 (cit.<sup>38</sup>). Všechna měření probíhala za laboratorní teploty.

V rámci měření byly s pracovní elektrodou prováděny tři operace, kterými byl obnovován její povrch:

**Amalgamace:** Byla prováděna jednou týdně nebo když se vyskytly komplikace s reprodukovatelností či citlivostí měření. Ponořením dolní části elektrody do lahvičky s kapalnou rtuťí a intenzivním mícháním lahvičkou po dobu asi 15 s se obnovil na povrchu elektrody rtuťový meniskus.

**Elektrochemická aktivace:** Byla prováděna vždy na začátku pracovního dne, po přestávce v měřeních, která byla delší než 1 hodina a po amalgamací. Provádí se v roztoku  $0,2 \text{ mol l}^{-1}$  KCl, který není probubláván dusíkem při vloženém napětí  $-2200 \text{ mV}$  po dobu 300 s. V jejím průběhu dochází k odstranění oxidů a adsorbovaných látek z povrchu elektrody, čímž se zlepšuje citlivost a opakovatelnost následných měření.

**Regenerace:** Provádí se v analyzovaném roztoku před každým měřením a spočívá ve skokovém střídání kladnějších  $E_{\text{reg}}^1$  a zápornějších  $E_{\text{reg}}^2$  potenciálů daných použitým základním elektrolytem a stanovovanou látkou, v intervalu 0,05 s po dobu 25 s. Optimální hodnotu  $E_{\text{reg}}^1$  a  $E_{\text{reg}}^2$  je pro každou látku nutno najít experimentálně.

## Výsledky a diskuse

Nejprve byla spektrofotometricky sledována stálost zásobního roztoku Bifenoxu v methanolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ , jehož absorbance byla měřena při vlnové délce 285 nm, kde měla studovaná látka absorpční maximum. Hodnota molárního absorpčního koeficientu ( $\epsilon$ ) při této vlnové délce činila  $8,35 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$ . Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v tab. I, z níž je patrné, že zásobní roztok Bifenoxu v methanolu je při uchovávání za nepřístupu světla stálý nejméně po dobu 5 měsíců, neboť za tuto dobu nedošlo ke statisticky významnému poklesu absorbance.

Při hledání vhodného prostředí pro voltametrická měření byla spektrofotometricky sledována stálost Bifenoxu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v 50% methanolu. Výsledky jsou shrnuty v tab. II, z níž je patrné, že 50% methanol není vhodný vzhledem k výraznému poklesu absorbance po 15 minutách, což zřejmě souvisí s vylučováním této obtížně rozpustné látky z daného roztoku. Naproti tomu v 90% methanolu je již Bifenox dostatečně stálý, neboť v průběhu 60 min nedošlo k poklesu absorbance.

Stálost roztoku Bifenoxu v 90% methanolu byla následně sledována pomocí tast polarografie na kapající rtu-

Tabulka I

Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku Bifenoxu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  v methanolu při vlnové délce 285 nm. Měřeno proti methanolu v křemenných květech měrné tloušťky 1 mm

$t$ , dny	0	7	24	84	122	161
$A_{285}$	0,835	0,841	0,829	0,840	0,838	0,833

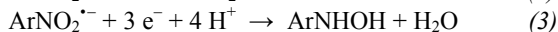
Tabulka II

Spektrofotometrické studium stálosti roztoku Bifenoxu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v 50% a 90% methanolu při vlnové délce 285 nm. Měřeno proti 50% či 90% methanolu v křemenných květách měrné tloušťky 1 mm

$t$ , min	0	5	10	15	20	30	40	50	60
$A_{285}$ v 50% MeOH	0,075	0,070	0,048	0,031	–	–	–	–	–
$A_{285}$ v 90% MeOH	0,076	0,077	0,076	0,077	0,077	0,077	0,076	0,076	0,076

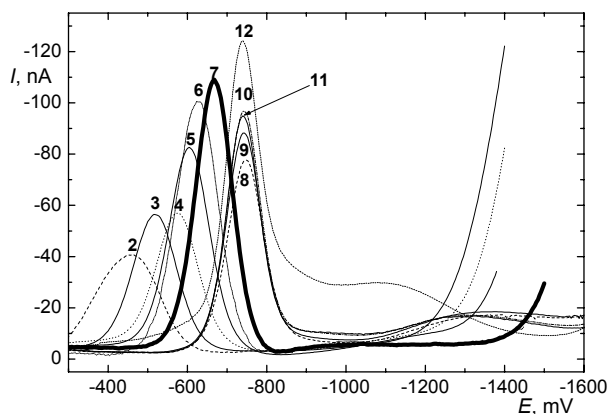
ťové elektrodě při pH použitého pufru 2, 7 a 12. (Do 10 ml odměrné baňky byl odměřen 1 ml zásobního roztoku Bifenoxu ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ), 1 ml BR pufru o příslušném pH a roztok byl po rysku doplněn methanolem). Výsledky shrnuté v tab. III potvrzují stálost Bifenoxu při všech sledovaných pH, a proto bylo pro další měření zvoleno prostředí 90% methanolu.

Vliv pH na chování Bifenoxu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) při DPV na m-AgSAE byl sledován v prostředí methanol – BR pufr (9:1) o pH použitého pufru 2–12. Získané voltamogramy jsou na obr. 2. V kyselém a neutrálním prostředí poskytuje látka jeden pík, který se s rostoucím pH posouvá k negativnějším hodnotám. Od pH 8 je patrný další pík při negativnějším potenciálu. Při pH 8–12 je potenciál obou píků na pH nezávislý. Zjištěné závislosti potenciálů píků  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  jsou uvedeny na obr. 3. Lze předpokládat, že pík v kyselém prostředí odpovídá ireverzibilní čtyřelektronové redukci nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu (rov. (1)). V alkalickém prostředí byl pozorován odlišný redukční mechanismus, kdy látka poskytovala dva píky, jejichž potenciály jsou na pH nezávislé. V souladu s literaturou<sup>39,40</sup> byly tyto píky připsány jednoelektronovému a tříelektronovému kroku podle rov. (2) a (3).



V tomto případě první krok (rov. (2)) zahrnuje rychlé reverzibilní přijetí jednoho elektronu za vzniku radikál-aniontu, druhým krokem je pomalá tříelektronová ireverzibilní redukce (rov. (3)). Rychlost určujícím krokem v rov.

(3) a (1) je přijetí druhého elektronu za vzniku nitrosoaniontu, buď přímo, nebo po předchozí protonizaci radikál-aniontu. Proto je pořadí přijímání elektronů a protonů v obou krocích silně závislé na použitém základním elektrolytu, stejně jako na struktuře dané nitrosloženiny. Stabilita radikál-aniontu vzniklého podle rov. (2) je zvýšena v prostředí s nedostatkem volných protonů nutných pro průběh reakce (3), jako je tomu v aprotických rozpouštědlech nebo právě ve vodně-methanolicím alkalickém



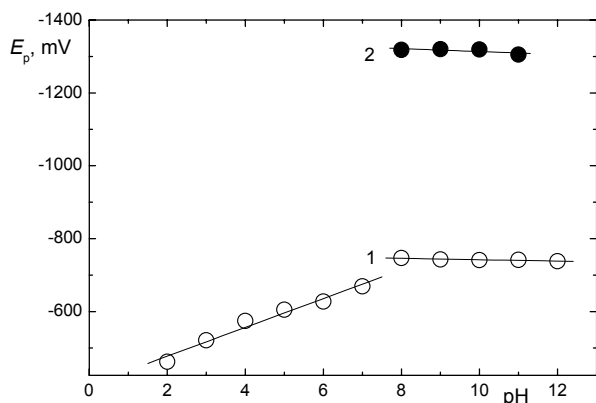
Obr. 2. Voltamogramy Bifenoxu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 2–12 (9:1). Číslo nad píky odpovídají hodnotě pH použitého pufru

Tabulka III

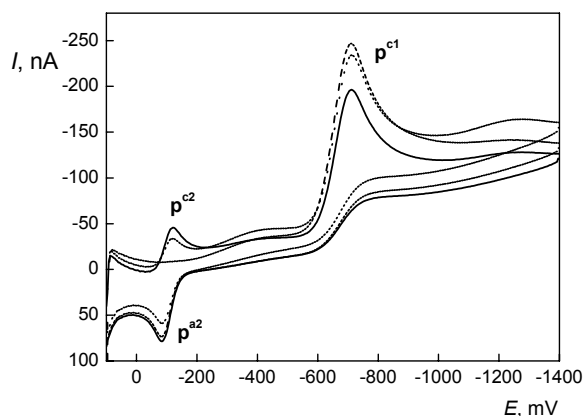
Tast polarografické studium stálosti roztoku Bifenoxu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v 90% methanolu při pH použitého pufru 2, 7 a 12

$t$ , min	pH 2		pH 7		pH 12	
	$-E_{1/2}$ , mV	$-I_{\text{lim}}$ , nA	$-E_{1/2}$ , mV	$-I_{\text{lim}}$ , nA	$-E_{1/2}$ , mV	$-I_{\text{lim}}$ , nA
0	447	690	807	705	814	852
10	450	690	807	705	813	852
20	451	691	804	706	810	852
30	451	690	800	705	811	852
40	446	690	804	706	811	853
50	448	691	800	705	813	853
60	446	691	800	706	811	852





Obr. 3. Závislost potenciálu prvního píku (1) a druhého píku (2) Bifenoxu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na pH použitého pufru. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 2–12 (9:1)

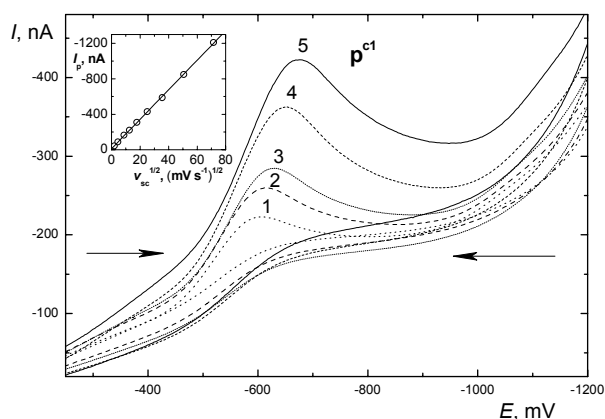


Obr. 4. Cyklické voltamogramy Bifenoxu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 7 (9:1). 1. (---), 2. (····) a 12. (—) scan. Rychlost změny potenciálu  $100 \text{ mV s}^{-1}$

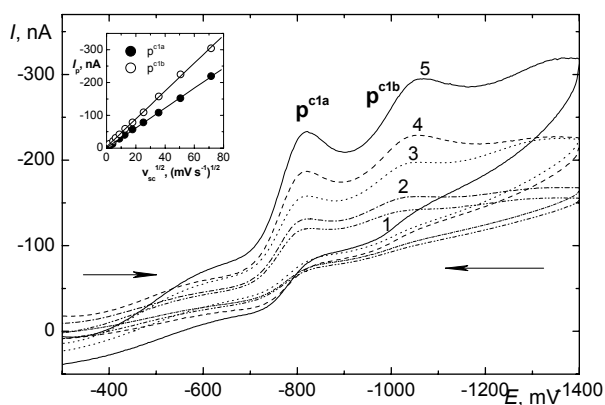
prostředí. Na základě těchto skutečností je pochopitelná závislost potenciálu píku čtyřelektronové redukce nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu v kyselém a neutrálním prostředí na pH (obr. 3). Potenciál se posouvá směrem k zápornějším hodnotám s rostoucím pH, neboť rychlost určujícím krokem redukce je přijetí druhého elektronu, kterému v této oblasti pH předchází přijetí protonu. S rostoucím pH vede inhibice protonizace k rozdělení píku a nakonec je od pH 8 potenciál píku na pH nezávislý, protože jednoelektronová redukce  $\text{ArNO}_2$  na  $\text{ArNO}_2^{\cdot-}$  je rychlá a nevyžaduje protony. Konstantní potenciál druhého píku (a jeho separace) je zřejmě způsoben tím, že radikálový anion  $\text{ArNO}_2^{\cdot-}$  vzniklý v prvním kroku není pro nedostatek protonů protonizován a sám, v neprotonizované

formě (tedy bez závislosti na pH), se dále redukuje až při negativnějším potenciálu na dianion, který si protonizaci již vynutí. Takto vzniklý meziprodukt dihydroxylamin  $\text{ArN}(\text{OH})_2$  pak velmi rychle dehydratuje za vzniku nitroso-sloučeniny,  $\text{ArNO}$ , jejíž redukční potenciál je pozitivnější než redukční potenciál výchozí nitroso-sloučeniny  $\text{ArNO}_2$  a výsledkem dvouelektronové redukce je hydroxylamin  $\text{ArNHOH}$ .

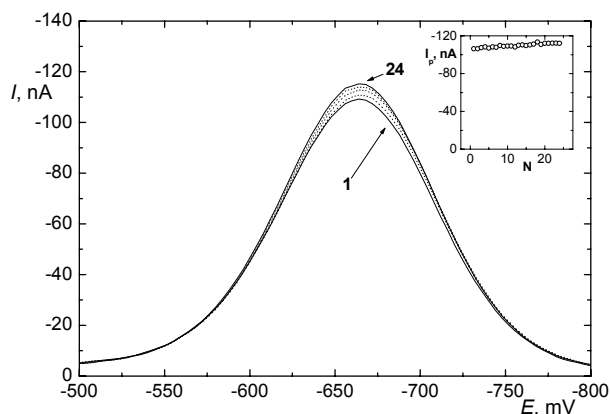
Dále bylo zkoumáno elektrochemické chování Bifenoxu na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 2, 7 a 12 (9:1) pomocí cyklické voltametrie. Obr. 4 ukazuje cyklický voltamogram získaný při pH 7. V prvním dopředném scanu je patrný katodický pík  $p^{c1}$  odpovídající čtyřelektronové ireverzibilní redukci nitroskupiny na hydroxyl-



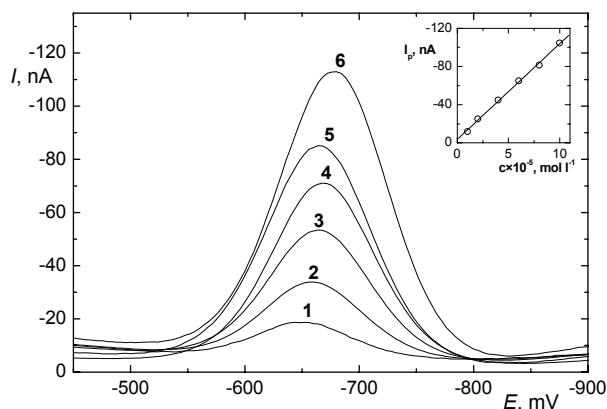
Obr. 5. Vybrané voltamogramy Bifenoxu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 2 (9:1). Polarizační rychlost: 20 (1), 40 (2), 80 (3), 160 (4) a 320 (5)  $\text{mV s}^{-1}$ . Vložená závislost proudů katodického píku  $p^{c1}$  na odmocnině z rychlosti polarizace



Obr. 6. Vybrané voltamogramy Bifenoxu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 12 (9:1). Polarizační rychlost: 20 (1), 40 (2), 80 (3), 160 (4) a 320 (5)  $\text{mV s}^{-1}$ . Vložená závislost proudů katodických píků  $p^{c1a}$  a  $p^{c1b}$  na odmocnině z rychlosti polarizace

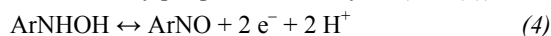


Obr. 7. Voltamogramy Bifenoxu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 7 (9:1). Regenerační parametry:  $E_{\text{reg}}^1 = -200 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,05 \text{ s}$ ,  $E_{\text{reg}}^2 = -1550 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,05 \text{ s}$ , 250 skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1$  a  $E_{\text{reg}}^2$ . Pořadové číslo měření: 1 (–), 4 (⋯), 7 (⋯), 11 (⋯), 15 (⋯), 19 (⋯), 24 (–). Vložená závislost proudu piku  $I_p$  na počtu měření  $N$



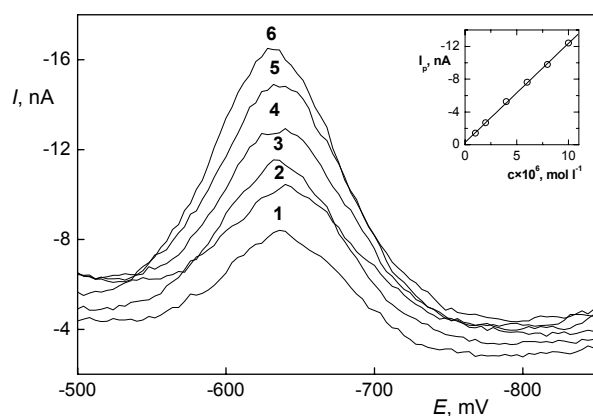
Obr. 8. Voltamogramy Bifenoxu měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 7 (9:1). Parametry regenerace m-AgSAE – viz obr. 7. Koncentrace Bifenoxu [ $\text{mol l}^{-1}$ ]:  $1 \cdot 10^{-5}$  (1),  $2 \cdot 10^{-5}$  (2),  $4 \cdot 10^{-5}$  (3),  $6 \cdot 10^{-5}$  (4),  $8 \cdot 10^{-5}$  (5),  $1 \cdot 10^{-4}$  (6). Vložená je kalibrační závislost proudu piku  $I_p$  na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$

aminoskupinu (rov. (1)). Anodický pík  $p^{a2}$  při zpětném scanu odpovídá dvouelektronové reverzibilní oxidaci hydroxylaminoskupiny na nitrososkupinu, zpětné reakci pak odpovídá katodický pík  $p^{c2}$  v druhém cyklu (rov. (4)).



Ze zjištěné přímé úměrnosti výšky katodického piku  $p^{c1}$  odmocnině z rychlosti polarizace při pH 2 (viz obr. 5) vyplývá, že redukce nitrososkupiny na hydroxylaminoskupinu je řízena difuzí. Totéž bylo potvrzeno i při pH 7 a pH 12, kde však jsou z dříve diskutovaných důvodů pozorovány dva píky  $p^{c1a}$  a  $p^{c1b}$  (viz obr. 6).

Z analytického hlediska byl nejvyšší, nejlépe vyvinutý a nejsnáze vyhodnotitelný pík získán při pH použitého pufru 7, a proto bylo pro další měření zvoleno jako vhodné prostředí směs methanol – BR pufr o pH 7 (9:1). Opakovaným měřením roztoku Bifenoxu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 2, 7 a 12 (9:1) byla sledována možná pasivace povrchu elektrody. Před prvním měřením byla prováděna aktivace a před každým měřením regenerace elektrody. Opakovatelnost signálu Bifenoxu dokumentuje obr. 7. Byly použity experimentálně optima-

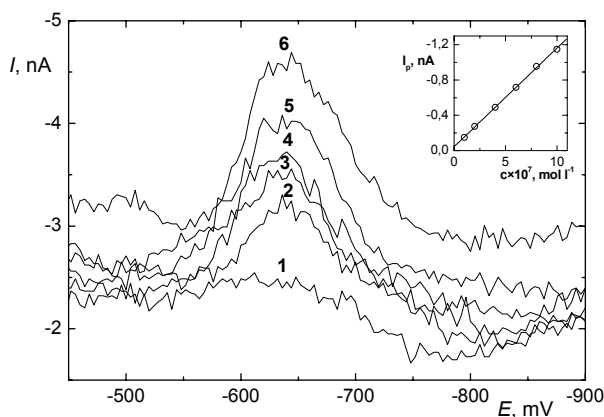


Obr. 9. Voltamogramy Bifenoxu měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 7 (9:1). Parametry regenerace m-AgSAE – viz obr. 7. Koncentrace Bifenoxu [ $\text{mol l}^{-1}$ ]:  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5),  $1 \cdot 10^{-5}$  (6). Vložená je kalibrační závislost proudu piku  $I_p$  na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$

Tabulka IV

Parametry kalibračních přímk pro stanovení Bifenoxu metodou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 7 (9:1)

$c$ [ $\text{mol l}^{-1}$ ]	Směrnice [ $\text{nA mol}^{-1} \text{ l}$ ]	Úsek [nA]	korelační coefficient	koefi- cient	$L_Q$ [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$-1,00 \cdot 10^6$	-3,8	0,9987	–	–
$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	$-1,21 \cdot 10^6$	-0,3	0,9997	–	–
$(1 - 10) \cdot 10^{-7}$	$-1,19 \cdot 10^6$	-0,7	0,9995	–	$2,4 \cdot 10^{-7}$



Obr. 10. Voltamogramy Bifenoxu měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 7 (9:1). Parametry regenerace m-AgSAE – viz obr. 7. Koncentrace Bifenoxu [mol l<sup>-1</sup>]: 1·10<sup>-7</sup> (1), 2·10<sup>-7</sup> (2), 4·10<sup>-7</sup> (3), 6·10<sup>-7</sup> (4), 8·10<sup>-7</sup> (5), 1·10<sup>-6</sup> (6). Vložená je kalibrační závislost proudu piku I<sub>p</sub> na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí 1·10<sup>-6</sup>–1·10<sup>-7</sup> mol l<sup>-1</sup>

lizované regenerační potenciály:  $E_{reg}^1 = -200$  mV a  $E_{reg}^2 = -1550$  mV. Tyto potenciály byly automaticky vkládány na m-AgSAE po dobu  $t_{reg} = 0,05$  s. Celkový počet skoků mezi těmito potenciály byl 250. Hodnota relativní směrodatné odchylky (RSD) je za těchto podmínek 3 % (pH 2), 1,9 % (pH 7) a 1,5 % (pH 12).

V nalezeném optimálním prostředí tj. ve směsi methanol – BR pufr o pH 7 (9:1) byly metodou DPV na m-AgSAE proměřeny koncentrační závislosti v rozmezí 1·10<sup>-7</sup> až 1·10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>. Naměřené voltamogramy pro jednotlivá koncentrační rozmezí jsou zobrazeny na obr. 8–10. Získané závislosti výšky piků na koncentraci Bifenoxu jsou lineární, příslušné parametry kalibračních přímek a dosažená mez stanovitelnosti  $L_Q$  jsou uvedeny v tabulce IV.

## Závěr

Bylo prostudováno chování Bifenoxu při diferenční pulsní voltametii na m-AgSAE a byly nalezeny optimální podmínky pro jeho stanovení v koncentračním rozmezí 1·10<sup>-4</sup> – 1·10<sup>-7</sup> mol l<sup>-1</sup> v prostředí methanol – BR pufr o pH 7 (9:1). Zároveň byl prozkoumán charakter elektrochemického chování Bifenoxu na m-AgSAE pomocí cyklické voltametrie na této elektrodě. V současné době je věnována pozornost dalšímu zvýšení citlivosti a selektivity tohoto stanovení pomocí předběžné separace a prekoncentrace stanovené látky extrakcí tuhou fází.

*Tento výzkum byl finančně podporován Grantovou agenturou České republiky (grant 203/07/1195) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekty LC06035 a MSM 0021620857).*

## LITERATURA

- Matringe M., Camadro J.-M., Labbe P., Scalla R.: *Biochem. J.* 260, 231 (1989).
- Šiviková K., Buleca J., Jr.: *Biologia (Bratislava)* 54, 321 (1999).
- Šiviková K., Dianovský J.: *Mutat. Res.* 439, 129 (1999).
- Ohno Y., Miyajima A., Sunouchi M.: *Toxicol.Lett.* 102-103, 569 (1998).
- Tanabe A., Mitobe H., Kawata K., Sakai M.: *J. Chromatogr., A* 754, 159 (1996).
- Tanabe A., Mitobe H., Kawata H., Sakai M., Yasuhara A.: *J. AOAC Int.* 83, 61 (2000).
- Fillion J., Sauvé F., Selwyn J.: *J. AOAC Int.* 83 698 (2000).
- Kawata K., Asada T., Oikawa K., Tanabe A.: *J. AOAC Int.* 88, 1440 (2005).
- Hu X., Jianxin Y., Zhigang Y., Lansun N., Yanfei L., Peng W., Jing L., Xin H., Xiaogang Ch., Yibin Z.: *J. AOAC Int.* 87, 972 (2004).
- Nakamura S., Daishima S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 99 (2005).
- Chu X.-G., Hu X.-Z., Yao H.-Y.: *J. Chromatogr., A* 1063, 201 (2005).
- Stan H.-J.: *J. Chromatogr., A* 892, 347 (2000).
- Stan H.-J., Linkerhägner M.: *J. Chromatogr., A* 750, 369 (1996).
- Ono Y., Yamagami T., Nishina T., Tobino T.: *Anal. Sci.* 22, 1473 (2006).
- Klöppel H., Haider J., Hoffmann C., Lüttecke B.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 344, 42 (1992).
- Junker-Buchheit A., Witzzenbacher M.: *J. Chromatogr., A* 737, 67 (1996).
- Klöppel H., Haider J., Hoffman C., Lüttecke B.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 344, 42 (1992).
- Laganà A., Fago G., Fasciani L., Marino A., Mosso M.: *Anal. Chim. Acta* 414, 79 (2000).
- Sheu H.-L., Sung Y.-H., Melwanki M. B., Huang S.-D.: *J. Sep. Sci.* 29, 2647 (2006).
- Diez C., Traag W. A., Zommer P., Marinero P., Atienza, J.: *J. Chromatogr., A* 1131, 11 (2006).
- Laganà A., Bacaloni A., De Leva I., Faberi A., Fago G., Marino A.: *Anal. Chim. Acta* 462, 187 (2002).
- Eastin E. F.: *J. Chromatogr., A* 124, 422 (1976).
- Babić S., Horvat A. J. M., Kaštelan-Macan M.: *J. Planar Chromatogr.* 18, 112 (2005).
- Hromadová M., Mořkovská P., Pospíšil L., Giannarelli S.: *J. Electroanal. Chem.* 582, 156 (2005).
- Mořkovská P., Hromadová M., Pospíšil L., Giannarelli S.: *Langmuir* 22, 1896 (2006).
- Rupp E., Zhong Q., Zuman P.: *Electroanalysis* 4, 11 (1992).
- Barek J., Fischer J., Navrátil T., Pecková K., Yosypchuk B.: *Sensors* 6, 445 (2006).
- Yosypchuk B., Barek J.: *Chem. Listy*, v tisku.
- Barek J., Dodova E., Navratil T., Yosypchuk B., Novotny L., Zima J.: *Electroanalysis* 15, 1778 (2003).

30. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 2003 (2007).
31. Vankova L., Maixnerova L., Cizek K., Fischer J., Barek J., Navratil T., Yosypchuk B.: *Chem. Listy* 100, 1105 (2006).
32. Daňhel A., Pecková K., Čížek K., Barek J., Zima J., Yosypchuk B., Navrátil T.: *Chem. Listy* 101, 144 (2007).
33. Novotný V., Barek J.: *Chem. Listy*, v tisku.
34. Jiranek I., Peckova K., Kralova Z., Moreira J. C., Barek J.: *Electrochim Acta*, v tisku.
35. Fischer J., Barek J., Yosypchuk B., Navratil T.: *Electroanalysis* 18, 127 (2006).
36. Fischer J., Vanourková L., Danhel A., Vyskocil V., Cizek K., Barek J., Peckova K., Yosypchuk B., Navratil T.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 2, 226 (2007).
37. Yosypchuk B., Navratil T., Barek J., Peckova K., Fischer J., v knize: *Progress on Drinking Water Research* (Lefebvre M. H., Roux M. M., ed.). Nova Science Publishers, New York 2008, v tisku.
38. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*, FINISH, Pardubice 1992.
39. Fields M., Valle C. Jr., Kane M.: *J. Amer. Chem. Soc.* 71, 421 (1949).
40. McIntire G. L., Chiappardi D. M., Casselberry R. L., Blount H. N.: *J. Phys. Chem.* 86, 2632 (1982).

**D. Cabalková<sup>a</sup>, J. Barek<sup>a</sup>, J. Fischer<sup>a</sup>, T. Navrátil<sup>b</sup>, K. Pecková<sup>a</sup>, and B. Yosypchuk<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Charles University, Prague*, <sup>b</sup> *J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Voltammetric Determination of Herbicide Biphenox on Mercury-Meniscus-Modified Solid Silver Amalgam Electrode**

Optimum conditions are described for the determination of micromolar and submicromolar concentrations of herbicide Biphenox by differential pulse voltammetry (DPV) on non-toxic solid silver amalgam electrode modified with mercury meniscus in aqueous methanolic (9:1) Britton-Robinson buffer (pH 7). The limit of quantification is  $2.4 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Cyclic voltammetry with the same working electrode was used to clarify the mechanism of the electrode reaction.

## NOVĚ IDENTIFIKOVANÉ FENOLICKÉ LÁTKY V PARAZITICKÝCH ROSTLINÁCH *Cuscuta europaea* A *Cuscuta campestris*

PETRA HŘIBOVÁ<sup>a\*</sup>, MILAN ŽEMLIČKA<sup>a</sup>,  
TOMÁŠ BARTL<sup>b</sup> a EMIL ŠVAJDLENKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav přírodních léčiv, <sup>b</sup> Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno  
cerfpatolog@seznam.cz

Došlo 3.7.08, přijato 19.9.08.

Klíčová slova: *Cuscuta europaea*, *Cuscuta campestris*, HPLC, fenolické látky

### Úvod

Rostliny rodu *Cuscuta* (kokotice) jsou řazeny do čeledi Scutellariaceae. Jde o jednoleté stonkovité parazitující byliny, většinou bez vlastního chlorofylu. Dospělý jedinec má nitkovité oranžové nebo žluté stonky, které se omotávají kolem hostitelských rostlin. Kontakt s hostitelem je zajištěn pomocí haustorií, která pronikají do pletiv hostitele a tak zajišťují výživu rostliny. Rostlina je zcela závislá na svém hostiteli, po vyklíčení semene ho musí nalézt do 5 až 10 dnů, jinak umírá<sup>1</sup>.

Rod *Cuscuta* zahrnuje asi 150 druhů a je rozšířen celosvětově s výjimkou nejméně chladnějších oblastí<sup>2</sup>. *C. chinensis* Lam. (kokotice čínská) je hojně využívána v čínském lidovém léčitelství při léčbě onemocnění jater a ledvin<sup>3</sup>, dále byly u methanolickeho extraktu ze semen této rostliny prokázány protirakovinové účinky<sup>4</sup>, u vodného extraktu imunostimulační a antioxidační účinky<sup>5</sup>.

Na území České republiky a Slovenska je hojně rozšířená *C. europaea* L. (kokotice evropská) a *C. campestris* Yuncker (kokotice ladní)<sup>1</sup>. Z nejvýznamnějších obsažených látek byly dosud identifikovány fenolické kyseliny zahrnující chlorogenovou kyselinu, 3,5-dikafeoylchinovou kyselinu, 4,5-dikafeoylchinovou kyselinu, dále flavonoidy kempferol, kempferol-3-*O*-galaktosid, kempferol-3-*O*-glukosid, kvercetin, kvercetin-3-*O*-galaktosid a kvercetin-3-*O*-glukosid<sup>6</sup>. Identifikace dalších látek ze skupiny fenolických kyselin a flavonoidů metodami HPLC a MS byla předmětem této práce.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Standard isorhamnetin-3-*O*-glukosid byl zakoupen u firmy Roth (Karlsruhe, Německo), standardy isorhamnetin, kávová kyselina, *p*-kumarová kyselina a rozpouštědla methanol, voda a acetonitril pro HPLC u firmy Merck (Darmstadt, Německo).

#### Rostlinný materiál

Sběr *C. europaea* parazitující na kopřivě (*Urticaceae*) byl proveden v červenci roku 2004 v České republice v blízkosti opevnění Stachelberg mezi městy Trutnov a Žaclěb, *C. campestris* parazitující na rdesnu (*Polygonaceae*) byla sbírána v červenci 2006 na Slovensku na jižním okraji města Vrábce. Identifikaci rostlinného materiálu provedl Ing. Peter Tóth, PhD. (Katedra ochrany rostlin Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre) a Ing. Milada Pízová (Ústav přírodních léčiv Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně).

#### Příprava vzorků

Rostlinný materiál (0,2 g) byl krátce po sběru lyofilizován, zmrazen kapalným dusíkem, rozdrcen na prášek a extrahován v 1 ml směsi methanol : voda (1:1). Extrakce byla podpořena ultrazvukem po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Po dekantaci a filtraci (filtr Millipore 0,45 μm) byly extrakty analyzovány pomocí HPLC metodou optimalizovanou pro analýzu polyfenolů.

#### Přístroje a použitá metoda

Měření byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 (Agilent Technologies), s DAD a hmotnostním detektorem 1100 Series LC/MSD Trap VL. Byla použita kolona ABZ+PLUS (Supelco, USA), 150 mm × 4,6 mm, 3 μm.

Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu (MeCN) a 40 mM mravenčí kyseliny (HCOOH). Gradient od 0 min 10 % MeCN a 90 % HCOOH, do 36 min na 100 % MeCN, další 4 min následovalo promývání kolony 100% MeCN. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml min<sup>-1</sup>, teplota kolony udržována na 30 °C. Použitá detekce DAD 254 nm. Hmotnostní spektra byla měřena v negativním módu. Zdroj iontů: ESI. Parametry iontové pasti: automatický MS2 mód, skenovací rychlost 13 000 m/z/s, tlak nebulizéru 483 kPa, průtok sušícího plynu 10 l min<sup>-1</sup>, teplota sušení 350 °C, cílová hmota 300 m/z, řízené množství iontů v iontové pasti 30 000, maximální akumulací čas 300 ms, skenovací rozsah 50–1000 m/z.

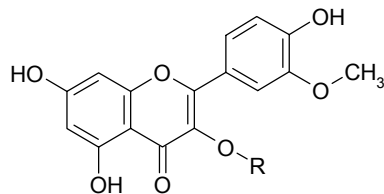
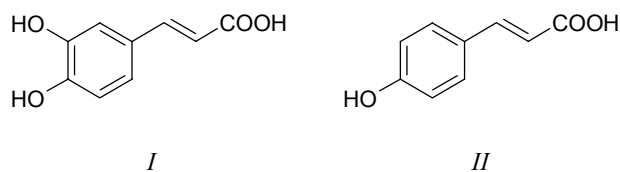
\* Petra Hřibová získala za tuto práci zvláštní cenu poroty v soutěži O cenu firmy Merck 2008.

## Výsledky a diskuse

Methanolické extrakty připravené z *C. europaea* a *C. campestris* byly podrobeny analýze HPLC, která v obou případech prokázala přítomnost celé řady fenolických látek. Sloučeniny byly identifikovány po separaci v analytické koloně srovnáním retenčních časů a UV-VIS spekter se standardy. Identifikace fenolů byla podpořena hmotnostní spektrometrií.

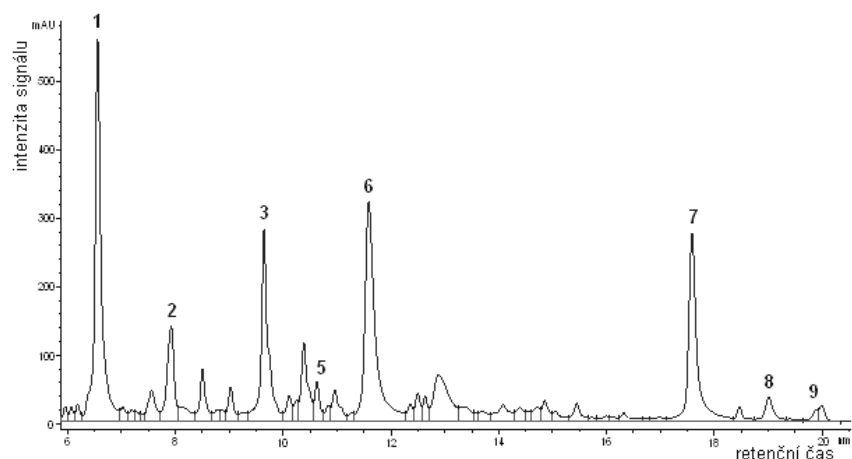
Na chromatografickém záznamu methanolického extraktu z *C. europaea* (obr. 1) se vyskytuje několik píků, z nichž dominantní odpovídá chlorogenové kyselině. Další významné píky odpovídají již dříve identifikovaným flavonoidům kempferolu, kvercetin, glukosidu a galaktosidu kvercetin. Intenzivní pik při 12 min je podle elektronového a hmotnostního spektra jedním z isomerů kyseliny dikafeoylchinové.

Nově byla v extraktu z *C. europaea* pomocí LC-MS v negativním módu nalezena kávová kyselina (I) s molekulovým iontem  $[M-H]^-$   $m/z$  179, *p*-kumarová kyselina

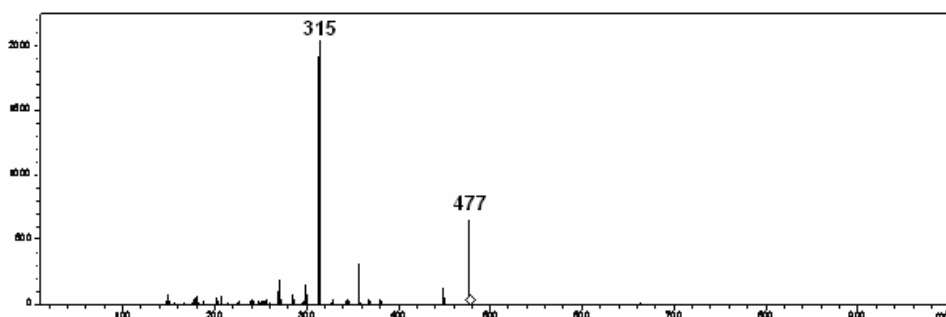


III R = H

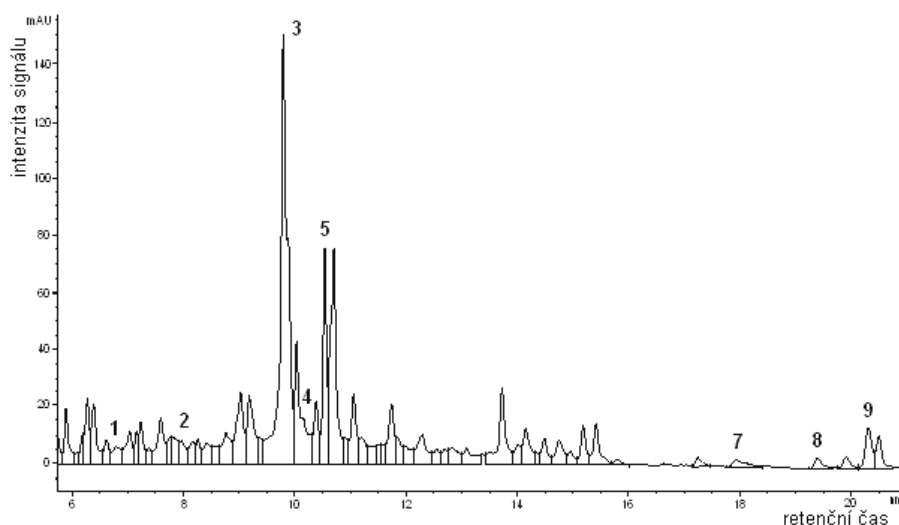
IV R = D-glukosyl



Obr. 1. Chromatogram extraktu *C. europaea*. (1) kyselina chlorogenová, (2) kyselina kávová, (3) směs kvercetin-3-*O*-galaktosidu a kvercetin-3-*O*-glukosidu, (5) isorhamnetin-3-*O*-glukosid, (6) blíže neurčená dikafeoylchinová kyselina, (7) kvercetin, (8) isorhamnetin, (9) kempferol. UV detekce při 254 nm



Obr. 2. Hmotnostní spektrum a fragmentace isorhamnetin-3-*O*-glukosidu (negativní mód). Aglykon isorhamnetin ( $[M-H]^-$   $m/z$  315) vznikl odtržením glukosy ( $m/z$  162) z molekulového iontu isorhamnetin-3-*O*-glukosidu ( $[M-H]^-$   $m/z$  477)



Obr. 3. Chromatogram extraktu *C. campestris*. (1) chlorogenová kyselina, (2) kávová kyselina, (3) směs kvercetin-3-*O*-galaktosidu a kvercetin-3-*O*-glukosidu, (4) *p*-kumarová kyselina, (5) isorhamnetin-3-*O*-glukosid, (7) kvercetin, (8) isorhamnetin, (9) kempferol. UV detekce při 254 nm

lina (II) s molekulovým iontem  $[M-H]^-$   $m/z$  163 a molekulový ion  $[M-H]^-$   $m/z$  315, který odpovídal isorhamnetinu (III). Jednoznačně byla potvrzena přítomnost isorhamnetinu po jeho izolaci společným nástřikem se standardem. Molekula s  $[M-H]^-$   $m/z$  477, jejíž fragmentací vznikly částice s  $m/z$  162 odpovídající hexose a fragment  $[M-H]^-$   $m/z$  315 odpovídající aglykonu isorhamnetinu, je zřejmě isorhamnetin-hexosid (obr. 2). Po porovnání se standardem byla sloučenina identifikována jako isorhamnetin-3-*O*-glukosid (IV).

V extraktu z *C. campestris* (obr. 3) byla rovněž nalezena kávová kyselina, *p*-kumarová kyselina, isorhamnetin a isorhamnetin-3-*O*-glukosid. Methanolický extrakt z *C. campestris* se od extraktu z *C. europaea* kvalitativně lišil hlavně v obsahu polárnějších látek, kdy extrakt z *C. campestris* obsahoval širší spektrum látek s aromatickým kruhem než extrakt z *C. europaea*.

## Závěr

V methanolickém extraktu z rostlin rodu *Cuscuta* byla vedle několika již známých látek ze skupiny fenolických kyselin nově identifikována kávová kyselina, *p*-kumarová kyselina a ze skupiny flavonoidů isorhamnetin a isorhamnetin-3-*O*-glukosid. Je pravděpodobné, že právě tyto látky jsou zodpovědné za biologickou aktivitu extraktů z různých druhů *Cuscuta*.

*Naše poděkování patří Ing. Petru Tóthovi, PhD. a Ing. Miladě Pízové za identifikaci rostlinného materiálu a PharmDr. Karlu Šmejkalovi, Ph.D. za pečlivé přečtení rukopisu.*

## LITERATURA

1. Cagaň L., Tóth P.: *Metodika ochrany proti parazitickým burinám z rodu kukučína v agroekosystémech Slovenska*. SPU Nitra, Nitra 2005.
2. Holm L., Pancho J. V., Herberger J. P., Plucknett D. L.: *A Geographical Atlas of World Weeds*. John Wiley & Sons, New York 1979.
3. Ye M., Yan Y. N., Guo D. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1469 (2005).
4. Umehara K., Nemoto K., Ohkubo T., Miyase T., Degawa M., Noguchi H.: *Planta Med.* 70, 299 (2004).
5. Bao X., Wang Z., Fang J., Li X.: *Planta Med.* 68, 237 (2002).
6. Löffler C., Czygan F. C., Proksch P.: *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 297 (1997).

**P. Hřibová<sup>a</sup>, M. Žemlička<sup>a</sup>, T. Bartl<sup>b</sup>, and E. Švajdlenka<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Natural Drugs*, <sup>b</sup> *Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Newly Identified Phenolic Compounds in Parasitic Plants *Cuscuta europaea* and *Cuscuta campestris***

*Cuscuta europaea* and *Cuscuta campestris* (Cuscutaceae) are annual parasitic plants which wrap around host plants and penetrate their tissues using haustoria. There are more than 150 species of *Cuscuta* worldwide; *C. europaea* and *C. campestris* are the most common species in the Czech Republic and Slovakia. In this study phenolics were identified in methanolic extracts of these species by HPLC and MS. Among others, caffeic acid, *p*-coumaric acid, isorhamnetin and isorhamnetin 3-*O*-glucoside were found in the extracts.

# PŘÍPRAVA SERS-AKTIVNÍCH MĚDĚNÝCH SUBSTRÁTŮ KATODICKOU REDUKCÍ A VYHODNOCENÍ JEJICH STRUKTURY POMOCÍ MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL

ALŽBĚTA KOKAISLOVÁ<sup>a\*</sup>, SOŇA  
BRÁZDOVÁ<sup>a</sup>, VADYM PROKOPEC<sup>a</sup>,  
MARTIN ČLUPEK<sup>a</sup>, JITKA ČEJKOVÁ<sup>b</sup>  
a PAVEL MATĚJKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, <sup>b</sup> Ústav chemického inženýrství,  
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická  
5, 166 28 Praha 6  
alzbeta.kokaislova@seznam.cz

Došlo 3.7.08, přijato 2.12.08.

Klíčová slova: spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu, měděný SERS-aktivní substrát, samoskladná monovrstva, mikroskopie atomárních sil

## Úvod

Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (angl. surface enhanced Raman scattering – SERS spectroscopy) je analytická metoda využívající zvýšení intenzity signálů Ramanova rozptylu při interakci elektromagnetického záření s molekulami, které se nacházejí v blízkosti nanostrukturovaného povrchu některých kovů. Citlivost této metody je dostatečná pro studium filmů a monovrstev organických látek vázaných na površích kovů.

Mechanismus SERS-efektu nebyl dosud plně objasněn. S vysokou pravděpodobností jde o kombinaci elektromagnetického a chemického (molekulárně-rezonančního) zesílení, přičemž elektromagnetické zesílení má na celkovém zesílení větší podíl<sup>1</sup>.

Pro dosažení optimálního zesílení signálu je podstatné, aby povrch kovového substrátu byl nanostrukturní. Pro přípravu těchto povrchů lze použít mnoho různých postupů, např. vakuové napaření nebo naprášení jemných částic kovů na mikrostrukturovaný povrch z vhodného materiálu (křemík) nebo elektrochemické metody, jako cyklická voltametrie (angl. oxidation-reduction cycles – ORC)<sup>2</sup>, nebo vytvoření nanostrukturovaného kovového povlaku na

hladkém kovovém povrchu katodickou redukcí kovu z lázně vhodného složení při vhodném proudu<sup>3</sup>.

Míra zesílení signálu se u různých kovů, které tvoří povrch SERS-aktivního substrátu, liší. Nejintenzivnějšího zesílení je dosaženo, pokud je frekvence oscilací elektronů v povrchu kovu blízká frekvenci excitačního laserového záření. Pro excitační záření ve viditelné a blízké infračervené oblasti je tato podmínka nejlépe splněna u substrátů, jejichž povrch je připraven ze zlata, stříbra<sup>4</sup> nebo mědi<sup>5</sup>.

Pro ověření SERS-aktivity je na povrch kovového substrátu nanesen modelový analyt. U zlatých, stříbrných a měděných substrátů jsou nejčastěji používány sloučeniny, jejichž molekuly obsahují thioskupiny –SH. Tyto látky se váží ke kovovému povrchu prostřednictvím kovalentní vazby síra-kov. Na povrchu kovu tak může vzniknout tzv. samoskladná monovrstva analytu (angl. self-assembled monolayer – SAM)<sup>6</sup>. Modelovými analyty mohou být i sloučeniny, které ve svých molekulách obsahují primární, sekundární nebo terciární aminoskupiny (–NH<sub>2</sub>, –NH–, >N–). Pokud je kovový substrát SERS aktivní, je možné detegovat sloučeninu tvořící monovrstvu pomocí Ramanovy spektroskopie.

Aby bylo možné vyhodnotit závislost míry zesílení Ramanova signálu na strukturálních parametrech povrchu SERS-aktivního substrátu, je třeba vyhodnotit jeho povrch v nanoměřítku. Pro tento účel je velmi vhodná mikroskopie atomárních sil (angl. atomic-force microscopy – AFM), jejíž předností je možnost získat trojrozměrný obraz povrchu až s atomárním rozlišením v reálném čase bez speciálních úprav vzorku a následně vyhodnotit jeho průměrnou drsnost.

## Experimentální část

### Použité chemikálie

Při experimentech byly použity tyto chemikálie: penta-hydrát síranu měďnatého p. a. (Penta), kyselina sírová 97% p. a. (Penta), peroxid vodíku 30% p. a. (Penta), methanol p. a. (Penta), kyselina 16-merkaptohexadekanová min. 90% (Sigma–Aldrich), 4-aminothiofenol 90–95% (Fluka), vodný roztok amoniaku 25% p. a. (Penta), hydroxid sodný p. a. (Penta), platinové terčiky (Safina), práškový oxid hlinitý (Sigma–Aldrich), práškový uhličitán vápenatý (Penta). Dále byla použita redestilovaná voda a měděný plech.

### Příprava SERS-aktivních měděných substrátů katodickou redukcí

Byly testovány různé způsoby přípravy SERS-aktivních měděných substrátů. Jako podklad pro SERS-

\* Alžběta Kokaislová se s touto prací úspěšně zúčastnila soutěže O cenu firmy Merck 2008.



aktivní měděný povrch byl při všech experimentech použit platinový terčík (průměr 10 mm, tloušťka 2 mm). Před každým experimentem byl povrch terčíku zbaven předchozí kovové vrstvy pomocí metalografického papíru a následně vyleštěn práškovým oxidem hlinitým a uhlíčanem vápenatým. Pro odstranění zbytků brusných materiálů a případných stop analytu naneseného při předchozím experimentu byl terčík na přibližně 30 min ponořen do směsi 97% kyseliny sírové a 30% peroxidu vodíku v poměru 3:1 v/v. Poté byl důkladně opláchnut redestilovanou vodou.

V aparatuře pro přípravu měděných povrchů byl jako zdroj proudu použit stabilizovaný zdroj Tesla, procházející proud byl měřen digitálním ampérmetrem. Platinový terčík byl připojen k zápornému pólu zdroje, ke kladnému pólu byla připojena elektroda z měděného plechu. Obě elektrody byly vloženy do elektrolytu, který sloužil jako elektrochemická lázeň.

Při experimentech byly střídavě používány dvě lázně

různého složení: lázeň č. 1 byla připravena rozpuštěním 25 g pentahydrátu síranu měďnatého ve 100 ml redestilované vody a okyselením vzniklého roztoku 2,5 ml 97% kyseliny sírové, lázeň č. 2 byla připravena smísením roztoku 12,5 g pentahydrátu síranu měďnatého v 50 ml redestilované vody s roztokem 4 g hydroxidu sodného ve 100 ml redestilované vody a rozpuštěním vzniklé sraženiny v 25% vodném roztoku amoniaku.

Při použití lázně č. 1 bylo vystřídáno několik sekvencí proudových hustot, při použití lázně č. 2 byla aplikována pouze jedna sekvence proudových hustot (tab. I).

Po ukončení pokovování byly povrchy připravené z lázně č. 1 opláchnuty redestilovanou vodou a methanolem, povrchy připravené z lázně č. 2 byly opláchnuty zředěnou kyselinou sírovou (97% kys. sírová + redestilovaná voda, 1:4 v/v) a poté rovněž redestilovanou vodou a methanolem.

#### Depozice modelových analytů na povrch připravených měděných substrátů

Jako modelové analyty byly použity dvě různé sloučeniny obsahující thioskupinu: kyselina 16-merkaptohexadekanová (16-MHDA) a 4-aminothiofenol (4-ABT). Depozice analytu na povrch substrátu byla provedena vložením substrátu do roztoku 1 mg 4-ABT nebo 1,5 mg 16-MHDA vždy ve 4 ml metanolu a ponecháním ve tmě, a to nejméně po dobu 24 h.

Po vyjmutí z roztoku byl povrch substrátu vysušen proudem plynného dusíku. Předpokládalo se, že na povrchu vznikl film tvořený molekulami analytu. Pro zjištění přítomnosti monovrstvy analytu byly povrchy některých substrátů opláchnuty proudem methanolu, aby byly z povrchu odstraněny molekuly analytu, které nebyly k povrchu vázány kovalentní vazbou. Po opláchnutí byl povrch substrátu vysušen proudem plynného dusíku.

#### Měření Ramanových spekter na povrchích měděných substrátů

Ramanova spektra byla měřena na disperzním spektrometru LabRam (Dilor Jobin–Yvon, Francie) vybaveném externím argonovým laserem pro excitační vlnovou délku 488 nm, interním helium-neonovým laserem pro excitační vlnovou délku 633 nm, CCD detektorem a softwarem LabSpec pro záznam naměřených spekter. Použité spektrální rozlišení bylo  $2\text{ cm}^{-1}$ .

#### Mikroskopie atomárních sil

Morfologie povrchu připravených substrátů byla studována mikroskopem atomárních sil Ntegra (NT-MDT, Rusko). K vyhodnocení průměrné drsnosti byl použit software Nova 1.0.26. (NT-MDT, Rusko).

Tabulka I  
Postupy přípravy SERS-aktivních měděných povrchů katodickou redukcí

Postup č.	Lázeň č.	Proud [mA]	Čas [min]
1	1	2	10
		5	40
		10	10
		20	14
		25	5
2	1	5	20
		10	15
		20	10
		25	5
3	1	5	3
		10	3
		15	3
		20	30
4	1	5	3
		10	3
		15	3
		20	3
		25	30
5	2	10	2
		20	2
		30	2
		40	2
		50	2
		60	2
		70	30

## Výsledky a diskuse

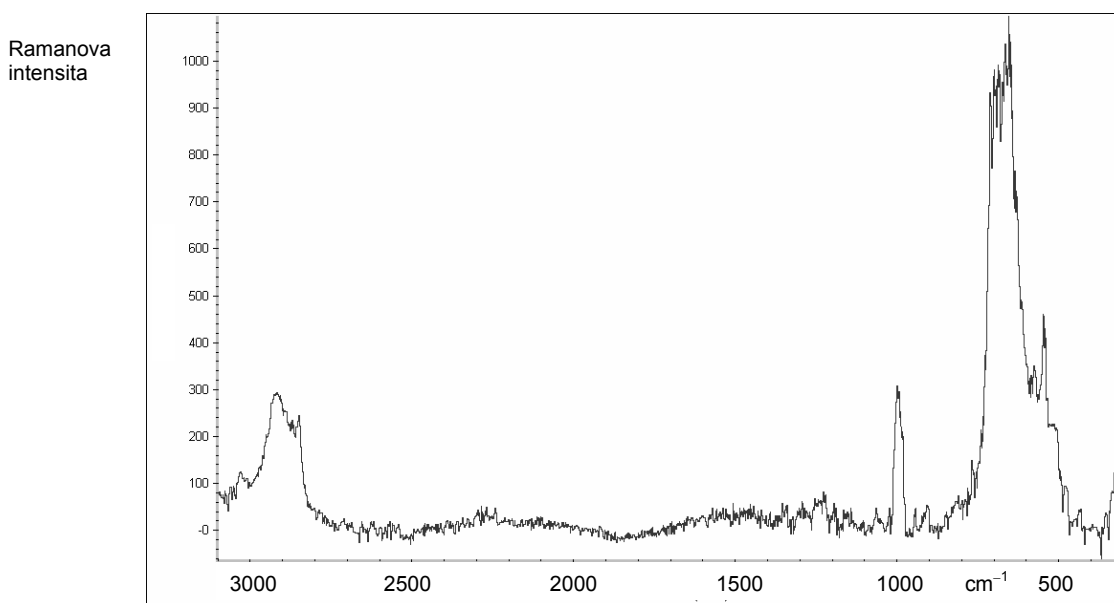
### Ramanova spektra

Ramanovou spektroskopii byly na měděných površích detegovány 16-MHDA i 4-ABT.

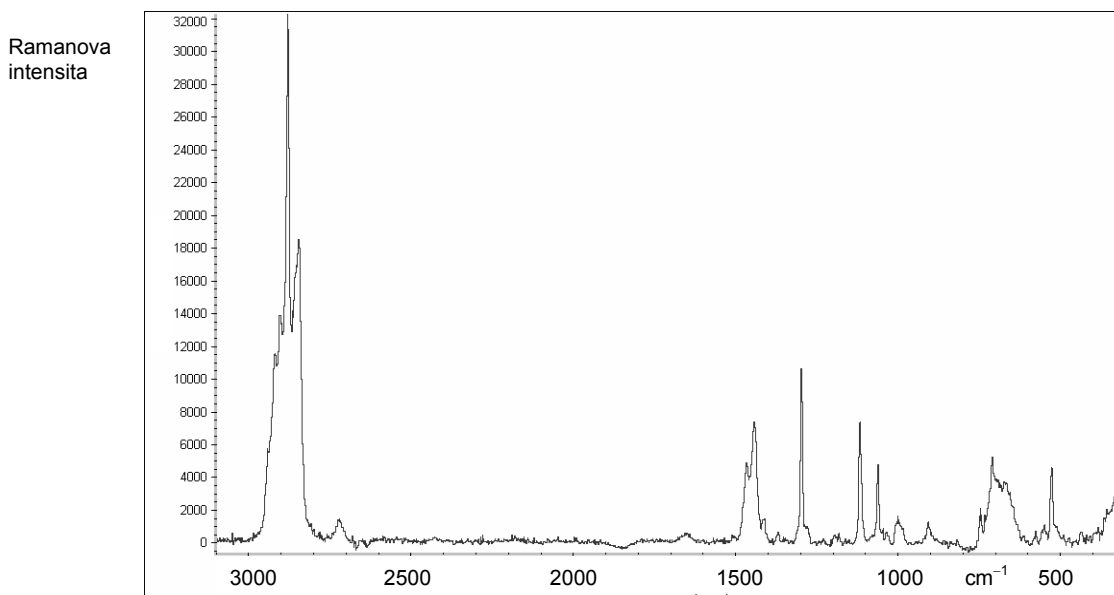
Spektra 16-MHDA naměřená na površích přípravných aplikací postupů č. 1–4 se od sebe navzájem lišila jen nepatrně. Z pásů příslušejícím vibračním přechodům jed-

notlivých charakteristických skupin v molekule 16-MHDA byly ve všech spektrech patry pouze tři a ani jejich intenzita nebyla vysoká (obr. 1). Alifatický řetězec molekuly se nachází nejbližší povrchu, proto pásy odpovídající vibračním přechodům těchto skupin jsou nejvíce zesíleny.

Spektrum 16-MHDA naměřené na povrchu substrátu připraveného postupem č. 5 (obr. 2) se od předchozích spekter výrazně lišilo přítomností pásů příslušejících vib-



Obr. 1. Spektrum kyseliny 16-merkaptohexadekanové naměřené na povrchu substrátu připraveného postupem č. 3, excitační vlnová délka 488 nm



Obr. 2. Spektrum kyseliny 16-merkaptohexadekanové naměřené na povrchu připraveném postupem č. 5, excitační vlnová délka 488 nm

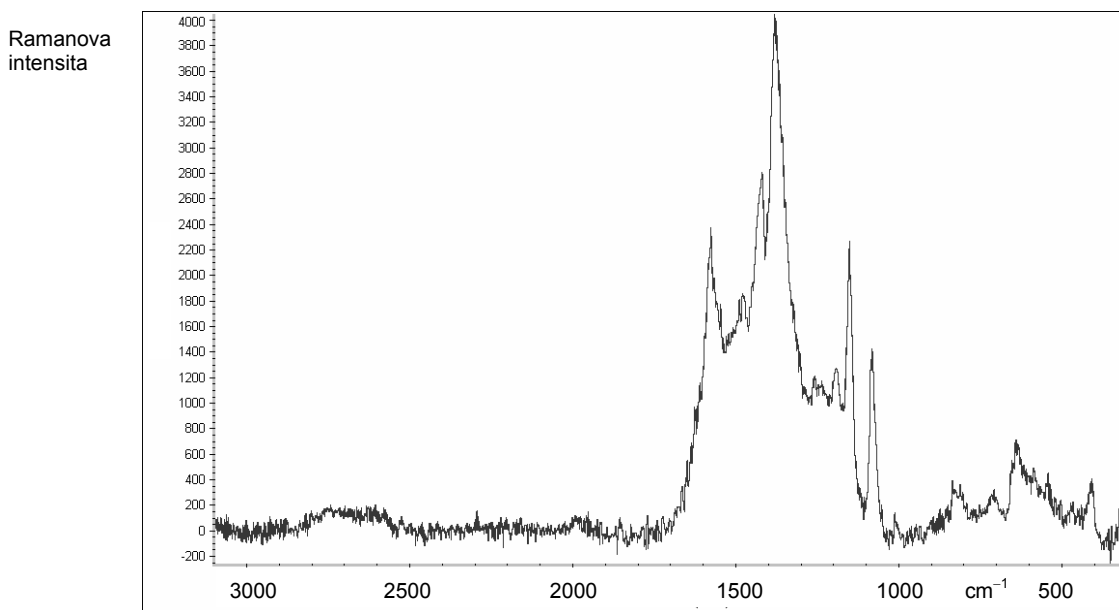
racím charakteristických skupin molekuly a vysokou intenzitou signálu Ramanova rozptylu v oblasti  $2950\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ .

Spektra 4-ABT byla naměřena na površích substrátů připravených postupy č. 4 a 5. V obou spektrech byly přítomny pásy charakteristických skupin molekuly 4-ABT, ve spektru naměřeném na povrchu substrátu připraveného postupem č. 5 (obr. 4) měly přibližně  $6\times$  vyšší intenzitu

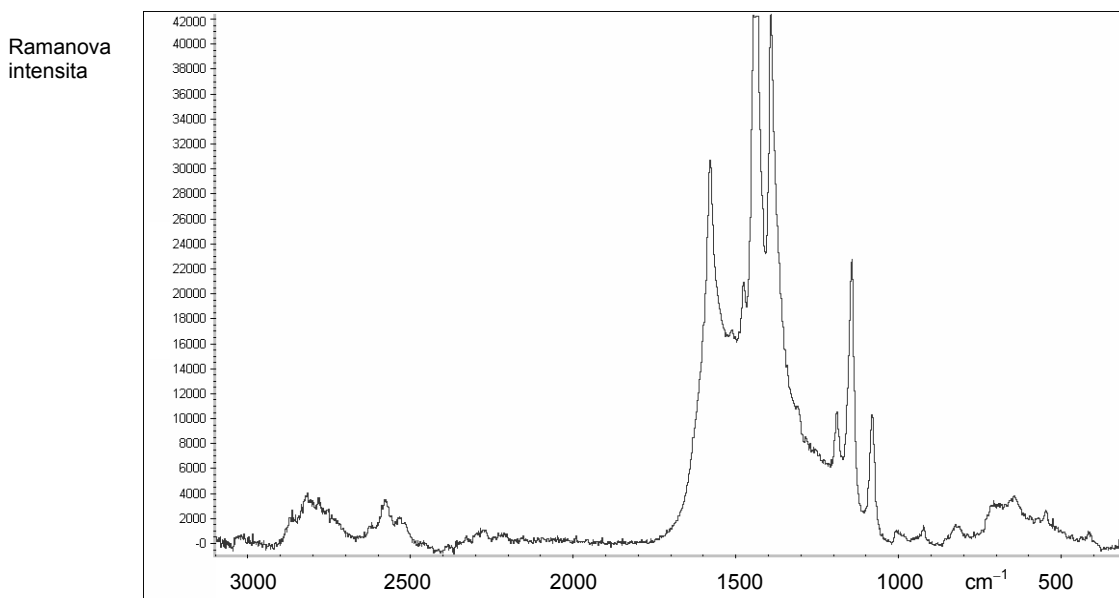
než ve spektru naměřeném na povrchu substrátu připraveném postupem č. 4 (obr. 3).

Vyhodnocení strukturních parametrů povrchů připravených substrátů pomocí AFM

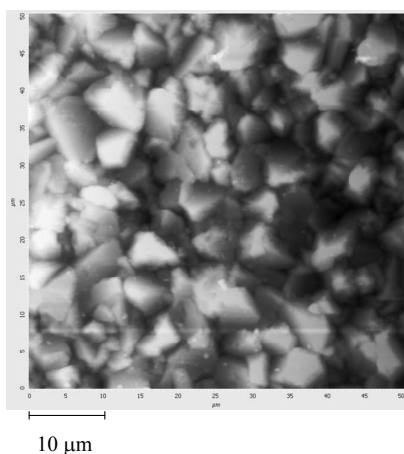
Postupy pro přípravu SERS-aktivních substrátů č. 1–4 se nelišily v počátečním a konečném proudu, ale v délce trvání jednotlivých časových intervalů, při nichž byl proud



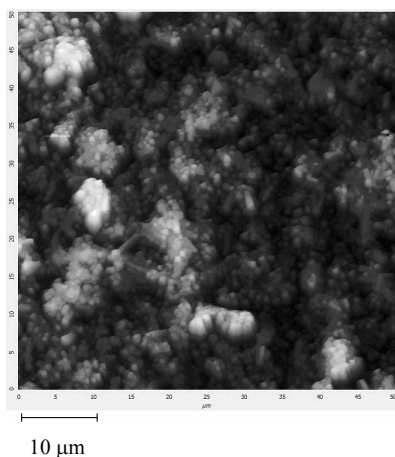
Obr. 3. Spektrum 4-aminothiolenolu naměřené na povrchu substrátu připraveného postupem č. 4, excitační vlnová délka 488 nm



Obr. 4. Spektrum 4-aminothiolenolu naměřené na povrchu substrátu připraveného postupem č. 5, excitační vlnová délka 488 nm



Obr. 5. AFM snímek povrchu substrátu připraveného postupem č. 3



Obr. 6. AFM snímek povrchu substrátu připraveného postupem č. 5

udržován konstantní, což ovlivňuje strukturu a tvar tvořených nanostruktur. Bylo proto možné očekávat, že celková morfologie povrchů jednotlivých substrátů v nanoměřítku bude odlišná.

Povrchy substrátů připravených podle postupů č. 1–4 byly tvořeny vždy krystaly tetraedrického tvaru (obr. 5), které na všech površích dosahovaly přibližně stejné velikosti, pouze na povrchu substrátu připraveném postupem č. 2 byly krystaly zřetelně větší než na ostatních površích. Průměrná drsnost povrchu se pohybovala od  $255 \pm 7$  nm (postup č. 4) po  $805 \pm 60$  nm (postup č. 2).

Morfologie povrchu substrátu, který byl připraven podle postupu č. 5, byla zcela odlišná od morfologií povrchů připravených všemi předchozími postupy. Povrch substrátu byl tvořen částicemi oválného tvaru (obr. 6), které místy vytvářely agregáty. Průměrná drsnost povrchu byla  $650 \pm 29$  nm. Povrch připravený postupem č. 5 měl vyšší průměrnou drsnost než povrchy připravené postupy č. 1, 3 a 4.

## Závěr

Míra SERS-aktivity nově připravených měděných substrátů je závislá na morfologii jejich povrchů. Původním předpokladem bylo, že optimální zesílení signálu poskytují kovové povrchy, které jsou tvořeny částicemi o rozměrech v řádu jednotek až stovek nanometrů. Tento předpoklad byl částečně potvrzen, nicméně se ukázalo, že velikost částic tvořících povrch není jediným parametrem rozhodujícím o SERS-aktivitě daného substrátu.

Příprava měděných substrátů katodickou redukcí různými postupy, vyhodnocení jejich SERS-aktivity a následné studium morfologie jejich povrchů pomocí AFM ukázaly, že povrchy vykazující nízkou intenzitu zesílení signálu jsou tvořeny drobnými krystaly, zatímco povrchy vykazující vysokou intenzitu zesílení jsou tvořeny kulovitými částicemi. Povrchy tvořené krystaly vykazují podobnou intenzitu zesílení signálu bez ohledu na rozměry krystalů.

Z výsledků provedených měření vyplývá, že pro přípravu SERS-aktivního měděného substrátu katodickou redukcí na platinovém povrchu je vhodná elektrochemická lázeň obsahující  $[\text{Cu}(\text{NH}_4)_3]^{2+}$ , která umožňuje připravit povrch tvořený částicemi mědi vhodného tvaru a velikosti.

## LITERATURA

1. Campion A., Kambhampati P.: *Chem. Soc. Rev.* 27, 241 (1998).
2. Kudelski A.: *J. Raman Spectrosc.* 34, 853 (2003).
3. Bozzini B., D'Urzo L., Mele C., Romanello V.: *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* 17, 915 (2006).
4. Člupek M., Prokopec V., Matějka P., Volka K.: *J. Raman Spectrosc.* 39, 515 (2008).
5. Zawada K., Bukowska J.: *Surf. Sci.* 507–510, 34 (2002).
6. Cavalleri O., Gilbert S. E., Kern K.: *Surf. Sci.* 377–379, 931 (1997).

A. Kokaislová<sup>a</sup>, S. Brázdová<sup>a</sup>, V. Prokopec<sup>a</sup>, M. Člupek<sup>a</sup>, J. Čejková<sup>b</sup>, and P. Matějka<sup>a</sup> (<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, <sup>b</sup>Department of Chemical Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague): **Preparation of SERS-Active Copper Substrates by Cathodic Reduction and Evaluation of their Structure by Atomic Force Microscopy**

Copper substrates active in surface enhanced Raman scattering (SERS) were prepared by cathodic reduction, using a massive platinum target as cathode. Two electrochemical baths (with 16-sulfanylhexadecanoic acid or 4-aminobenzene-1-thiol) and several steps with different current densities were tested. For testing SERS activity of the prepared substrates, model analytes were deposited from their methanolic solutions on the surface of each substrate. After deposition, Raman spectra of substrate surface were measured. If the substrate was SERS-active, the model analyte could be detected at monolayer level. Average roughness of substrate surface was evaluated and surface morphology was imaged using atomic force microscopy.

## OPTIMALIZACE HPLC STANOVENÍ KLOTRIMAZOLU

PETRA ŽÁKOVÁ\*, HANA SKLENÁŘOVÁ,  
LUCIE HAVLÍKOVÁ, LUDMILA MATYSOVÁ  
a DALIBOR ŠATÍNSKÝ

Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta,  
Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec  
Králové

Petra.Zakova@faf.cuni.cz

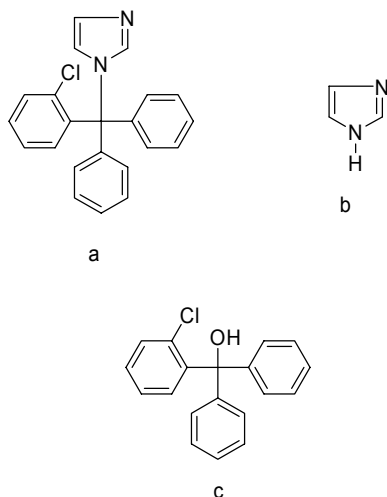
Došlo 28.4.08, přijato 18.12.08.

Klíčová slova: klotrimazol, (2-chlorofenyl)difenylmethanol,  
imidazol, HPLC

### Úvod

Klotrimazol je imidazolový derivát s terapeutickým účinkem při mykózách, určený k místnímu použití. Působí na patogenní a podmíněně patogenní houby rodu *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporium*, *Aspergillus*, *Nocardia* a některé další mikromycety<sup>1</sup>.

Na jeho stanovení byla vyvinuta celá řada analytických postupů. Nejjednodušší je přímá spektrofotometrie v UV oblasti<sup>2</sup>. Další užívanou metodou je kapilární zónová



Obr. 1. Strukturální vzorec (a) klotrimazolu, (b) imidazolu a (c) (2-chlorofenyl)difenylmethanolu<sup>6</sup>

elektroforéza (CZE) s UV detekcí<sup>3–5</sup>. Nejčastěji používanou technikou pro stanovení klotrimazolu, jeho nečistot, ale i pro současné stanovení více léčiv, je HPLC s UV detekcí<sup>6–9</sup>.

Cílem této práce bylo upravit podmínky HPLC pro současné stanovení obsahu klotrimazolu a jeho degradačních produktů – (2-chlorofenyl)difenylmethanolu a imidazolu – v přípravku Clotrimazol spray 1 %. Uvedené látky (obr. 1) mají výrazně odlišné hodnoty  $pK_a$ , imidazol se svým bazickým charakterem odlišuje od účinné látky.

Předložená práce byla zaměřena na výběr vhodné chromatografické kolony, složení mobilní fáze, jejího pH a vnitřního standardu pro analýzu léčivého přípravku obsahujícího lokálně užívané antimykotikum klotrimazol. Celkem bylo testováno 7 chromatografických kolon.

### Experimentální část

#### Přístrojové vybavení

Měření byla prováděna na HPLC sestavě Breeze, která se skládala z gradientové pumpy Waters 1525, automatického dávkovače vzorků Waters 717 Plus a dvoukanalového detektoru UV/VIS Waters 2487. Celý systém byl řízen softwarem Breeze (Waters Corp., USA).

K vývoji metody pro separaci analyzovaných látek byly použity tyto kolony: Discovery HS F5, 150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm (Sigma-Aldrich); Chromolith® Performance, RP-18e, 100 × 3 mm (Merck); ZIC® HILIC, 50 × 2,1 mm, velikost částic 3,5 μm (SeQuant); XTerra® RP 18, 100 × 3 mm, velikost částic 5 μm (Waters); Discovery RP Amide C 16, 250 × 3 mm, velikost částic 5 μm (Sigma-Aldrich); Zorbax Extend-C18, 75 × 4,6 mm, velikost částic 3,5 μm (Agilent Techn.); Discovery ZR-PBD, 150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm (Sigma-Aldrich).

#### Použitá chemikálie

Pro přípravu roztoku standardů byly použity tyto chemikálie: klotrimazol, Amoli Organics Ltd, Mumbai, Indie (obsah 100,12 %); (2-chlorofenyl)difenylmethanol, téhož výrobce; imidazol ACS reagent, Sigma-Aldrich, Německo, pracovní standard; ibuprofen 98 % (GC), Sigma-Aldrich, Německo.

Pro přípravu mobilní fáze byly použity tyto chemikálie: ultračistá voda, Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA); acetonitril pro chromatografii, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo a methanol pro chromatografii, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo.

Na úpravu pH mobilní fáze byla použita kyselina fosforečná, 85% p.a., Merck a amoniak – vodný roztok

\* P. Žáková úspěšně prezentovala tuto práci v soutěži O cenu firmy Merck 2008.

25 %, Lachema, Neratovice.

Standardní roztok (50 mg klotrimazolu; 5 mg nečistot; 20 mg ibuprofenu) byl připraven rozpuštěním příslušného množství klotrimazolu, (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, imidazolu a ibuprofenu (vnitřní standard) a doplněním acetonitrem do 100,00 ml.

Mobilní fáze byla připravena z ultračisté vody, pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu 5% kyselinou fosforečnou, nebo 25% roztokem  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Výsledný roztok byl přefiltrován přes membránový filtr 0,45  $\mu\text{m}$ . Byla použita polární rozpouštědla acetonitril a methanol, která mají vysokou čistotu a jsou určené pro kapalinovou chromatografii. Mobilní fáze pro kolonu ZIC<sup>®</sup> HILIC byla připravena z roztoku kyseliny octové (acetonitril/0,5 mM kyselina octová 80:20), pH bylo upraveno vodným amoniakem. Poměr vodné a organické složky byl nastaven při programování HPLC pumpy.

#### Experimentální podmínky

Celkem bylo testováno 7 uvedených chromatografických kolon. Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě, s výjimkou testování robustnosti. Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka 210 nm.

Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vody v různých poměrech a o různém pH. Výjimku tvořila pouze kolona ZIC<sup>®</sup> HILIC, u které se jako mobilní fáze používala směs acetonitrilu a 0,5 mM kyseliny octové.

Robustnost byla testována na koloně Discovery ZR-PBD (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4,6 mm) při poměru mobilní fáze acetonitril/voda 50:50. Průtok mobilní fáze byl 1 ml  $\text{min}^{-1}$  a dávkovaný objem byl 3  $\mu\text{l}$ .

## Výsledky a diskuse

### Výběr vhodné chromatografické kolony

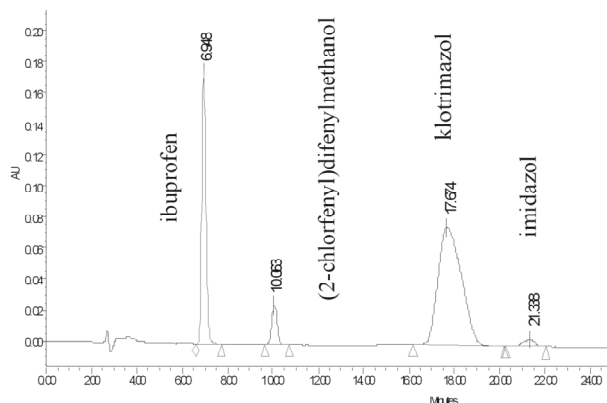
#### Discovery HS F5

Pentafluorfenylpropyl kolony jsou vhodné svou retencí a selektivitou zejména pro bazické a halogenované látky. Navázaná fáze na této koloně umožňuje separaci, která je zpravidla odlišná od separace na C18, nicméně retenční časy jsou většinou stejné. Obecně jsou bazické látky zadržovány na HS F5 více než na C18 (cit.<sup>10</sup>).

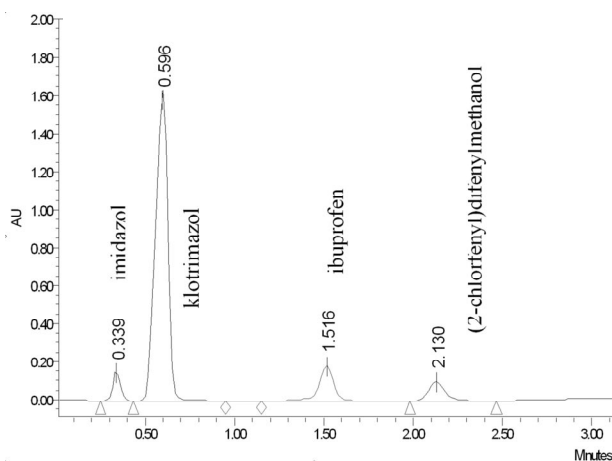
Při analýze byl klotrimazol zadržován na koloně, a proto tato kolona za uvedených podmínek (mobilní fáze: acetonitril – voda 65:35, pH 3,45) není vhodná pro separaci klotrimazolu od ostatních analyzovaných látek (obr. 2).

#### Chromolith<sup>®</sup> Performance, RP-18e

Tato kolona není plněna tradičními částicemi oxidu křemičitého. Je tvořena blokem oxidu křemičitého, který je pokryt *n*-alkylovými řetězci. Pórovitost je větší než 80 %. Makropóry snižují zpětný tlak kolony, tím dovolují použít vyšší průtok, a proto značně klesá doba analýzy. Mesopóry tvoří pórovitou strukturu a poskytují velkou aktivní plochu



Obr. 2. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3,45 5% kyselinou fosforečnou), při průtoku mobilní fáze 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ , kolona Discovery HS F5 (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4,6 mm)



Obr. 3. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze methanol – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3,2 5% kyselinou fosforečnou). Průtok mobilní fáze 2,5 ml  $\text{min}^{-1}$ , Chromolith<sup>®</sup> Performance, RP-18e (100  $\times$  3 mm)

pro efektivní separaci. Monolitní kolona má ve srovnání s kolonami o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$  a stejné délce čtyřikrát nižší zpětný tlak. Rozlišení píků zůstává prakticky nezměněné<sup>11</sup>.

Chromatogramy vykazovaly symetrické a úzké píky analyzovaných látek, analýza do pH 3,45 nebyla výrazně závislá na změnách pH. Imidazol měl velmi krátký retenční čas, při kterém by mohlo docházet k interferencím s píkem odpovídajícím mrtvému času a následnému ovlivnění výsledků analýz složkami matrice vzorku (obr. 3).

Při použití mobilní fáze methanol – voda se mírně prodloužil retenční čas imidazolu, ale ne natolik, aby se ho podařilo úplně oddělit od mrtvého času.

**ZIC® HILIC**

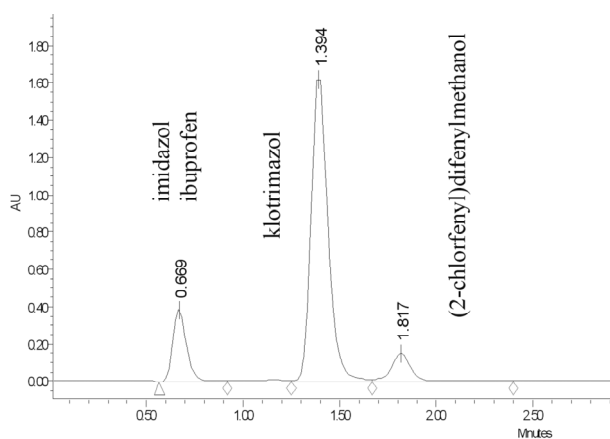
Kolona ZIC® HILIC je vhodná volba pro separaci polárních a hydrofilních sloučenin. Analyty jako aminokyseliny, peptidy, sacharidy, rostlinné extrakty a různé polární sloučeniny mají obecně silnou retenci na této koloně. Stacionární fáze je pevně zakotvená na pórovitém oxidu křemičitém. Separace je dosaženo hydrofilním dělicím mechanismem znásobeným slabými elektrostatickými interakcemi. Typická mobilní fáze obsahuje vysoký podíl organických rozpouštědel (např. acetonitril) smíšených s pufrem<sup>12</sup>.

Byla proměřena různá pH a různé poměry mobilních fází, ale ani na této koloně se nepodařilo směs rozdělit.

**XTerra® RP 18**

Tato kolona byla připravena novou metodou syntézy hybridu, který obsahuje jak anorganické (např. silikagel), tak organické (např. organosiloxany) elementy, a poskytuje tedy výhody obou těchto materiálů. Výsledkem je sorbent s minimálně o 1/3 nižším obsahem volných silanolových skupin. Tato skutečnost zaručuje symetrické píky bazických sloučenin. Sorbent je dlouhodobě použitelný při pH 1–12 (cit.<sup>13</sup>).

Při pH vodné složky 7,25 a poměru organické (acetonitril) a vodné složky 65:35 byly získány symetrické tvary píků (obr. 4). Analýza trvala 2 minuty, ale při stejném retenčním čase eluoval imidazol, ibuprofen a jodid draselný, který se používá k identifikaci mrtvého objemu kolony. Při použití mobilní fáze o pH vodné složky 11 a poměru organické a vodné složky 65:35 se podařilo rozdělit ibuprofen a imidazol, ale přiblížily se píky klotrimazolu k (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, což zhoršilo jejich rozlišení.



Obr. 4. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 7,25 5% kyselinou fosforečnou). Průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>, XTerra® RP 18 (5 μm, 100 × 3 mm)

**Discovery RP Amide C 16**

Polární amidová skupina v stacionární fázi poskytuje menší retenci a vyšší selektivitu ve srovnání s kolonou C18, je totiž méně hydrofobní než klasické fáze C18. Kolona Discovery RP Amide C 16 vyniká velmi dobrou selektivitou, reprodukovatelností, dostatečnou retencí a rozlišením pro polární analyty i dlouhou životností<sup>14</sup>.

Při použití mobilní fáze o pH vodné složky 3 a 3,5 a poměru organické a vodné složky 65:35 se dělí imidazol a klotrimazol jen neúplně. Při pH 3,8 a vyšším se píky rozšiřují a deformují. Imidazol eluoval při nízkém retenčním čase, kdy je pravděpodobná interference s mrtvým objemem kolony.

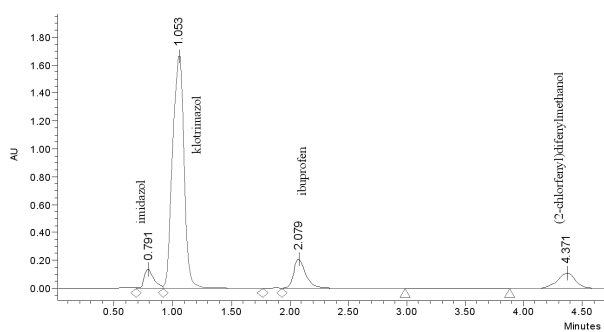
**Zorbax Extend-C18**

Kolony Zorbax Extend-C18 jsou vhodné díky dvojité vázanému můstku mezi skupinami C18. Tento typ sorbentu umožňuje práci i při velmi vysokém pH, protože bazické sloučeniny nemohou interagovat se silikagelem. Mobilní fáze při vyšším pH obsahují např. triethylamin, pyrrolidin, glycin nebo vodný amoniak. Kolony jsou vhodné pro bazické sloučeniny, jsou účinnější než některé polymerní kolony a vykazují lepší tvar píků<sup>15</sup>.

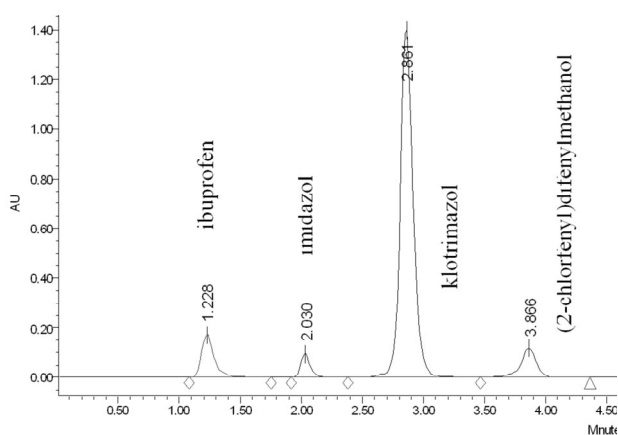
Při použití mobilní fáze o pH vodné složky 3 a 3,5 a poměru organické a vodné složky 65:35 se rozdělí imidazol a klotrimazol jen neúplně (obr. 5). Při pH 4 a vyšším ionizuje ibuprofen a zkracuje se retenční čas, který je stejný jako retenční čas imidazolu. Ani při pH 11 se nedaří oddělit imidazol. Imidazol eluuje při nízkém retenčním čase, kdy interferuje s mrtvým časem.

**Discovery ZR-PBD**

Oxid zirkoničitý lze získat i ve formě monodisperzních poréznych kulových částic. Kolony plněné touto fází vykazují srovnatelnou účinnost s kolonami silikagelovými. Největší výhodou oxidu zirkoničitého je jeho chemická a tepelná stabilita: je stálý v celém rozsahu pH při vysokém tlaku a teplotě až do 200 °C. HPLC kolony



Obr. 5. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 65:35 (pH vodné složky upraveno na 3,5 5% kyselinou fosforečnou). Průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>, Zorbax Extend-C18 (3,5 μm, 75 × 4,6 mm)



Obr. 6. Chromatogram standardního roztoku při použití mobilní fáze acetonitril – voda 50:50 (pH vodné složky upraveno na 9,5 vodným 25% amoniakem). Průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>, kolona Discovery ZR-PBD (5 μm, 150 × 4,6 mm)

s ZrO<sub>2</sub> mohou být použity za extrémních podmínek a mají delší životnost. Tím se také snižuje cena za analýzu a rozšiřují se možnosti použití různých chromatografických podmínek. Povrch oxidu zirkoničitého se modifikuje tenkou vrstvou polybutadienu<sup>16</sup>.

Separace probíhá na obrácených fázích, jeho iontově-měnná chromatografie při pH od 1 do 13. Významný rozdíl mezi Discovery Zr-PBD a C18 kolonou je ten, že na koloně s ZrO<sub>2</sub> může být použito bazické mobilní fáze a zvýšené teploty. Za těchto podmínek mají bazické sloučeniny lepší tvar píků (jsou ostré a symetrické)<sup>17</sup>.

Při použití mobilní fáze o pH vodné složky 3 a 3,5 se nepodařilo oddělit píky klotrimazolu od píků nečistot. Při pH 5 se píky klotrimazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu rozšířily a při pH 9 pak rozdělily; píky imidazolu se částečně oddělily. Při pH 11 se již všechny píky dokonale rozdělily. Za těchto podmínek byla tedy provedena konečná validace metody (obr. 6).

#### Výběr vnitřního standardu

V rámci výběru vnitřního standardu bylo testováno 20 různých látek, většinou léčiv, ze kterých pouze dvě odpovídaly požadavkům analýzy – byly dokonale separovány od mrtvého objemu kolony a ostatních analyzovaných látek a jejich retenční časy příliš neprodlužovaly analýzu. Vybranými standardy byly verapamil a ibuprofen. Jejich praktické využití bylo otestováno validačním parametrem – robustností. Tímto postupem bylo zjištěno, že už malá změna pH mobilní fáze vede k velkému posunu retenčního času verapamilu, zatímco retenční časy ibuprofenu jsou stabilnější. Proto byl nakonec vybrán jako vnitřní standard ibuprofen. Hodnoty získané v testu robustnosti jsou uvedeny v následujícím oddíle.

Tabulka I

Nalezené optimální podmínky pro stanovení klotrimazolu s použitím ibuprofenu jako vnitřního standardu

Mobilní fáze	acetonitril-voda (50:50), pH vodné složky upraveno 25% amoniakem na 9,7
Kolona	Discovery ZR-PBD, 5 μm, 150 × 4,6 mm
Průtok Fm	1 ml min <sup>-1</sup>
Vlnová délka λ	210 nm
Dávkovaný objem	3 μl
Teplota	laboratorní
Vnitřní standard	Ibuprofen

#### Testování robustnosti

Robustnost byla testována pro roztok standardů s vnitřním standardem ibuprofenem. Byl sledován vliv změny pH mobilní fáze v oblasti 9,2–11.

Retenční čas ibuprofenu se pohyboval v rozmezí 1,37–1,15 min, imidazolu 2,74–1,73 min, klotrimazolu 2,95–2,67 min a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu 3,91–3,63 min. Se stoupajícím pH vodné složky mobilní fáze (v uvedené oblasti) se snižovaly retenční časy všech píků v důsledku zvýšené ionizace. Dále byl testován vliv pH na plochu jednotlivých píků, změny se pohybovaly v rozmezí 91,04 až 104,49 %.

V posledním testu byl sledován vliv zvýšené pracovní teploty v rozmezí 25–60 °C, změna plochy píků stanovených látek se pohybovala od 96,24 do 100,00 %, ve srovnání s používanou laboratorní teplotou. Při zvýšené teplotě se analýzy zkracují. Změny v retenčních časech byly následující: 1,73–1,69 min pro imidazol, 2,75–2,44 min pro klotrimazol a 3,76–3,25 min pro (2-chlorfenyl)difenylmethanol.

Výsledky ukazují pouze malou změnu retenčních časů a ploch píků a tím prokazují vysokou robustnost prezentované metody, která je požadována při rutinním využití pro stanovení klotrimazolu v uvedeném přípravku.

#### Závěr

Byla vypracována metoda HPLC pro hodnocení obsahu klotrimazolu a jeho degradačních produktů (2-chlorfenyl)difenylmethanolu a imidazolu v přípravku Clotrimazol spray 1 %. Optimální podmínky jsou uvedeny v tab. I.

*Tento výzkum byl finančně podporován výzkumným záměrem MSM 0021620822.*



## LITERATURA

1. [http://www.sukl.cz/\\_download/pil/PI64167.doc](http://www.sukl.cz/_download/pil/PI64167.doc), staženo 18. 6. 2007.
2. Iliaszenko J., Sokolowska M., Paruszewski R.: *Acta Pol. Pharm.* 58, 411 (2001).
3. Arranz A., Echevarria C., Moreda J. M., Cid A., Arranz J. F.: *J. Chromatogr., A* 871, 399 (2000).
4. Crego A. L., Gomez J., Marina M. L., Lavandera J. L.: *Electrophoresis* 22, 2503 (2001).
5. Crego A. L., Marina M. L., Lavandera J. L.: *J. Chromatogr., A* 917, 337 (2001).
6. Solich P., Hájková R., Pospíšilová M., Šícha J.: *Chromatographia* 55, 181 (2002).
7. Abdel-Moety E. M., Khattab F. I., Kelani K. M., AbouAl-Alamein A. M.: *Farmaco*, 57, 931 (2002).
8. Gagliardi L., de-Orsi D., Chimenti P., Porra R., Tonelli D.: *Anal. Sci.* 19, 1195 (2003).
9. Hájková R., Sklenářová H., Matysová L., Švecová P., Solich P.: *Talanta* 73, 483 (2007).
10. [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/HS\\_F5.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/HS_F5.html), staženo 11/2007.
11. [www.chromatography.merck.de](http://www.chromatography.merck.de), staženo 11/2007.
12. [http://www.sequant.com/sn/p\\_details.php?id=7](http://www.sequant.com/sn/p_details.php?id=7), staženo 11/2007.
13. <http://www.waters.cz/ie/index.html>, staženo 11/2007.
14. [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/Discovery\\_RP\\_Amide\\_C16\\_HPLC\\_Columns.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/Discovery_RP_Amide_C16_HPLC_Columns.html), staženo 11/2007.
15. <http://www.labicom.cz/default.aspx?server=1&article=293&section=23>, staženo 11/2007.
16. [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz), staženo 11/2007.
17. [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/discovery\\_zr\\_pbd.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/discovery_zr_pbd.html), staženo 10/2007.

**P. Žáková, H. Sklenářová, L. Havlíková, L. Matysová, and D. Šatinský** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Optimization of HPLC Determination of Clotrimazole**

A HPLC method for the determination of clotrimazole and its degradation products. (2-chlorophenyl) diphenylmethanol and imidazole, in Clotrimazol spray 1 % was developed.

The development was focused on the selection of an optimal column, composition and pH of the mobile phase, and internal standard. A Discovery ZR-PBD column (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4.6 mm) and spectrophotometric detection at 210 nm were selected. The optimal mobile phase was aqueous acetonitrile 1:1 (pH 9.7). The optimal injection volume and flow-rate were 3  $\mu\text{l}$  and 1  $\text{ml min}^{-1}$ , respectively. On the basis of robustness tests, ibuprofen was used as the internal standard. The analysis time was less than 4.5 min.

---

## ERRATA NA VYŽÁDÁNÍ AUTORŮ

---

*Následující projekty byly vypracovány v rámci výzkumného záměru MŠMT ČR č. MSM 6046137308.*

Říhová Ambrožová J., Bezděková E., Loučková P., Nekořová J., Karásková M., Rakušan J., Černý J., Kořínková R.: Využití ftalocyaninových preparátů šetrných k prostředí k ochraně okruhů chladicích vod před růstem řas a sinic. *Chem. Listy* 101, 315 (2007).

Kujalová H., Sýkora V., Pitter P.: Látky s estrogením účinkem ve vodách. *Chem. Listy* 101, 706 (2007).

Švehla P., Jeníček P., Habart J., Hanč A., Černý J.: Využití akumulace dusitanů při biologickém čištění odpadních vod. *Chem. Listy* 101, 776 (2007).

Říhová Ambrožová J., Matulová T.: Biologické audity chladicích vod. *Chem. Listy* 101, 820 (2007).



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

## Proč se stát členem České společnosti chemické

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

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

### Jak se stát členem ČSCH

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

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

OBSAH		CONTENTS	
<b>ÚVODNÍK</b>	183	<b>EDITORIAL</b>	183
<b>ZAHRADA</b>		<b>GARDEN</b>	
<b>Jaké jsou perspektivy elektrochemie?</b>	184	<b>What Are the Outlooks of Electrochemistry?</b>	184
K. Micka		K. Micka	
<b>REFERÁTY</b>		<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Adipocytokiny – nedávno objevené hormony tukové tkáně</b>	187	<b>Adipocytokines – Recently Discovered Fat Tissue Hormones</b>	187
V. Škop, K. Kontrová, J. Zídková a V. Zídek		V. Škop, K. Kontrová, J. Zídková, and V. Zídek	
<b>Využití roztavených anorganických solí jako chladiacích médií v jadrovej energetice – Soľ zeme a svetlo sveta</b>	193	<b>Utilization of Molten Inorganic Salts as Coolants in Nuclear Energetics – The Salt of the Earth and Light of the World</b>	193
M. Korenko a M. Kucharík		M. Korenko and M. Kucharík	
<b>Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek</b>	200	<b>Microbial Degradation of Endocrine Disruptors</b>	200
Z. Křesinová, K. Svobodová a T. Cajthaml		Z. Křesinová, K. Svobodová, and T. Cajthaml	
<b>Aplikácia biosenzorov pri Monitorovaní fermentačných procesov</b>	208	<b>Application of Biosensors in Monitoring Fermentation Processes</b>	208
M. Valach a E. Šturdík		M. Valach and E. Šturdík	
<b>CENA MERCK</b>		<b>PRIZE MERCK</b>	
<b>Voltametrické stanovení acifluorfenu, nitrofenu a oxyfluorfenu na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě a uhlíkové pastové elektrodě</b>	217	<b>Voltammetric Determination of Acifluorphen, Nitrophen and Oxyfluorphen with Solid Silver Amalgam and Carbon Paste Electrodes</b>	217
V. Novotný a J. Barek		V. Novotný and J. Barek	
<b>Vývoj neinvazivní diagnostiky <i>Asthma bronchiale</i></b>	224	<b>Development of a Non-Invasive Diagnostic Method for Bronchial Asthma</b>	224
K. Syslová, J. Přeč, J. Lebedová, D. Pelclová a P. Kačer		K. Syslová, J. Přeč, J. Lebedová, D. Pelclová, and P. Kačer	
<b>Analýza antioxidantů v chmelu a pivu</b>	232	<b>Analysis of Beer and Hop Antioxidants</b>	232
M. Fidler a L. Kolářová		M. Fidler and L. Kolářová	
<b>Voltametrické stanovení herbicidu Bifenoxu na stříbrné pevné amalgámové elektrodě modifikované rtuťovým meniskem</b>	236	<b>Voltammetric Determination of Herbicide BiphenoX on Mercury-Meniscus-Modified Solid Silver Amalgam Electrode</b>	236
D. Cabalková, J. Barek, J. Fischer, T. Navrátil, K. Pecková a B. Yosypchuk		D. Cabalková, J. Barek, J. Fischer, T. Navrátil, K. Pecková, and B. Yosypchuk	
<b>Nově identifikované fenolické látky v parazitických rostlinách <i>Cuscuta europaea</i> a <i>Cuscuta campestris</i></b>	243	<b>Newly Identified Phenolic Compounds in Parasitic Plants <i>Cuscuta europaea</i> and <i>Cuscuta campestris</i></b>	243
P. Hřibová, M. Žemlička, T. Bartl a E. Švajdlenka		P. Hřibová, M. Žemlička, T. Bartl, and E. Švajdlenka	
<b>Příprava SERS-aktivních měděných substrátů katodickou redukcí a vyhodnocení jejich struktury pomocí mikroskopie atomárních sil</b>	246	<b>Preparation of SERS-Active Copper Substrates by Cathodic Reduction and Evaluation of their Structure by Atomic Force Microscopy</b>	246
A. Kokaislová, S. Brázdová, V. Prokopec, M. Člupek, J. Čejková a P. Matějka		A. Kokaislová, S. Brázdová, V. Prokopec, M. Člupek, J. Čejková, and P. Matějka	
<b>Optimalizace HPLC stanovení klotrimazolu</b>	251	<b>Optimization of HPLC Determination of Clotrimazole</b>	251
P. Žáková, H. Sklenářová, L. Havlíková, L. Matysová a D. Šatínský		P. Žáková, H. Sklenářová, L. Havlíková, L. Matysová, and D. Šatínský	
<b>ERRATA</b>	255	<b>ERRATA</b>	255

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 103 (2009), čís./no. 3 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 133, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 119 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Generála Svobody 335, 533 51 Pardubice - Rosice nad Labem; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2009 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plné předplatné 2009 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2008 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zaslány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: D. Hnyk • Dáno do tisku 26.2.2009.**