

Systém REACH a ochránci zvířat

Rok 2008 je možné označit jako nultý rok zavádění systému REACH. Cílem zavedení systému REACH je inventarizace a opětovné hodnocení obchodovatelných chemických látek v Evropské unii z hlediska jejich vlivu na zdraví lidí a životní prostředí. Pojem „chemická látka“ označuje chemický produkt dodávaný na trh (nikoliv tedy chemickou sloučeninu). V minulosti byl systém hodnocení chemických látek (chemických výrobků) v Evropské unii řízen Směrnicí (Direktivou), která byla v České republice převzata jako „Zákon o chemických látkách a chemických přípravcích“. Tento zákon předepisuje postup hodnocení a registrace chemických výrobků, které smějí být uvedeny na trh. Tak zvané „obchodovatelné látky“ jsou v Evropské unii zařazeny v seznamech EINECS a ELINEC. Je jich okolo 100 000.

Předběžná registrace chemických výrobků v systému REACH a její význam

V roce 2008 se všichni výrobci a dovozci chemických látek museli „přihlásit“ k chemickým výrobkům, o které mají zájem. Předběžná registrace je opravňuje daný výrobek vyrábět nebo dovážet, až do doby, kdy na ně padne povinnost výrobek registrovat. Povinnost registrace v systému REACH je rozložena, podle roční produkce výrobku, na dobu do roku 2018.

Předběžná registrace chemických výrobků je tedy jakousi inventarizací látek, o které mají výrobci a dovozci zájem. Je velmi pravděpodobné, že v seznamech EINECS a ELINECS jsou „mrtvé výrobky“, tj. výrobky, jejichž výroba již skončila.

Pro řízení procesu REACH byla zřízena agentura v Helsinkách. Všechna jednání jsou vedena elektronicky a v anglickém jazyce. Na základě předběžné registrace sestaví agentura REACH seznam sloučenin a zájemců o jejich výrobu nebo dovoz, který bude přístupný přes internet. Zájemci o stejný výrobek se pak mohou mezi sebou dohodnout na společném postupu získání a zpracování požadovaných údajů (konsorcia).

Základní dokumenty pro registraci výrobku

Pro každý výrobek je nutné zpracovat dva základní dokumenty:

- „**Dossier**“, což je soubor údajů o vlastnostech daného produktu, český název pro tento dokument nebyl ještě zaveden, je pravděpodobné, že se mu bude říkat „dozír“. Pro zpracování tohoto dokumentu je na INTERNETU dostupný vzor označovaný jako UCLIDE5. Instrukční text vysvětlující, jak má být „Dossier“ vyplněn má asi 2500 stran.
- „**Zpráva o chemické bezpečnosti výrobku**“. V této zprávě je nutné údaje o výrobku prezentovat ve formě srozumitelné širší veřejnosti. Ovšem, i návod na zpracování této zprávy má kolem 2000 stran (některé

stránky se opakují na různých místech, aby je uživatel nemusel znova hledat).

Co je nového na systému REACH v porovnání se zákonem o chemických látkách a chemických přípravcích?

Principy hodnocení vlastností chemických výrobků aplikované dříve a v systému REACH jsou prakticky stejné, systém REACH však vyžaduje sledovat osud chemického výrobku „od kolébky do hrobu“. Pro výrobek je vyžadováno sledovat, komu je prodáván, jak je dále využíván, a jak ohrožuje osoby, které s výrobkem přicházejí do styku ve výrobě i aplikaci, je nutné hodnotit, jak výrobek ohrožuje životní prostředí. Systém REACH předepisuje analýzu „scénářů ohrožení“, v nichž jsou komplexně hodnocena rizika spojená s výrobou, použitím a likvidací výrobku.

Náklady na získání potřebných údajů pro hodnocení chemického výrobku

Náklady na získání jednotlivých typů informace o vlastnostech výrobku jsou řádově odlišné. Jako relativně „laciné“ údaje je možné označit fyzikálně chemické údaje (např. teplotu varu, teplotu tání, hustotu), požární údaje (teplotu vzplanutí, teplotu hoření, teplotu vznícení). Nákladnější je stanovení akutní toxicity při požití nebo při působení na kůži (LD50, zpravidla pro krysu či myš) a stanovení akutní toxicity pro vdechování (LC50, zpravidla pro krysu či myš). Do této skupiny patří i údaje o ekotoxicitě (vliv na ryby, řasy, žížaly). Stanovení ekotoxicity patří však stále ještě k údajům, jejichž stanovení a hodnocení není plně vyjasněno. Nejdražším, a ostře sledovaným parametrem v systému REACH budou údaje o biologických účincích výrobku: karcinogenita (vznik rakoviny), teratogenita (poškození plodu), vliv na plodnost, mutagenita (vliv na genetický kód buněk), senzibilizující vlastnosti (vyvolání alergie). Stanovení těchto vlastností je velmi drahé, protože vyžaduje často sledování více generací testovaných organismů. Zejména jde o látky perzistentní (vysoce stabilní), bioakumulativní (rozpustné v tucích a vstupující do potravních řetězců).

Ochrana obratlovců

V současné době jsou některé problémy v Evropské unii zpolitizovány. Systém REACH je ovlivněn snahou ochránců zvířat „chránit obratlovce“, kteří jsou využíváni jako testovací organismy. Je ovšem pravděpodobné, že důvodem není jen snaha chránit obratlovce, ale i skutečnost, že některé vlivné firmy mají zásobu dat o nebezpečných vlastnostech chemických výrobků a chtějí tato data „prodat“. Dalším důvodem může být i skutečnost, že dostupné kapacity ústavů, které mohou látky testovat na obratlovcích, nemohou stačit na „přetestování“ všech chemických výrobků.

K snížení počtu testů na obratlovcích jsou doporučována tato řešení:

Prodej dat

Tento problém se týká výrobků, k nimž se hlásí více výrobců nebo dovozců. Podle pravidel systému REACH musí být starší údaje předávány bezplatně, novější údaje budou prodávány za podmínek, které budou v systému REACH definovány.

Použití „počítačových metod“ odhadu vlastností

Přesto, že v systému REACH se klade vysoká váha na dokumentaci spolehlivosti údajů o nebezpečných vlastnostech výrobku, dokumentací dokládající, že organizace, která údaje stanovila má odpovídající ověřenou kvalifikaci (systém správné laboratorní praxe), systém REACH připouští využití „počítačových metod“ k odhadu vlastností chemických výrobků. Pro tyto metody nebyly ještě zavedeny ustálené české názvy. Metody jsou založeny na skupinové analýze vlastností a vztahů vlastností uvnitř jisté vybrané skupiny látek. Kritickým problémem je výběr skupiny látek. Výběr skupiny látek klade vysoké nároky na chemické a biochemické znalosti chemika. Skupinou mohou být například homologické řady organických látek.

Pro odhad vlastností jsou doporučovány tyto metody:

- *Metoda QSAR – kvantitativní vztah mezi účinkem a strukturou ve skupině látek.*
- *Metoda „READ ACROSS“ – doplňování chybějících*

údajů pro danou látku skupiny interpolací nebo extrapolací známých údajů pro ostatní členy skupiny látek, s využitím vhodného souřadnicového systému. Každému chemikovi je však jasné, že obě uvedené metody se nedají aplikovat mechanicky. Metody je možné aplikovat, pokud je mechanismus působení všech látek vybrané skupiny na organismy a životní prostředí stejný. Každý chemik ví, že některé členy skupiny mohou mít specifický účinek. Příkladem je řada alkoholů, v níž methanol má jiný účinek než ethanol a vyšší členy homologické řady.

Závěr

V souvislosti se zavedením systému REACH roste důležitost oboru, který je možné označit jako aplikovaná informatika. Podniky, či skupiny podniků budou nuceny vytvořit oddělení informatiky, které bude schopno vyhledat a zpracovat údaje z odborné literatury a vyplnit předepsané formuláře. Představa, že by byly znova experimentálně přetestovávány údaje o toxicitách a jiných nebezpečných vlastnostech chemických výrobků, je neschůdná. Ale stejně je neschůdná i představa, že by úlohu vyplňování formulářů REACH mohl plnit technolog vedle svých výrobních povinností. Je proto nutné vychovat novou generaci „informatiků“, kteří vyplňování formulářů systému REACH zvládnou.

Josef Horák

ZAHRADA

FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE

LENKA BERANOVÁ, JANA HUMPOLÍČKOVÁ
a MARTIN HOF

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i.,
Dolejškova 2155/3, 182 23 Praha 8
lenka.beranova@jh-inst.cas.cz

Došlo 12.6.08, přijato 26.6.08.

Klíčová slova: fluorescenční korelační spektroskopie, auto-korelační funkce, konfokální mikroskop, dvoubarevná fluorescenční korelační spektroskopie, časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie

Obsah

1. Úvod
2. Experimentální uspořádání
3. Autokorelační funkce
4. Tripletní stav fluoreskující molekuly
5. Korelace dvou různých signálů a dvoubarevná FCS
6. Časově rozlišená FCS
7. Závěr

1. Úvod

Mít možnost sledovat proteiny nebo nukleové kyseliny na úrovni jednotlivých molekul je přáním všech, kdo se snaží objasnit klíčové procesy v živých buňkách. Jednou z technik, která se snaží toto přání naplnit, je fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). Metoda vznikla v 70. letech 20. století¹. Od té doby se podařilo výrazně zlepšit její experimentální uspořádání a byla využita v širokém spektru biologických aplikací včetně měření uvnitř živých buněk^{2,3}.

Fluorescenční korelační spektroskopie využívá konfokální mikroskop. Nevytváří se při ní ale skenováním obraz vzorku jako v klasické konfokální mikroskopii. Principem této metody je sledování časových fluktuací intenzity fluorescence pocházející z malé ohniskové oblasti mikroskopu. Tyto fluktuace jsou způsobeny difuzním pohybem fluoreskujících molekul.

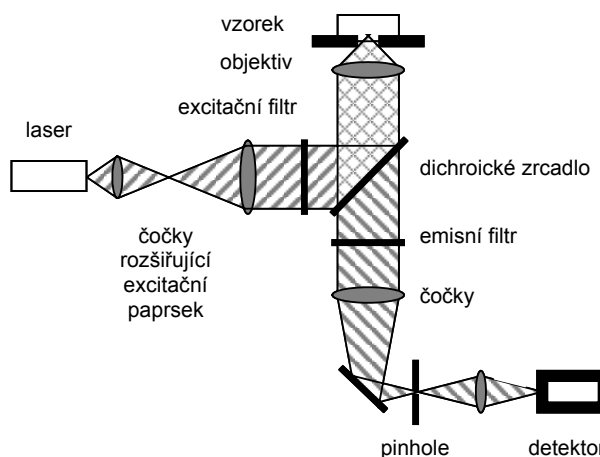
Mikroskop je zaostřen do malé oblasti – detekční objem je asi 1 femtolitr. Vzhledem k tomu, že sledujeme

vzorky s řádově nanomolární koncentrací fluorescenčně označených molekul, je v tomto objemu průměrně pouze jedna fluoreskující molekula. Na fluktuacích signálu se proto výrazně projeví, jak molekuly termálním pohybem přicházejí do detekčního objemu a jak ho opouštějí. Ze statistické analýzy časově proměnlivého fluorescenčního signálu pak lze určit průměrnou dobu, po kterou molekula zůstává v detekčním objemu, difuzní koeficient a koncentraci dané látky. Pro určení těchto parametrů je potřeba sledovat fluktuace několik minut až několik hodin.

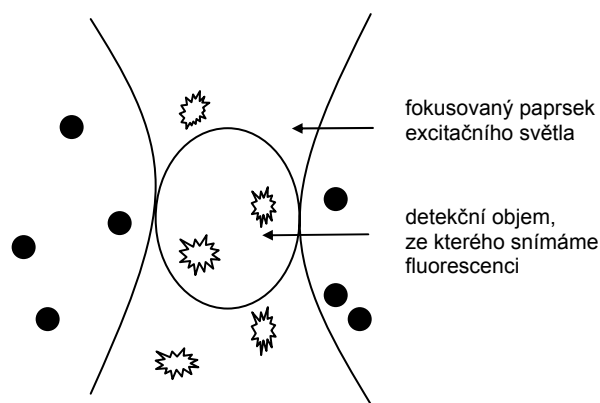
Můžeme zkoumat roztok *in vitro*, vnitřek živých buněk nebo jejich membránu. Lze získat informace o dějích, které ovlivňují difuzní koeficient určité molekuly – například o sbalení proteinu nebo nukleové kyseliny, protein-proteinových interakcích, navázání substrátu na protein, navázání molekuly na membránu.

2. Experimentální uspořádání

Experimentálním zařízením pro FCS je invertovaný konfokální fluorescenční mikroskop (obr. 1). Používá se objektiv s velkou numerickou aperturou, většinou s vodní imerzí. Laserový paprsek excitačního světla je fokusován do zkoumaného vzorku. Vytváří ohnisko, jehož velikost je limitovaná difrakcí. Fluorescence excitovaných molekul je snímána objektivem a pomocí dichroického zrcadla a emisních filtrů je oddělena od excitačního záření. Do detekční části optické dráhy je umístěna konfokální štěrbinová (pinhole) o průměru 40–100 μm , která efektivně blokuje světlo, které pochází z oblastí mimo ohniskovou rovinu. Velikost detekčního objemu (oblasti, ze které snímáme fluorescenci) je asi 0,3–1,0 femtolitrů (obr. 2).



Obr. 1. Schéma konfokálního mikroskopu



Obr. 2. Detekční objem v ohnisku mikroskopu

Jinou možností je použití dvoufotonového fluorescenčního mikroskopu. Pro excitaci dvěma fotony je zapotřebí mnohem vyšší hustota záření než pro jednofotonovou excitaci, proto se výrazně omezí oblast, ve které jsou molekuly excitovány. V tomto uspořádání už není potřeba použít pinhole. Výhodné je také, že se zmenšením excitované oblasti omezí fotodestrukce vzorku – to je zvláště důležité u intracelulárních měření.

FCS klade velké požadavky na použitá fluorescenční barviva. Stejně jako při tradiční spektroskopii je důležitý vysoký účinný průřez absorpce a kvantový výtěžek fluorescence, navíc hraje velkou roli fotostabilita barviva, které musí vydržet vysokou intenzitu světla v ohnisku mikroskopu. Mezi používaná barviva pro FCS patří např. skupina barev Alexa s různými excitacími a emisními vlnovými délkami, rhodaminy a cyaniny. Používají se také fluorescenční proteiny – různé formy GFP a DsRed.

3. Autokorelační funkce

Informace o pohybu jednotlivých molekul lze získat statistickou analýzou fluktuací fluorescenčního signálu, F . Vytváříme tzv. autokorelační funkci $G(\tau)$. Ta je definována

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

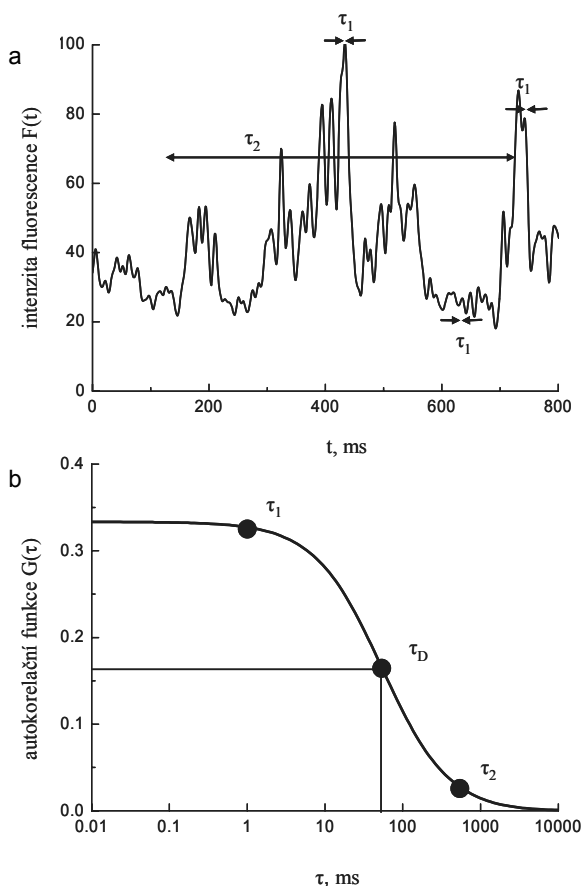
kde $\langle \rangle$ značí průměrnou hodnotu v čase, $F(t)$ intenzitu fluorescence a δ okamžitou odchylku signálu od jeho průměrné hodnoty:

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int F(t) dt \quad (2)$$

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (3)$$

Autokorelační funkce ukazuje, jak souvisí intenzita fluorescence s intenzitou fluorescence po určité časové prodlevě τ (viz obr. 3). Z fluktuujícího fluorescenčního signálu (část měření je schematicky znázorněna na obr. 3a) určíme $G(\tau)$ pro různé intervaly τ . Typický tvar autokorelační funkce je na obr. 3b. Pro $\tau = 0$ dává funkce podle rovnice (1) druhou mocninu průměrné relativní odchylky.

Autokorelační funkce má své maximum pro malé τ , pro delší časy τ funkce klesá k nule. Proč vypadá právě takhle? Zkusme to kvalitativně vysvětlit. Do detekčního objemu přicházejí difuzním pohybem jednotlivé molekuly označené fluorescenčním barvivem a zase z něj odcházejí. Ve zjednodušeném příkladu budeme předpokládat, že je v něm buď jedna fluoreskující molekula, nebo žádná. V okamžiku, kdy v detekčním objemu molekula je, je od-



Obr. 3. Vytvoření autokorelační funkce: a) naměřené fluktuace fluorescenčního signálu, b) autokorelační funkce. Pro krátké časové intervaly (τ_1) je hodnota autokorelační funkce velká, pro větší časové intervaly (τ_2) se snižuje, protože hodnoty intenzity fluorescence na začátku a na konci intervalu už spolu nesouvisí. Čas τ_D udává dobu, po kterou se fluoreskující částice průměrně zdržuje ve fokálním objemu. Autokorelační funkce odpovídá hodnotám $PN = 3$, $\tau_D = 54$ ms, $z_0/r_0 = 7$

chylka od průměrné hodnoty fluorescence δF kladná, v okamžiku, kdy tam není, záporná. Pokud je časový interval τ natolik malý, že je pravděpodobné, že pokud na jeho začátku byla v detekčním objemu fluoreskující molekula, tak na jeho konci tam tatáž molekula stále ještě je (na začátku i na konci intervalu je $\delta F > 0$), případně, pokud tam na začátku molekula nebyla, pravděpodobně se tam nestačí za daný časový interval žádná objevit (na začátku i na konci intervalu je $\delta F < 0$), pak součin odchylek na začátku a na konci intervalu bude většinou kladný a jeho vystředováním přes celé měření dostaneme kladné číslo. Pokud zvolíme dlouhý časový interval τ , v detekčním objemu se během něj vystřídá několik různých molekul. Intenzita fluorescence na začátku intervalu nijak nesouvisí s intenzitou na konci. Součin odchylek na začátku a na konci intervalu má náhodné hodnoty, někdy kladné, někdy záporné. Při vystředování přes celé měření dostaneme nulu.

Časový interval τ_D , pro který má autokorelační funkce poloviční hodnotu, než má ve svém maximu, pak můžeme považovat za průměrnou dobu, po kterou se jedna molekula zdržuje v detekčním objemu.

Odchylku od průměrného fluorescenčního signálu v čase t je možné vyjádřit jako

$$\delta F(t) = \int W(\mathbf{r}) \delta(\eta C(\mathbf{r}, t)) d\mathbf{r} \quad (4)$$

kde integrujeme přes detekční objem. C je lokální koncentrace částic, η parametr nezávislý na prostorových souřadnicích, který určuje počet fotonů detegovaný z jedné částice za jednu sekundu (závisí na celkové intenzitě excitačního světla, účinnosti detekce, účinném průřezu absorpce světla a kvantovém výtěžku fluorescence). $W(\mathbf{r})$ udává prostorové rozložení emitovaného světla. Často se aproximuje třídídimenzionální Gaussovou funkcí

$$W(\mathbf{r}) = e^{-\frac{2x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} \quad (5)$$

kde z_0 udává charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu a r_0 rozměr v ohniskové rovině.

Pokud budeme předpokládat, že u částic, které sledujeme, se parametr η nemění v čase a částice se pohybují volnou difuzí ve třech dimensích, je možné odvodit teoretický tvar autokorelační funkce:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (6)$$

V_{eff} je efektivní detekční objem,

$$V_{\text{eff}} = \pi^2 \cdot r_0^2 \cdot z_0 \quad (7)$$

τ_D je tzv. difuzní čas, parametr udávající, jak dlouho je částice v detekčním objemu, souvisí s difuzním koeficientem D fluoreskující molekuly vztahem:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (8)$$

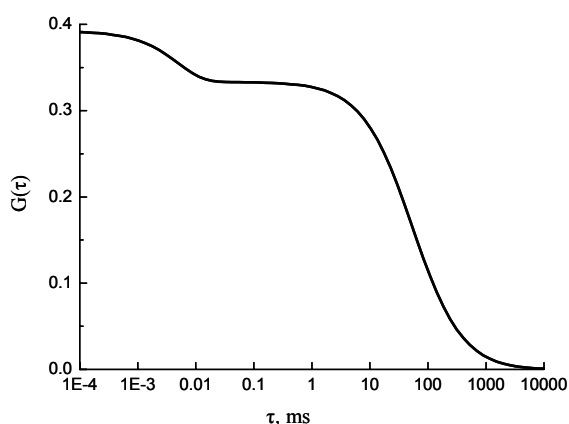
Pokud tedy naměříme fluktuující fluorescenční signál, spočítáme autokorelační funkci podle vztahu (1) a proložíme ji teoretickou závislostí (6), můžeme získat důležité informace o sledovaném systému: difuzní čas τ_D , který charakterizuje rychlost pohybu molekul ve vzorku, průměrný počet částic („particle number“ – PN) v detekčním objemu:

$$PN = \frac{1}{G(0)} = V_{\text{eff}} \langle C \rangle \quad (9)$$

a pokud známe rozměry detekčního objemu, můžeme určit difuzní koeficient a koncentraci dané látky.

4. Tripletní stav fluoreskující molekuly

Při odvozování předchozích vztahů jsme předpokládali, že se v čase nemění fluorescenční vlastnosti fluoroforu – parametr η . Pro reálná fluorescenční barviva to ale neplatí. Po excitaci ze základního singletního stavu do excitovaného singletního stavu může totiž barvivo přejít do tripletního stavu. Přejed z tripletu zpět do základního singletního stavu trvá řádově delší dobu než vyzáření fluorescenčního kvanta. V této době molekula nemůže vyzářit foton. To se projeví tmavými intervaly, během kterých molekula procházející detekčním objemem nesvítí. Díky tomuto „blikání“ fluoroforu se změní tvar autokorelační funkce v oblasti krátkých časů τ (viz obr. 4).



Obr. 4. Tvar autokorelační funkce při přechodu barviva do tripletního stavu ($PN = 3$, $\tau_D = 54$ ms, $z_0/r_0 = 7$, $T = 0,15$, $\tau_r = 5$ μ s)

Pokud platí, že doba života tripletního stavu je řádově menší než τ_D , lze tyto děje oddělit:

$$G_{celk}(\tau) = G_{pohyb}(\tau) \cdot X_{triplet}(\tau) \quad (10)$$

Dynamiku tripletního stavu můžeme vyjádřit vztahem:

$$X_{triplet}(\tau) = \frac{1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{tr}}}}{1 - T} \quad (11)$$

kde τ_{tr} je relaxační čas tripletního stavu a T je podíl částic, které se nacházejí v tripletním stavu. Naměřené autokorelační funkci pak můžeme proložit křivku:

$$G(\tau) = \frac{1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{tr}}}}{1 - T} \cdot \frac{1}{PN} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (12)$$

Analogicky jako přechod do tripletního stavu můžeme do analýzy autokorelační křivky zahrnout další rychlé jevy, které způsobují přechody mezi stavem, kdy molekula fluoreskuje, a mezi stavem, kdy nesvítí, a zároveň neovlivňují difuzní koeficient molekuly.

5. Korelace dvou různých signálů a dvoubarevná FCS

Kromě autokorelační funkce lze také spočítat korelaci dvou různých signálů (kroskorelaci). V tomto případě sledujeme podobnost jednoho signálu s jiným signálem po daném časovém intervalu τ .

Typické využití kroskorelace dvou signálů je v dvoubarevné fluorescenční korelační spektroskopii^{4,5}. Při použití této techniky se dva druhy molekul označí dvěma fluorescenčními barvami, která mají dostatečně odlišné emisní vlnové délky. Fluorofory jsou vybudeny excitačním světlem o dvou různých vlnových délkách. Pomocí dichroického zrcadla a filtrů je rozlišena jejich fluorescence. Je detegována dvěma detektory. Můžeme pak spočítat autokorelační funkce jednotlivých komponent i jejich kroskorelaci. Tato technika se používá např. při sledování vytváření komplexů dvou molekul.

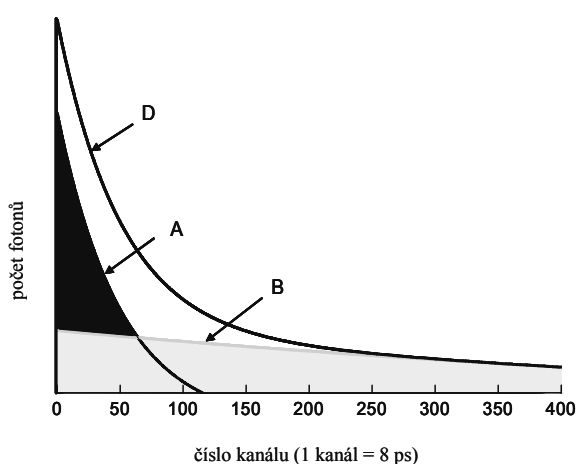
U dvoubarevné FCS je nicméně obtížné nastavit optickou aparaturu tak, aby se přesně překrývaly oba fokusované svazky o různých vlnových délkách. Tento problém lze omezit při dvoufotonové excitaci – lze najít dvojice barviv s dostatečně vzdálenými maximy emisního spektra, které je možné excitovat zářením o jedné infračervené vlnové délce⁶.

6. Časově rozlišená FCS

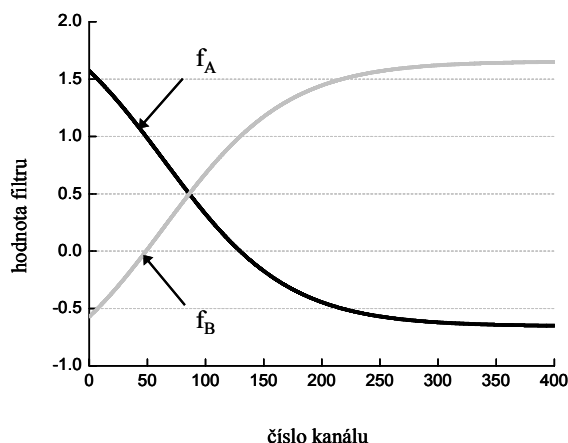
Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (fluorescence lifetime correlation spectroscopy – FLCS)⁷ využívá spojení dvou experimentálních přístupů – FCS a TCSPC (časově korelovaného čítání fotonů). Umožňuje rozlišit ve směsi fluorofory, které se liší dobou života. Lze tak získat autokorelační funkce jednotlivých fluoroforů i jejich kroskorelaci.

Vzorek je excitovaný krátkými laserovými pulsy opakovací frekvencí v řádu desítek MHz. Pro každý foton přicházející na detektor jsou zaznamenány dva časy: „makročas“, který zaznamenává polohu registrovaného fotonu na kontinuální časové ose od začátku experimentu, a „mikročas“, který udává, jaká doba uplynula mezi posledním laserovým pulsem a zaregistrováním daného fotonu. „Makročas“ je měřený s přesností v řádu sto nanosekund, „mikročas“ s přesností v řádu desítek pikosekund. V „makročase“ se projeví difuze molekul, přechody do tripletního stavu a podobně. Hodnota „mikročasu“ nám poskytuje informace o průběhu dohasínání fluorescence fluoroforu, ze kterého byl daný foton emitován⁸.

V jednoduchém případě zkoumáme vzorek složený ze dvou komponent označený dvěma barvami s odlišnými dobami života fluorescence. U obou barviv musíme do předu znát jejich průběh dohasínání (viz fluorofor A a fluorofor B na obr. 5). Z průběhu dohasínání jednotlivých barviv a z dohasínání měřeného vzorku (údaj získaný z „mikročasu“ přicházejících fotonů) je možné spočítat statistické filtry f_A a f_B (viz obr. 6). Tyto filtry určují, ke kterému fluoroforu se s jakou vahou mají přiřazovat fotony přicházející v určitých „mikročasech“. Například pokud přijde foton velmi brzy po laserovém pulzu, je pravděpodobnější, že pochází od fluoroforu A. Do průběhu intenzity fluorescence fluoroforu A, ze které se pak počítá autokorelační funkce komponenty označené fluoroforem A, se



Obr. 5. Dohasínání směsi dvou fluorescenčních barviv; A – fluorofor s kratší dobou života, B – fluorofor s delší dobou života, D – dohasínání fluorescence ve směsi fluoroforů A a B



Obr. 6. Statistické filtry pro dvě fluorescenční barviva; A – fluorofor s kratší dobou života, B – fluorofor s delší dobou života

tak tento foton započítá s koeficientem $f_A = 1,5$. Celkově se ale tento foton smí započítat pouze jednou, proto se do průběhu intenzity fluorescence komponenty označené fluoroforem B započítá s koeficientem $f_B = -0,5$. Pro fotony přicházející ve vyšších „mikročasech“ je pravděpodobnější, že patří fluoroforu B, proto se započítají s kladnou vahou do intenzity fluoroforu B a se zápornou vahou do intenzity fluoroforu A (obr. 6).

Použitím filtrů vzniknou ze signálu celého vzorku dva oddělené signály – od komponenty označené fluoroforem A a od komponenty označené fluoroforem B. Jejich intenzity fluktuují v čase (v našem označení se jedná o „makročas“). Z těchto signálů můžeme spočítat jak auto-korelační funkce obou komponent, tak jejich vzájemnou kroskorelaci.

Výhodné je využít FLCS při zkoumání procesů, při kterých se mění doba života fluorescenčního barviva v důsledku změny jeho nejbližšího okolí. Příkladem takového děje je kondenzace DNA. Interkalační barvivo, kterým je DNA obarvená, má jinou dobu života ve zkonzenzované a nezkonzenzované molekule DNA. Proto můžeme sledovat zvlášť signál od nezkonzenzovaných a zkonzenzovaných molekul DNA a získat tak bližší informace⁹ o mechanismu sbalení řetězce DNA.

7. Závěr

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) měří a analyzuje fluktuace fluorescenčního signálu způsobené difuzním pohybem fluorescenčně značených molekul. Z těchto fluktuací je možné určit difuzní koeficient dané látky a její koncentraci. V dvoubarevné FCS se navíc kroskorelují signály pocházející ze dvou skupin molekul označených barvivy s odlišným emisním spektrem. Tato metoda je vhodná pro sledování vytváření komplexů. Časově rozlišená FCS je založená na použití pulsní excitace, umožňuje rozlišit signály pocházející od fluorescenčních značek, které se liší dobou života.

LITERATURA

1. Magde D., Elson E. L., Webb W. W.: *Biopolymers* 13, 29 (1974).
2. <http://www.biophysics.org/education/schwille.pdf>, staženo 22. dubna 2008.
3. Medina M. A., Schwille P.: *Bioessays* 24, 758 (2002).
4. Thompson N. L., Lieto A. M., Allen N. W.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 634 (2002).
5. Schwille P., Meyer-Almes F. J., Rigler R.: *Biophys. J.* 72, 1878 (1997).
6. Heinze K. G., Koltermann A., Schwille P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10377 (2000).
7. Böhmer M., Wahl M., Rahn H., Erdmann R., Enderlein J.: *Chem. Phys. Lett.* 353, 439 (2002).
8. Kapusta P., Wahl M., Benda A., Hof M., Enderlein J.: *J. Fluoresc.* 17, 43 (2007).
9. Humpolíčková J., Benda A., Sýkora J., Macháň R., Kral T., Gasinska B., Enderlein J., Hof M.: *Biophys. J.* 94, L17 (2008).

L. Beranová, J. Humpolíčková, and M. Hof
(*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Fluorescence Correlation Spectroscopy**

Basic principles of fluorescence correlation spectroscopy (FCS) are explained. The method affords diffusion coefficients and concentrations of fluorescent-labeled species by studying temporary fluctuations of fluorescence signal caused by diffusion through the focal volume of confocal microscope. In dual-color FCS, cross-correlation of two signals from molecules labeled with two spectrally shifted dyes allows to observe interactions between the two molecules. It is also possible to distinguish between the signals of two dyes with different lifetimes. FCS uses pulsed laser excitation.

FYZIKÁLNÍ GELY V KAPILÁRNÍ GELOVÉ ELEKTROFORÉZE A JEJICH UPLATNĚNÍ V ANALÝZE BÍLKOVIN

TOMÁŠ KRÍŽEK^a, PAVEL COUFAL^a,
ZUZANA BOSÁKOVÁ^a, EVA TESAŘOVÁ^b
a JANA SOBOTNÍKOVÁ-SUCHÁNKOVÁ^a

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 40 Praha,

^b Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Albertov 2030, 128 40 Praha
krizek@natur.cuni.cz

Došlo 12.11.07, přijato 15.8.08.

Klíčová slova: kapilární gelová elektroforéza, fyzikální gely, proteiny

Obsah

1. Úvod
2. Fyzikální gely a jejich vlastnosti
3. Separační mechanismy v kapilární gelové elektroforéze
4. Problematika adsorpce bílkovin
5. Syntetické polymery
6. Gely na bázi polysacharidů
7. Závěr

1. Úvod

Výsledky výzkumů v oblasti proteomiky nacházejí uplatnění v nejrůznějších oborech lidské činnosti od potravinářského průmyslu přes medicínu až po ekologii. K proteomice neodmyslitelně patří také analýza předmětu jejího zájmu – bílkovin. Vlastnosti bílkovin, jako jsou polarita, hodnota izoelektrického bodu nebo molekulová hmotnost, mohou být velmi různé, a proto není jejich analýza jednoduchá. Navíc se pracuje s biologickými vzorky, jejichž matrice jsou nejen složité, ale také velmi rozmanité. V důsledku toho neexistuje, navzdory intenzivnímu rozvoji proteomiky, metoda, která by byla pro analýzu bílkovin obecně použitelná. Vždy je nutno zvolit vhodný přístup a optimalizovat jej pro daný problém. Přehled nejnovějších trendů ve vývoji metod pro analýzu bílkovin podává Oliva ve svém nedávném článku¹. Mezi často používané techniky patří HPLC, kde se využívají separace jak na náplňových, tak na monolitických kolonách. Problematiku těchto separačních médií shrnul Jungbauer². Poměrně intenzivně se rovněž vyvíjejí metody využívající kapilární

elektrochromatografii. S aplikacemi této techniky při separaci bílkovin a peptidů se čtenář může seznámit prostřednictvím článku Mikšíka a Sedlákové³. Dalším možným přístupem k analýze bílkovin je aplikace kapilární gelové elektroforézy (CGE), někdy rovněž označované jako gelová kapilární elektrochromatografie⁴. Tato technika je na poli proteomiky perspektivní mimo jiné právě proto, že poskytuje dostatečný prostor pro úpravu podmínek analýzy tak, aby co nejlépe vyhovovaly určité aplikaci^{5,6}. Již při výběru separačního gelu se nabízí množství alternativ. V zásadě však lze volit mezi dvěma hlavními skupinami separačních médií, a to mezi gely fyzikálními a chemickými⁷. V obou případech je gel tvořen dlouhými polymerními řetězci, rozdíl však spočívá ve způsobu, jakým jsou tyto řetězce navzájem propojeny. Chemické gely jsou zesíťovány kovalentními vazbami. Při aplikaci v CGE mohou být tyto gely také kovalentně vázány k vnitřnímu povrchu kapiláry. Do této skupiny patří např. polyakrylamidový gel používaný při gelové elektroforéze v plošném uspořádání. Struktura gelů fyzikálních je naproti tomu dána fyzikálními interakcemi mezi řetězci, jako jsou vodíkové můstky a hydrofobní interakce, a také vzájemným zauzlením řetězců polymeru. Právě fyzikálními gely používanými pro separaci bílkovin metodou CGE se zabývá předkládaný přehledný článek.

2. Fyzikální gely a jejich vlastnosti

Jak již bylo řečeno, polymerní řetězce fyzikálního gelu nejsou zesíťovány kovalentními vazbami, v důsledku čehož vykazují nižší viskozitu než gely chemické. To spolu s faktem, že gel není vázán k vnitřní stěně kapiláry, umožňuje snadnou výměnu separačního média po každé analýze jeho prostým vytlačněním. Výměnou gelu se eliminují problémy spojené s jeho degradací a kontaminací během analýzy, což v konečném důsledku prodlužuje životnost kapiláry. Důležitou vlastností gelu je jeho propustnost či nepropustnost pro UV záření. Gely absorbující UV záření výrazně snižují citlivost nejčastěji používaného UV spektrofotometrického detektoru, a proto se snažíme, pokud je to možné, dávat přednost gelům UV transparentním. V rámci optimalizace metody CGE je kromě druhu, koncentrace a pH separačního pufru významným a snadno nastavitelným parametrem rovněž koncentrace gelující složky, která určuje viskozitu a hustotu polymerní sítě. Podobný vliv na kvalitu separačního gelu má i střední molekulová hmotnost použitého polymeru. Obecně platí, že polymery o vyšší molekulové hmotnosti a koncentraci mají vyšší separační účinnost, avšak s rostoucí délkou řetězců a zvyšující se koncentrací polymeru roste i viskozita gelu, což může působit potíže při jeho přípravě a manipulaci s ním. Proto je nutné najít mezi těmito dvěma

tendencemi přijatelný kompromis. Vhodnou volbou koncentrace a průměrné molekulové hmotnosti polymeru je možné také modifikovat metodu pro analýzu bílkovin různých molekulových hmotností a v případě, že je rozlišení analytů pro daný účel zbytečně velké, lze snížením množství gelu zkrátit i dobu analýzy.

3. Separační mechanismy v kapilární gelové elektroforéze

Separace proteinů metodou CGE se často provádějí v pufru s malým přídavkem natrium-dodecylsulfátu (SDS). Tato látka interaguje svými alifatickými řetězci s bílkovinami a vytváří s nimi záporně nabitě komplex. Přitom větší molekuly bílkovin interagují současně s více molekulami SDS a získávají tak větší náboj než proteiny menší. Díky tomu mají pak komplexy s různě velkými molekulami bílkovin podobné elektroforetické mobility a jejich separace probíhá pouze na základě síťového efektu. Rychlost jejich migrace je v tomto případě určována jejich velikostí, resp. molekulovou hmotností. Probíhá-li separace výlučně tímto mechanismem, jsou migrační časy proteinů lineární funkcí logaritmu jejich molekulové hmotnosti.

Při provedení analýzy bez přítomnosti SDS se proteiny separují na základě kombinace již zmíněného síťového efektu a rozdílů v jejich mobilitách, které jsou dány poměrem jejich hmotnosti k jejich celkovému náboji. Celkový náboj bílkovin je přitom silně závislý na pH separačního pufru. Dále mohou k separaci přispívat i více či méně specifické interakce proteinů se separačním gelem (např. hydrofobní interakce), které výrazně zpomalují migraci určitého analytu nebo celé skupiny analytů.

4. Problematika adsorpce bílkovin

Při CGE na fyzikálních gelech, a nejen na nich, je nutno řešit i problém adsorpce proteinů na vnitřní stěnu kapiláry. Z tohoto důvodu se mnohdy používají kapiláry s pokrytými vnitřními stěnami. To nejen snižuje míru adsorpce bílkovin, ale také potlačuje elektroosmotický tok, který může během separace vymývat gel z kapiláry. Pokrytí je možné realizovat chemickým navázáním tenké vrstvy vhodného polymeru, což nazýváme statické neboli permanentní pokrytí^{8,9}. Druhým způsobem je pokrytí dynamické, kdy je polymerní film k povrchu kapiláry poután pouze fyzikální adsorpcí či elektrostatickou interakcí¹⁰⁻¹². Při použití dynamické metody pokrývání se kapilára před separací promývá roztokem aktivní látky modifikující vnitřní povrch kapiláry, a během separace je tato látka v malé koncentraci přítomna i v separačním pufru. Dynamická a statická pokrytí vnitřního povrchu separační kapiláry nabízejí širokou paletu možností a jsou předmětem neustálého vývoje^{5,13,14}. Další možnosti, jak potlačit elektroosmotický tok a adsorpci bílkovin, je provádět separace v prostředí o nízkém pH, v němž nedisociují silanolové

skupiny na povrchu separační kapiláry. Výhoda tohoto způsobu spočívá v tom, že není nutná předchozí úprava kapiláry, a že odpadají problémy s životností pokrytí. V mnohých případech však nemusí být snížení pH dostatečným prostředkem k potlačení adsorpce analytů. Tento přístup rovněž znemožňuje separaci proteinů v nativním stavu, což je podmínkou při studiu jejich interakcí a biologických funkcí. Posledně jmenovanou nevýhodu je možné kompenzovat využitím hystereze pH (cit.¹⁵), kdy se kapilára před analýzou promývá silně kyselým roztokem (pH 1). Pufr používaný při následné separaci má pH vyšší, avšak díky pomalému ustavování rovnováhy mezi vnitřním povrchem kapiláry a separačním pufrům zůstávají silanolové skupiny na vnitřní stěně kapiláry nedisociovány po dobu dostatečně dlouhou k provedení analýzy, takže lze separovat bílkoviny v nativním stavu i v nemodifikované kapiláře¹⁵.

5. Syntetické polymery

Jako fyzikální gely pro separační média v CGE se nabízejí dvě základní skupiny polymerů. Jednou z nich jsou syntetické polymery, druhou pak polymery přírodní, zpravidla na bázi polysacharidů. Přehled vybraných aplikací zmiňovaných v tomto článku je uveden v tab. I.

Ze syntetických polymerů se často používají lineární polyakrylamid¹⁶⁻¹⁹, polyvinylalkohol^{20,21} a polyethylenglykol²²⁻²⁶. Lineární polymer akrylamidu použili Werner a spol.¹⁶ pro separaci sedmi proteinů o molekulových hmotnostech v rozmezí 14–205 kDa v přítomnosti SDS. Vzhledem k tomu, že lineární polyakrylamid slouží jednak jako separační médium a jednak pokrývá vnitřní stěny kapiláry, mohla být separace s úspěchem provedena v nepokryté křemenné kapiláře. Nevýhodou polyakrylamidu je však jeho vysoká absorpce při 214 nm, která omezuje citlivost a zvyšuje detekční limity metody. Naproti tomu polyethylenglykol (PEG) vykazuje v UV oblasti spektra absorpční výrazně nižší. Ganzler a spol.²² jej použili v 3% koncentraci pro separaci šesti proteinů (14 až 97 kDa) v přítomnosti SDS v kapiláře dynamicky pokryté dextranem, jenž bude podrobněji zmíněn v další části. PEG o stejné koncentraci a rovněž v pufru s přídavkem SDS použili také Benedek a spol.²³ k separaci pěti bílkovin v rozmezí molekulových hmotností 14–97 kDa. V jejich provedení však byla použita nepokrytá separační kapilára. Podle studie provedené autory citovaného článku není vliv pokrytí kapiláry na separaci příliš velký, avšak prodlužuje její životnost. Podobně jako lineární polyakrylamid i PEG tedy zřejmě pokrývá vnitřní povrch kapiláry a zároveň funguje jako separační médium. Autoři dále v souladu s obecným předpokladem uvádějí, že s rostoucí koncentrací PEG se rozšiřuje separační oblast, tj. rozmezí na ose retenčního času, v němž se nacházejí piky bílkovin. Tím roste i rozlišení analytů, přičemž účinnost separace zůstává bez výrazných změn. Třetí z výše jmenovaných polymerů, polyvinylalkohol (PVA), použili Simo-Alfonso a spol.²⁰ v 5–6% koncentraci v kapiláře staticky pokryté 2-(2-akrylamidoethoxy)ethan-1-olem k separaci šesti bílkovin

Tabulka I

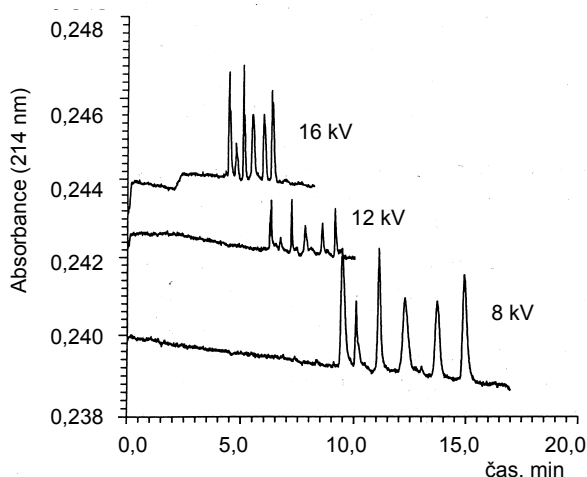
Přehled aplikací fyzikálních gelů v kapilární gelové elektroforéze pro separaci bílkovin

| Gel | Předúprava kapiláry | Princip separace | pH | Teplota [°C] | Separované analyty | Poznámka | Lit. |
|--|---------------------------------------|-----------------------------------|------|--------------|---|--|------|
| lineární polyakrylamid | ne | sítový efekt | 8,0 | 30 | α -laktalbumin, karbonátdehydratasa, ovalbumin, BSA, fosforylasa b, β -galaktosidasa, myosin | vysoká absorpce gelu při 214 nm | 13 |
| 10% dextran, SDS | ne | sítový efekt | 8,8 | 20 | myoglobin, karbonátdehydratasa, ovalbumin, BSA, β -galaktosidasa a myosin | dlouhá životnost kolony | 17 |
| 3% polyethylen-glykol, SDS | pokrytí dextranem | | | | | | |
| 3% polyethylen-glykol 100 kDa | ne | sítový efekt | 8,5 | 20 | α -laktalbumin, sojový inhibitor trypsinu, karbonátdehydratasa, ovalbumin, BSA, fosforylasa b | pokrytí kapiláry prodlužuje životnost kolony | 19 |
| 10% dextran 2 MDa | 2-(2-akrylamidoethoxy)ethan-1-ol | sítový efekt | 10,5 | 20 | α -laktalbumin, inhibitor trypsinu, karbonátdehydratasa, ovalbumin, BSA, fosforylasa b | | 20 |
| 4% polyvinylalkohol | 2-(2-akrylamidoethoxy)ethan-1-ol | | | | | | |
| 7,5% Pluronic F127 | ne | dle poměru z/m + | 2,5 | 20 (50) | CNBr fragmenty kolagenu | při 5 °C kapalina, | 24 |
| 10% Pluronic F127 | ne | sítový ef. + hydrofobní interakce | 2,5 | 20 | peptidové štěpy nerozpustných proteinů slepičí skořápky | při 20 °C gel | 25 |
| 5% Pluronic F127, SDS | ne | | 2,5 | 20 | proteiny do 50 kDa | | 26 |
| 7,5% Pluronic F127 | hydrofilní pokrytí | | 2,5 | 20 | cytochrom C, aldolasa, katalasa, chymotrypsinogen, albumin, polylysin | | 27 |
| 15% Pluronic F127 (gelová zátka) | ne | | 2,5 | 40 | peptidy kolagenu, peptidy získané natrávením BSA trypsinem | | 28 |
| dextran 2 MDa, SDS | [3-(glycidylxy)propyl]trimethoxysilan | sítový efekt | 8,6 | 20 | karbonátdehydratasa, BSA, ovalbumin, fosforylasa b | separace do 2 min, složitě vzorky do 12 min | 29 |
| 7% pullulan, SDS | lineární polyakrylamid | sítový efekt | 8,7 | 20 | α -laktalbumin, inhibitor trypsinu, karbonátdehydratasa, ovalbumin, fosforylasa b, BSA, β -galaktosidasa | separace do 13 min | 31 |
| 0,1–0,2% roztok kationtového derivátu škrobu, použit i k pokrytí vnitřních stěn kapiláry | nebyl diskutován | | 7,5 | 20 | insulin β , ribonukleasa A, karbonátdehydratasa II, α -chymotrypsinogen A | separace do 13 min | 32 |

s molekulovými hmotnostmi v rozmezí 14–94 kDa. PVA je podobně jako PEG propustný pro UV záření od 200 nm výše, takže ani tento polymer nepůsobí potíže při UV spektrofotometrické detekci. Autoři článku navíc studovali zajímavý stěnový efekt, kdy použití kapiláry o vnitřním průměru 25 μ m namísto 75 μ m umožňuje účinnou separaci proteinů již při 1% koncentraci PVA, což je hodnota

ležící hluboko pod mezí zauzlení. Ta se u PVA pohybuje okolo 3%. Důsledkem použití kapiláry takto malého průměru je ovšem rovněž snížení citlivosti detekce. Autoři proto volí kompromis a doporučují 4% PVA v separační kapiláře o vnitřním průměru 50 μ m. Separaci bílkovin za těchto podmínek ilustruje obr. 1.

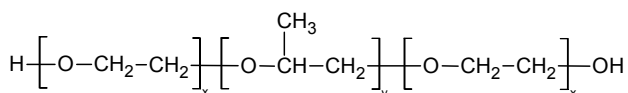
Zvláštním typem syntetických polymerů jsou gely



Obr. 1. Separace bílkovin v pufru o pH 8,8 s přidavkem 4 % polyvinylalkoholu a 0,1 % SDS. Píky zleva doprava: α -laktalbumin, inhibitor trypsinu, karbonátdehydratasa, ovalbumin, hovězí sérový albumin, fosforylasa b. Simo-Alfonso a spol.²⁰, převzato se svolením autora

citlivé na teplotu, tzv. termoresponzivní gely. Mezi ně patří např. Pluronic F127, jehož struktura je znázorněna na obr. 2.

Možnosti aplikace tohoto gelu studovala skupina Mikšíka^{27–30}. Jde o zástupce široké skupiny trojblokových kopolymerů (Pluronic), jejichž koncové bloky jsou tvořeny poly(ethylenoxidem), zatímco prostřední blok je tvořen poly(propylenoxidem). Kopolymer asociují do velkých micel tím způsobem, že méně polární polypropylenoxidové bloky tvoří jádro micely, které je obklopeno více hydratovanými bloky polyethylenoxidovými. Viskozita roztoku tohoto polymeru je silně závislá na jeho koncentraci a také na teplotě. Roztok obsahující 20 % polymeru Pluronic F127 je kapalný při 5 °C a zahřátím na teplotu 20 °C nabývá gelové konzistence. To je výhodné, protože za laboratorní teploty během analýzy nehrozí vymývání gelu z kapiláry elektroosmotickým tokem, zatímco snížení teploty umožňuje jeho snadnou výměnu. Nevýhodou je naopak časová náročnost přípravy, která vyžaduje plnění kapiláry za snížené teploty a kontrolu teploty pro správnou tvorbu gelu. Proto byl Pluronic F127 používán v nižších koncentracích, což proces výrazně zjednodušilo. Pluronic



Obr. 2. Strukturální vzorec polymeru Pluronic F127; $x = 106$, $y = 70$

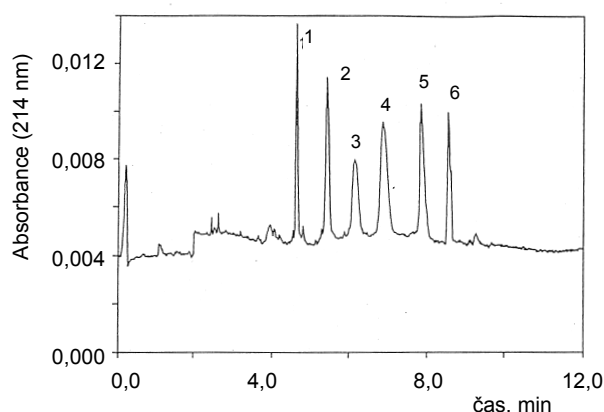
F127 byl použit v koncentraci 7,5–10 % pro separace peptidových štěpů bílkovin v nepokryté kapiláře v pufru o nízkém pH, aby byla potlačena adsorpce analytů na stěnu kapiláry^{27,28}. Některé studie naznačují, že přidavek organických modifikátorů do separačního pufru nemá podstatný vliv na výsledek separace. Při studiu vlivu zvýšené teploty se ukázalo, že při 50 °C probíhá analýza sice rychleji než při 20 °C, současně se však zhoršuje rozlišení²⁷. V koncentraci 5 % byl Pluronic F127 použit také k separaci proteinů o molekulové hmotnosti do 50 kDa v přítomnosti SDS a v nepokryté kapiláře²⁹. V další popsané aplikaci byl tento gel použit k separaci směsi šesti bílkovin se širokým rozsahem molekulových hmotností v hydrofilně pokryté kapiláře³⁰. Výsledky naznačují, že separace na tomto gelu probíhá v kyselém pufru bez přítomnosti SDS podle poměru hmotnosti k náboji a na základě síťového efektu s určitým příspěvkem hydrofobních interakcí. Sedláková a spol.³¹ plnili týmž kopolymerem kapiláru pouze částečně. Separace peptidů pak probíhala zčásti v gelu a zčásti ve volné kapiláře. Některé analyty byly zřejmě v naplněné části kapiláry specificky zadrženy, což výrazně zpomalilo jejich migraci. Patrně se zde uplatnily již zmiňované hydrofobní interakce. Interakce analytů se separačním gelem může být v jistých aplikacích výhodou, jindy je však naopak na obtíž a je tedy nutné použitelnost gelu v daném případě experimentálně ověřit.

6. Přírodní polymery

Z přírodních polymerů se v CGE nejvíce používají polysacharidy, případně jejich deriváty. Často používaným polysacharidem je dextran^{20,22,32,33}. Simo-Alfonso a spol.²⁰ takto separovali šest bílkovin (14–94 kDa) v kapiláře pokryté 2-(2-akrylamidoethoxy)ethan-1-olem v alkalickém prostředí. Autoři uvádějí, že pro proteiny s nižší molekulovou hmotností (do 20 kDa) je lepšího rozlišení dosaženo s dextranem s kratšími řetězci, zatímco u proteinů s vyšší molekulovou hmotností se lépe osvědčily řetězce delší. Ganzler a spol.²² použili dextran v nepokryté kapiláře v přítomnosti SDS k separaci šesti bílkovin v rozmezí molekulových hmotností 14–97 kDa. Výsledek této separace je ukázán na obr. 3.

Laush a spol.³² publikovali metodu pro rychlou separaci proteinů s dextranem v krátké kapiláře pokryté [3-(glycidyloxy)propyl]trimethoxysilanem v přítomnosti SDS. Separace čtyř bílkovin s molekulovou hmotností v rozmezí 29–97 kDa bylo za výše uvedených experimentálních podmínek dosaženo během dvou minut. Ačkoliv byly všechny proteiny separovány na základní linii, u komplikovanějších směsí by dosažené rozlišení nemuselo být dostatečné. Pro komplexní směsi proto autoři doporučují provést analýzu v delší kapiláře při nižší intenzitě elektrického pole; separace pak proběhne během 12 minut.

Mezi méně běžné polysacharidy patří pullulan, s jehož použitím Nakatani a spol.³⁴ provedli třináctiminutovou separaci sedmi bílkovin (14–116 kDa) v kapiláře pokryté lineárním polyakrylamidem v pufru s přidavkem



Obr. 3. Separace bílkovin v pufru o pH 8,8 s přidavkem 10 % dextranu a 0,1 % SDS. Píky: (1) myoglobin, (2) karbonát-dehydratasa, (3) ovalbumin, (4) hovězí sérový albumin, (5) β -galaktosidasa, (6) myosin. Ganzler a spol.²², převzato se svolením autora

SDS. Kationtové deriváty škrobu, ne však jako separační gel, nýbrž jako dynamické pokrytí vnitřních stěn kapiláry, použili Sakai-Kato a spol.³⁵ při separaci směsi čtyř bazických bílkovin. Zde je však vhodné poznamenat, že kladný náboj použitého pokrytí, který je velmi výhodný pro separaci bazických proteinů (elektrostaticky je odpuzuje), může být naopak problematický při separaci kyselých bílkovin.

7. Závěr

Tento přehled si klade za cíl podat stručný, zdaleka ne však úplný přehled často používaných gelů a způsobů běžně sloužících k optimalizaci separace bílkovin při CGE. Aplikace fyzikálních gelů při CGE přináší oproti chemickým gelům především možnost výměny separačního média po každé analýze, čímž se prodlužuje životnost kapilár a dosahuje dobré reprodukovatelnosti výsledků. Existuje mnoho faktorů, jejichž variací je možné optimalizovat metodu CGE pro potřeby určité proteomické aplikace. Významným faktorem je přitom především druh gelu, jeho střední molekulová hmotnost, jeho koncentrace a dále způsob potlačení adsorpce bílkovin na vnitřní stěně kapiláry. Při volbě gelu je dobré věnovat pozornost jeho propustnosti pro UV záření, neboť jeho omezená propustnost resp. nepropustnost omezuje použitelnost UV spektrofotometrické detekce. Z tohoto hlediska se například polyakrylamid jeví jako nevýhodný. Pro potlačení adsorpce bílkovin na stěnách kapiláry se nabízí možnost statického či dynamického pokrytí kapiláry, a také práce v separačním pufru o nízkém pH, případně využití hystereze pH. Některé gely jako lineární polyakrylamid nebo polyethylenglykol navíc fungují samy o sobě jako pokrývací médium, takže je možná jejich aplikace i v nepokryté kapiláře. CGE na fyzikálních gelech má mezi nástroji proteomiky své místo

a není pochyb o tom, že vývoj v této oblasti bude pokračovat i v budoucnu. V této oblasti lze také předpokládat rostoucí počet aplikací postupně převáděných nebo přímo vyvíjených v nanoměřítku pro separace bílkovin a peptidů s využitím fyzikálních gelů na mikrofluidních čípech.

TK a PC děkují za finanční podporu Grantové agentury ČR (projekt 203/07/0392), ZB a JS děkují MŠMT ČR (výzkumný záměr MSM0021620857) a ET děkuje MŠMT ČR (projekt Kontakt ME895).

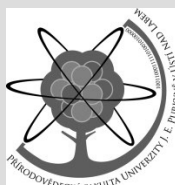
LITERATURA

- Oliva A., Farina J. B., Llabres M.: *Curr. Pharm. Anal.* 3, 230 (2007).
- Jungbauer A.: *J. Chromatogr., A* 1065, 3 (2005).
- Mikšík I., Sedláková P.: *J. Sep. Sci.* 30, 1686 (2007).
- Deyl Z., Švec F. (ed.): *Capillary Electrochromatography*. Elsevier, Amsterdam 2001.
- Schomburg G. v knize: *Capillary Electrophoresis Technology* (Guzman N. A., ed.), kap. 9. Marcel Dekker, New York 1993.
- Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Applications*, kap. 4.3. Elsevier, Amsterdam 1992.
- Weinberger R.: *Practical Capillary Electrophoresis*, kap. 5. Academic Press, San Diego 1993.
- Štřelec I., Pacáková V., Bosáková Z., Coufal P., Guryča V., Štulík K.: *Electrophoresis* 23, 528 (2001).
- Liu Y., Fu R., Gu J.: *J. Chromatogr., A* 723, 157 (1996).
- Chang W. W. P., Hobson C., Bomberger D. C., Schneider L. V.: *Electrophoresis* 26, 2179 (2005).
- Mohabbati S., Westerlund D.: *J. Chromatogr., A* 1121, 32 (2006).
- Quang C., Malek A., Khaledi M. G.: *Electrophoresis* 24, 824 (2003).
- Horvath J., Dolník V.: *Electrophoresis* 22, 644 (2001).
- Kunh R., Hoffstetter-Kunh S.: *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, kap. 5. Springer-Verlag, Berlin 1993.
- Bohlin M. E., Blomberg L. G., Heegaard N. H. H.: *Electrophoresis* 26, 4043 (2005).
- Werner W. E., Demorest D. M., Stevens J., Wiktorowicz J. E.: *Anal. Biochem.* 212, 253 (1993).
- Blanco D., Junco S., Exposito Y., Gutierrez D.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27, 1523 (2004).
- Gomis D. B. L., Junco S., Exposito Y., Gutierrez D.: *Electrophoresis* 24, 1391 (2003).
- Manabe T., Oota H., Mukai J.: *Electrophoresis* 19, 2308 (1998).
- Simo-Alfonso E., Conti M., Gelfi C., Righetti P. G.: *J. Chromatogr., A* 689, 85 (1995).
- Boulis Y., Richet C., Haupt K., Hennebicq S., Soudan B., Tetaert D., Degand P., Vijayalakshmi M. A.: *J. Chromatogr., A* 805, 285 (1998).
- Ganzler K., Greve K. S., Cohen A. S., Karger B. L., Cooke N. C.: *Anal. Chem.* 64, 2665 (1992).

23. Benedek K., Thiede S.: *J. Chromatogr., A* 676, 209 (1994).
24. Bean S. R., Lookhart G. L.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 4246 (1999).
25. Mori A., Leita L.: *J. Plant Nutr.* 21, 2335 (1998).
26. Guttman A., Shien P., Hoang D., Horvath J., Cooke N.: *Electrophoresis* 15, 221 (1994).
27. Mikšík I., Deyl Z.: *J. Chromatogr., B* 739, 109 (2000).
28. Mikšík I., Charvátová J., Eckhardt A., Deyl Z.: *J. Chromatogr., B* 800, 155 (2004).
29. Mikšík I., Eckhardt A., Forgács E., Cserháti T., Deyl Z.: *Electrophoresis* 23, 1882 (2002).
30. Mikšík I., Deyl Z., Kašička V.: *J. Chromatogr., B* 741, 37 (2000).
31. Sedláková P., Svobodová J., Mikšík I.: *J. Chromatogr., B* 839, 112 (2006).
32. Laush R., Scheper T., Reif O. W., Schlösser J., Fleischer J., Freitag R.: *J. Chromatogr., A* 654, 190 (1993).
33. Ostergaard J., Schou C., Larsen C., Heegaard N. H. H.: *Anal. Chem.* 75, 207 (2003).
34. Nakatani M., Shibukawa A., Nakagawa T.: *J. Chromatogr., A* 672, 213 (1994).
35. Sakai-Kato K., Kato M., Nakajima T., Toyo'oka T., Imai K., Utsunomiya-Tate J.: *J. Chromatogr., A* 1111, 127 (2006).

T. Křížek^a, P. Coufal^a, Z. Bosáková^a, E. Tesařová^b, and J. Sobotníková-Suchánková^a (^a *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague,* ^b *Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Physical Gels in Capillary Gel Electrophoresis and Their Application in Protein Analysis**

Capillary gel electrophoresis (CGE) is a promising proteomic technique. It involves many parameters which can be manipulated to optimize the CGE method for particular application, first of all the type of separation gel. Physical gels possess certain advantages over the chemical ones. Not being covalently crosslinked, physical gels exhibit lower viscosity; they are not chemically bonded to the inner capillary wall. Physical gels can readily be replaced after each analysis, which eliminates the problem of gel contamination and degradation during analysis. This fact leads to higher reproducibility of measurements and prolongs the capillary lifetime. In this review, applications of some common physical gels, both synthetic and natural, are described and their advantages and drawbacks are critically evaluated. Attention is paid especially to absorption of physical gels in the UV region, which may limit spectrophotometric detection of analytes to a great extent. The methods for suppression of protein adsorption on the inner capillary wall like static and dynamic coatings as well as separations under acid conditions are also discussed.



Katedra chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně
v Ústí nad Labem

hledá:

Doc. nebo OA pro obor Anorganická chemie (plný nebo částečný úvazek)

Požadavky: VŠ vzdělání příslušného oboru, PhD studium v oboru, odborné práce v oboru, schopnost tvůrčí práce

Předpokládaný nástup: rok 2009 (přesněji dle dohody)

Kontakt: Z. Kolská, e-mail: zdenka.kolska@ujep.cz, tel: 475 283 382

VÝSKYT, ZDROJE A STANOVENÍ KOVŮ V OVZDUŠÍ

MARTIN VOJTĚŠEK^{a,b}, PAVEL MIKUŠKA^a
a ZBYNĚK VEČEŘA^a

^a Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky, v.v.i., Veveří 97, 602 00 Brno, ^b Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
vojtesek@iach.cz

Došlo 18.12.07, přepracováno 10.3.08, přijato 21.5.08.

Klíčová slova: kovy, vzduch, zdroje, stanovení

Obsah

1. Úvod
2. Složení a velikostní distribuce aerosolů, zdroje a výskyt kovů v ovzduší
3. Analýza kovů v aerosolu
 - 3.1. Odběr
 - 3.2. Stanovení
 - 3.3. Biomonitorování
4. Závěr

1. Úvod

Kationty kovů hrají důležitou roli v mnoha biologických a environmentálních systémech. Některé jsou nezbytné pro organismy, jiné jsou naopak toxické. Významnou roli hraje nejenom koncentrace, ale i iontová forma (speciace) daného kovu, na které jsou závislé biodostupnost a fyziologické a toxikologické efekty¹. Jako příklad různorodosti účinků jednotlivých iontových forem téhož kovu lze zmínit dva oxidační stavy chromu – trojmocný a šestimocný. Trojmocný chrom je esenciální složkou potravy pomáhající při trávení cukrů, tuků a bílkovin a nemá na organismus negativní vliv, zatímco šestimocný chrom má vlastnosti diametrálně odlišné. Způsobuje např. podrážděnost nosu, kýchání, svědění, krvácení z nosu, vředy nebo rakovinu plic². Mezinárodní společnost pro výzkum rakoviny zařadila kadmium, nikl, berylium a chrom (VI), případně jejich sloučeniny, mezi prokázané karcinogeny (skupina 1) a olovo je považováno za možný karcinogen (skupina 2a)³. Proto jsou legislativně sledovány obsahy některých kovů ve vodě, v ovzduší, v půdě a v biologických materiálech^{4–6}. Česká legislativa uvádí nejvyšší přípustné roční limity pro olovo $0,5 \mu\text{g m}^{-3}$, rtuť 50 ng m^{-3} , arsen 6 ng m^{-3} , kadmium 5 ng m^{-3} a nikl 20 ng m^{-3} . Naproti tomu legislativa Evropské unie udává z kovů pouze roční limit pro olovo $0,5 \mu\text{g m}^{-3}$ a Americká agentura pro

ochranu životního prostředí (U. S. EPA) uvádí čtvrtletní limit pro olovo $1,5 \mu\text{g m}^{-3}$.

Kovy se dostávají do ovzduší z antropogenních nebo přírodních zdrojů a jsou většinou vázány na částicích atmosférického aerosolu, které pronikají do dýchacích orgánů lidského organismu⁷. Pro lidský organismus jsou nejnebezpečnější aerosolové částice v ovzduší menší než $10 \mu\text{m}$ pronikající do dýchacího traktu, přičemž částice menší než $2,5 \mu\text{m}$ se snadno dostávají až do plicních sklípků⁸. Tato velikostní frakce aerosolu má proto vysoký potenciál zdravotního rizika^{9,10}. V USA a v Evropě byl pozorován úbytek lesů, způsobený atmosférickými polutanty – mimo jiné také kovy na aerosolu – pocházejícími z průmyslových zdrojů¹¹.

Jednotlivé kovy se liší formou, ve které se na aerosolu nachází, dále rozpustností ve vodě, a tím i mírou toxicity. Nikl a kadmium mají vysoký potenciál biodostupnosti. Al, Fe, Mn a Co se nachází většinou ve formě uhličitánů nebo oxidů. Pb, Cu, Ni a Cr byly nalezeny ve frakci oxidů a Cd vázané na organickou hmotu^{10,12}.

Mezi přírodní zdroje kovů v aerosolu patří např. půdní eroze, mořská sůl, geologické procesy (sopečná činnost), minerály a horniny a z antropogenních zdrojů jmenujme např. spalovací procesy (doprava, spalovny, domácí topeniště, elektrárny), průmyslovou činnost (metalurgické provozy, vysoké pece) a prach z povrchů vozovek.

2. Složení a velikostní distribuce aerosolů, zdroje a výskyt kovů v ovzduší

Koncentrace kovů na aerosolových částicích s ohledem na velikostní distribuci aerosolu jsou značně proměnlivé a závisí na ročním období, meteorologických podmínkách, umístění posuzované lokality, dálkovém transportu a emisních zdrojích^{13–16}. V létě a na podzim roste koncentrace kovů pocházejících z přírodních procesů (např. tvorba mořského aerosolu). V zimě a na jaře pochází maximální koncentrace kovů z antropogenní činnosti^{17,18}. Významná korelace byla nalezena mezi teplotou a koncentrací jemné frakce aerosolu¹⁹.

Aerosol se dělí na jemnou frakci (částice menší než $2,5 \mu\text{m}$), tvořenou převážně kovy a jejich sloučeninami, které jsou antropogenního původu, a hrubou frakci (částice větší než $2,5 \mu\text{m}$), která obsahuje z větší části kovy nebo jejich sloučeniny přírodního původu. Celkově se kovy spolu se svými sloučeninami na složení aerosolu podílí zhruba 5 % (cit.^{18,20}). Mezi majoritní složky částic patří oxidy Al, Si, Ca, Ti, Fe spolu s Na, Mg, Mn, které indikují přírodní zdroje¹³. Na druhou stranu např. Pb, Zn nebo Cd jsou antropogenního původu²¹. Výskyt kovů v hrubé a jemné frakci spolu s původem je uveden v tabulce I.

Tabulka I
Velikostní distribuce kovů^{22–26}

| Frakce | Původ | Kovy |
|--------|--------------|---|
| Jemná | Antropogenní | Cu, Zn, Ba, Cd, V, Pb, Sn, Se, Cr, Ni, As, Co |
| Hrubá | Přírodní | Ca, Mg, Sr, Mn, Fe, Na, Al, Ti, K |

Resuspenzí půdy se do ovzduší dostávají částice, které obsahují vyšší koncentrace Al, Fe, Mn a Co (cit.¹²). Zvýšené koncentrace Ba, K, Pb, Sb, Sr, Cu a Mg ve vzduchu indikují zplodiny z ohňostroje^{27,28}. Chemickou analýzou pouličního prachu byly identifikovány zvýšené koncentrace Pb, Zn, Cu, Ni, a Cr. Průmyslové zdroje produkují aerosol, který je tvořen Zn, Cu, Ni, Cr, Mn, Zn, Ga, As a Sr (cit.^{29,30}). Kotle na spalování uhlí a spalovny produkují emise obsahující Ca, Fe, Al, K, Ti, V, Ni, Zn, Sr, Ba, Pb, Cr, Mn, Ga, As, Se, Br, Rb, Zr, Na, Hg, Cu, Ag, Sn a Sb (cit.^{31,32}). Spalováním dřevěného odpadu se do vzduchu dostává převážně draslík³².

Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Ba a Pb byly nalezeny v emisích benzinových motorů^{12,32}. V jemné frakci částic pocházejících z diesellových motorů byly identifikovány hliník, sodík a mangan³³. Pro kvantifikaci dopravního zatížení se používají Zn, Sb, Ba nebo Cu, protože přidávání olova do benzínu bylo zakázáno^{10,34,35}. Přehled kovů pocházejících z různých zdrojů je uveden v tabulce II. Tabulka III uvádí výskyt kovů ve vzduchu na různých lokalitách s ohledem na zdroj.

3. Analýza kovů v aerosolu

Pro stanovení kovů ve vzduchu se modifikují analytické metody používané pro analýzu pevných nebo kapalných vzorků. Po odběru reprezentativního vzorku aerosolu následuje jeho převedení na stanovitelnou podobu a detekce, která je řešena buď v off-line nebo on-line uspořádání, rozvíjí se také analýza *in-situ*. V off-line uspořádání se provádí buď rozklad filtrů kyselinami za zvýšené teploty anebo se filtr/fólie analyzuje přímo, v on-line uspořádání se využívá průtokové analýzy, která snižuje riziko kontaminace v průběhu procesu analýzy. Výsledky chemické analýzy aerosolových částic podávají informaci o zdrojích znečištění.

Tabulka II
Zdroje kovů na aerosolu^{12,18,32,36}

| Zdroj | Kov(y) |
|---------------------------|---|
| Doprava a prach z vozovek | Ba, Zn, Pb, Ag, Cu, Al, Ti, V |
| Spalovny uhlí a odpadů | Zn, Sb, Cu, Cd, Hg, Se, As, Cr, Co, Al |
| Průmysl | Sb, Ag, V, Ni, As, In, Cu, Mn, Ce, Co, Cr, Pb |
| Spalování biomasy | K |
| Půdní a městský prach | Ti, Al, Fe, Mn, Cr, Cu, Th |

3.1. Odběr

V off-line provedení je vzduch prosáván přes filtr nebo impaktor, v dalším kroku je odběrové médium rozloženo pyrolyticky nebo silnými kyselinami a v poslední fázi jsou kovy v extraktu stanoveny. Nevýhodou off-line techniky je dlouhá doba analýzy a především možnost kontaminace vzorku během jeho zpracování. On-line metody umožňují kontinuální vzorkování a následnou on-line analýzu odebraného vzorku, což vede ke snížení doby analýzy a ke snížení rizika kontaminace. Používané detekční techniky jsou uvedeny v tabulce IV.

Pro vzorkování aerosolů ve velikostních frakcích PM₁₀, PM_{2.5} nebo PM₁ (částice s aerodynamickým průměrem menším než 1 μm) na filtr se používají odběrové hlavice, které odstraňují částice větší než je specifikovaná velikost pomocí vnitřního impaktoru nebo cyklónu^{57–60}. Prošlé částice jsou zachyceny na vhodné odběrové médium, součástí odběrového zařízení je řídicí jednotka s čerpadlem. Podle průtokové rychlosti odebíraného vzduchu se vzorkovací zařízení dělí na nízko-, středně- a vysokoobjemové. Použitím kaskádového, virtuálního nebo rotujícího impaktoru lze částice aerosolu rozdělit podle velikostí do několika frakcí^{61–64}. Materiál filtrů, např. teflon, celulóza, PVC, křemenná nebo skelná vlákna, se volí podle účelu stanovení^{57,59}.

Rozklad filtrů se provádí koncentrovanými anorganickými kyselinami např. HNO₃, HCl, HClO₄, v případě přítomnosti silikátů se použije kyselina fluorovodíková. Rozklad na mokré cestě je podporován zvýšením teploty, mikrovlnným zářením nebo ultrazvukem. Ve vodě rozpustná frakce kovů se extrahuje pomocí mikrovlnného záření, porovnáním s celkovým obsahem kovu na aerosolu se hodnotí biodostupnost⁶⁵.

Vedle off-line technik jsou používány techniky v uspořádání on-line. Při analýze ve vodě rozpustné frakce aerosolu se využívají aerosolové kolektory, pracující na

Tabulka III
Koncentrace kovů ve vzduchu

| Lokalita | Zdroj | Frakce | Koncentrace kovu [ng m ⁻³] | | | | | | | | Lit. | |
|-----------------------|---------|-------------------|--|--------|------|------|------|--------|------|-----|------|----|
| | | | Fe | Pb | Cd | Cr | Cu | Zn | Mn | Co | | Ni |
| Krakov (Polsko) | doprava | TSP | 1303 | 95 | | | | 137 | 29 | | | 37 |
| Birmingham (Anglie) | doprava | TSP | 204 | 27 | 0,5 | | | 30 | 6 | | 2 | 35 |
| Bombaj (Indie) | doprava | TSP | 165500 | 1060 | | | 370 | | 850 | | | 38 |
| Sha-Lu (Tchaj-wan) | doprava | TSP | 1710 | 180 | | | 240 | 1060 | 110 | | | 39 |
| Tito Scalo (Itálie) | průmysl | TSP | 521 | 60 | 2 | 13 | | 304 | 27 | | 5 | 40 |
| La Coruna (Španělsko) | průmysl | TSP | 850 | 32 | 0,92 | | | 8 | 13 | | | 41 |
| Kao-siung (Tchaj-wan) | průmysl | PM ₁₀ | 2140 | 190 | | | | 540 | 70 | | 40 | 42 |
| Taejon (Korea) | průmysl | TSP | 1839 | 260 | | 31,8 | 54,9 | 220 | 66,1 | | 33,6 | 43 |
| | | PM ₁₀ | 1577 | 195 | | 39,3 | 32,4 | 277 | 41,8 | | 42,6 | |
| Yamaguchi (Japonsko) | město | TSP | 9000 | 173 | | | | 309 | 210 | 5 | 16 | 44 |
| Peking (Čína) | město | TSP | 51000 | 46 | | | | 274 | 1210 | 26 | 51 | 44 |
| Dháka (Bangladéš) | město | TSP | 24800 | 279 | 2,51 | | | 801 | | | | 45 |
| Bombaj (Indie) | město | TSP | 2950 | 550 | 40 | 40 | | 350 | | | 40 | 46 |
| Dilli (Indie) | město | TSP | 5220 | 380 | 6,7 | 104 | | | | | 97 | 47 |
| Lahore (Pákistán) | město | TSP | 9930 | 3920 | 43,5 | | | 27700 | | | | 48 |
| Teherán (Írán) | město | TSP | 2230 | 1020 | | 48 | | 327 | 78 | 8 | 37 | 49 |
| La Plata (Argentina) | město | TSP | 1183 | 64,5 | 0,41 | 4,32 | | 273 | 26 | | 3,15 | 21 |
| Detroit (USA) | město | TSP | 3–1000 | 40–100 | 1–3 | 7–15 | | 30–180 | | | 5–16 | 50 |
| Londýn (Anglie) | město | TSP | 913 | 99 | <1 | 6 | | 65 | 15 | | 5 | 20 |
| Debrecín (Maďarsko) | město | TSP | 911 | 72 | | 18 | | 56 | 23 | | 5 | 51 |
| Islámábád (Pákistán) | město | TSP | 584 | 214 | 3 | 19 | | 603 | 59 | 11 | 9 | 19 |
| Sapporo (Japonsko) | město | TSP | 625 | 44 | | 2,6 | 21 | 149 | 17 | | 3,8 | 52 |
| Kao-siung (Tchaj-wan) | město | PM ₁₀ | 1740 | 340 | | | | 340 | 60 | | 30 | 42 |
| Soul (Korea) | město | PM _{2,5} | 743 | 96,4 | | 13,7 | 27,8 | 163 | 39 | | 19,6 | 53 |
| | | PM ₁₀ | 2321 | 124 | | 18,8 | 50,1 | 302 | 94,2 | | 47,8 | |
| Sevilla (Španělsko) | město | PM ₁₀ | 277 | 4,76 | | | | 28 | 6,5 | | 2,45 | 54 |
| | | PM _{2,5} | | 392 | 7,26 | 1152 | 126 | 924 | 25 | | 7,19 | |
| Brownfields (Anglie) | vesnice | TSP | 260 | 30 | 0,6 | | | 63 | 6 | 0,1 | 2 | 26 |
| Vídeň (Rakousko) | vesnice | TSP | 189 | 17 | | 20 | | 18 | 33 | | 9 | 55 |
| McMurdo (Antarktida) | pozadí | PM ₁₀ | | 1 | | | | 0,2 | 2 | | | 56 |

PM₁₀ – částice s aerodynamickým průměrem menším než 10 µm; PM_{2,5} – částice s aerodynamickým průměrem menším než 2,5 µm; TSP – celkový aerosol (total suspended particle)

principu kondenzace vodní páry na částicích aerosolu^{66,67}, Venturiho skrubru⁶⁸ nebo elektrostatického zachytu⁶⁹. Kolektory byly aplikovány jak pro analýzu kovů, tak také

síranů, dusičnanů, dusitanů a NH₄⁺. Kolektory pracují s vysokou účinností zachytu částic dosahující až 99 % a jsou vhodné pro automatickou kontinuální analýzu např.

Tabulka IV
Výhody a nevýhody různých typů detekce

| Detekce | Výhody | Nevýhody |
|-------------------|--|--|
| AAS | selektivita, ekonomicky nenáročný provoz, nízké LOD | nelze provádět simultánní víceprvkovou analýzu a analýzu iontových forem |
| AFS | selektivita, nízké LOD, široký lineární rozsah, jednoduchost, nízká cena instrumentace a ekonomicky nenáročný provoz | nelze provádět simultánní víceprvkovou analýzu a analýzu iontových forem |
| ICP-OES ICP-MS | rychlá, víceprvková analýza s extrémně nízkými LOD pro ICP-MS, malá spotřeba vzorku, široký lineární rozsah | vysoké pořizovací a provozní náklady, tvorba polyatomových iontů (pro ICP-MS), spektrální interference v argonové plazmě (pro ICP-OES) |
| UV/VIS | levná, jednoduchá a rychlá | vysoké LOD, nelze provádět simultánní víceprvkovou analýzu |
| CL | nízké LOD, široký lineární rozsah, automatizace, jednoduchost a nízká cena instrumentace | nízká selektivita, nelze provádět simultánní víceprvkovou analýzu |
| NAA | stanovení více prvků, nízké LOD | vysoké pořizovací náklady, nelze využít pro analýzu iontových forem |
| SV | nízké LOD, selektivita, stanovení iontových forem | použití speciálně modifikovaných elektrod |
| EDXRF | rychlá, víceprvková analýza, malá spotřeba vzorku | vysoké LOD |
| S-XRF | malý signál pozadí, nízké LOD | omezený počet urychlovačů |

LOD – limit detekce; AFS – atomová fluorescenční spektrometrie; ICP-OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem; ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem; UV/VIS – spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti; CL – chemiluminiscence; NAA – neutronová aktivační analýza; SV – stripovací voltametrie; EDXRF – energiově disperzní RTG-fluorescenční spektroskopie; S-XRF – synchrotronem indukovaná RTG-fluorescence

ve spojení s iontově-výměnnou chromatografií (IEC). Kolektor pracující na principu kondenzace vodní páry byl použit pro analýzu ceritých iontů na částicích submikrometrových velikostí⁷⁰. Ve vodě rozpustný chrom obsažený v aerosolu byl stanoven po záchytu kolektorem metodou spektroskopie ve VIS-oblasti, využívá se tvorby komplexu s difenylkarbazidem (DPC). Postup je určen pro mobilní analýzu v on-line provedení s časovým rozlišením 15 s (cit.⁷¹). Iontovou chromatografií ve spojení s kolektorem byly stanoveny v aerosolu sodík, vápník a draslík⁷². Kolektorem na principu Venturiho skrubru je zachyceno olovo na aerosolu s následným on-line stanovením *in-situ* metodou anodické rozpouštěcí voltametrie⁶⁸.

On-line techniky využívající buzení v plazmatu s optickou detekcí byly použity pro stanovení Be, Co, Cd a Pb (cit.⁷³). Optická emisní spektroskopie v kombinaci s kapacitně vázaným plazmatem umožňuje on-line stanovení Cr, Fe, Co, Mg, Ni, Cd a Pb ve vzduchu, které vznikají při spalovacích procesech⁷⁴.

Systém zvaný „plasma source monitor“ (PSM) byl vyvinut pro kontinuální *in-situ* monitorování částic v reálném čase. Výhody jsou následující: přímé vzorkování bez úpravy vzorku, kontinuální monitorování v reálném čase, vysoká citlivost, simultánní vícekanálová detekce, mobilita, nízké pořizovací a provozní náklady, kontinuální chod bez zásahu, všestranné použití v environmentálním monitorování⁷⁵. Tabulka V uvádí přehled on-line technik.

3.2. Stanovení

Analytická chemie nabízí pestrou paletu technik pro stanovení kovů. Z toxikologického hlediska je důležité znát nejenom celkový obsah prvku, ale také jeho jednotlivé formy⁷⁶. V analýze kovů na aerosolu při off-line uspořádání se používají techniky shrnuté v tab. VI. U AAS technik se používá atomizace v plameni (FAAS) nebo elektrotermicky (ETAAS). Pro rutinní monitorování se v současné době často používají AFS, RTG-fluorescenční spektroskopie úplného odrazu (TXRF), ICP-OES a ICP-MS (cit.⁷⁷).

AAS se používá jako doplněk k metodám RTG-fluorescence (XRF) a k metodě „protony indukované RTG-emise“ (PIXE). Zlepšení přinesla Zeemanova korekce pozadí, která podstatně omezila vliv spektrálních interferencí. Průtoková analýza pro on-line prekoncentraci přispěla také k vylepšení metody. Využívají se jak technika FAAS, tak ETAAS, při níž se nemusí filtr rozkládat na mokré nebo suché cestě⁶¹.

Výsledky dosažené metodami ICP-MS a voltametrie pro stanovení Zn, Cd, Pb, Cu, Ni a As ve frakci PM₁₀ jsou porovnatelné⁷⁸. Výhodou voltametrie oproti ICP-MS jsou menší pořizovací a provozní náklady a snadná automatizace.

Příkladem přímého stanovení kovů na exponovaných filtrech je analýza laserovou ablací s ICP ionizací a MS detekcí. K odběru byl použit křemenný filtr. Tato metoda

Tabulka V
On-line techniky používané v analýze kovů na aerosolu

| Kov(y) | Vzorkovací zařízení | Detekce | Lit. |
|--|--|---------|------|
| Be, Cd, Co, Pb | nasávání vzduchu přes křemennou trubičku | ICP-AES | 73 |
| Cd, Co, Cr, Fe, Mg, Ni, Pb | nasávání vzduchu do zmlžovače | CMP-OES | 74 |
| Cr | SJAC | UV/VIS | 71 |
| Ce | VCACS | FL | 70 |
| Pb | Venturiho aparatura | SV | 68 |
| Cu, Mn, Mg, Ag, Hg, Zn, Cd, Ba, Be, Cr | nasávání vzduchu do zmlžovače | PSM | 75 |
| Na, Ca, K | PILS | CD | 72 |

ICP-AES – atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem; CMP-OES – kapacitně vázaná mikrovlnná plazma s optickou emisní spektrometrií; SJAC – „steam-jet aerosol collector“; VCACS – „vapor condensation-based aerosol collection system“ – sběr aerosolu založený na kondenzaci par; FL – fluorescence; PILS – „particle-into-liquid sampler“ – vzorkovač zachycující částice do kapaliny; CD – vodivostní detekce

má výhodu v tom, že odpadá úprava vzorku před analýzou. Současně byla provedena atomová spektrometrie s netermickou excitací v grafitovém atomizátoru (FANES), kdy je vzorek prosáván přes grafitovou trubičku a rovnou atomizován⁷⁹.

Detekce UV/VIS se používá ve spojení s HPLC s post-kolonovou reakcí s činidly jako např. 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) nebo DPC (cit.^{80–83}).

Mezi nedestruktivní techniky patří EDXRF, TXRF, S-XRF, PIXE (cit.⁸⁴). Za účelem zlepšení detekčního limitu a odstranění efektů matrice u metody EDXRF byla provedena její modifikace. Modifikovaná metoda využívá celkového odrazu na plochu vzorku tzv. TXRF. I přes výhody oproti EDXRF se nepoužívá moc často, ale očekává se, že se význam TXRF z důvodů nízkých nákladů bude zvyšovat. PIXE se liší od předešlých technik v excitačním zdroji pro produkci fluorescence. Filtr je bombardován vysoce energetickými protony za vzniku charakteristického RTG-záření, které je detegováno. Metoda se používá pro analýzu velmi malých množství vzorků ve spojení s impaktory nebo filtry^{37,58,85}.

Metody popsané v předešlém textu poskytují informaci o průměrném obsahu kovů na částicích jako celku. Naproti tomu existují i techniky, které přináší informaci o složení jednotlivých částic. Mezi takové patří techniky aerosolová hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu (ATOFMS) nebo elektronová mikroskopie. Technika ATOFMS je využívána pro kvalitativní analýzu složení aerosolových částic, stanovení velikostní distribuce a distribuce iontových forem kovů na částicích^{97–99}. Nevýhodou však je, že neposkytuje kvantitativní informaci o chemickém složení. ATOFMS se používá v biologických, průmyslových a environmentálních aplikacích¹⁰⁰. ATOFMS v reálném čase byla použita pro *in-situ* analýzu chemického složení částic dostávajících se do ovzduší z ohňostrojí, kde byly identifikovány draslík, hliník, hořčík, baryum

a olovo¹⁰¹. Při on-line charakterizaci automobilových emisí byly identifikovány Pb, Pt, Ca, Na, Ce a K (cit.^{102,103}).

Elektronová mikroskopie⁵⁷ poskytuje informaci o morfologii, elementárním složení a zdroji částice. Nachází uplatnění v atmosférické aerosolové chemii a v kategorizaci zdrojů, nevýhodou je časová náročnost. Stejně jako předešlá metoda neposkytuje elektronová mikroskopie kvantitativní informaci⁶⁰.

3.3. Biomonitorování

Techniku biomonitorování lze označit za metodu pasivního vzorkování a používá se jako levnější alternativa běžného aktivního monitorování. Na rozdíl od aktivních metod zde vystupují v roli odběrového média rostliny např. tilandsie šedá (*Tillandsia usneoides*), oleandr (*Nerium oleander*), „hongkongská orchidej“ (*Bauhinia blakeana*), dub (*Quercus ilex*) nebo borovice^{54,104–108}. Používají se také lišejníky^{109,110} a mechy¹¹¹, protože mají dobrou absorpční kapacitu pro Cd, Co, Cu, Cr, Pb, V a Zn (cit.¹¹²). Biologická matrice je po expozici rozložena HNO₃, H₂O₂, HF nebo HClO₄ v mikrovlnné peci a obsahy kovů jsou stanoveny pomocí ICP-MS, ICP-AES, NAA, FAAS nebo ETAAS (cit.^{111–114}).

Byla nalezena korelace mezi obsahem Cu a Fe v PM₁₀ a v listech oleandru⁵⁴. Výsledky analýzy PM₁₀ a biomonitorování s dubem podél rušné silnice a parku ukázaly, že Ba, Cr, Fe, Mn, Pb a Zn jsou hlavními polutanty emitovanými motorovými vozidly¹⁰⁸. Lišejníky byly použity při stanovení kovů na lokalitách s přirozeným výskytem kovů v ovzduší, např. Alpy, Himaláje¹¹⁵.

Tabulka VI
Přehled off-line technik používaných v analýze kovů na aerosolu

| Kov(y) | Vzorkovací zařízení nebo frakce | Odběrové médium | Rozklad filtru | Detekce | Lit. |
|---|---|-----------------|--|-----------------|------|
| Pb | 9-st. KI | NCF | Přímé stanovení | ETAAS | 61 |
| Na, K, Zn, Fe, Pb | HV | GFF | HNO ₃ , HClO ₄ | FAAS | 19 |
| Cd, Ni, Mn, Pb, Fe, Zn, Cr, Cu | VI, PM _{2.5} , PM ₁₀ | QFF | HNO ₃ při 200 °C | FAAS | 62 |
| Fe, Pb, Zn, Cu, Mg, Mn | TSP | QFF | HNO ₃ při 250 °C | FAAS | 86 |
| Hg, Cd, Pb, Ni, As | LV, PM ₁₀ | GFF | – | AAS | 15 |
| Cd, Cu, Ni, Zn, Mn, Pb | HV, KI | GFF | HNO ₃ a HCl v ultrazvuku | FAAS, ETAAS | 63 |
| Mn, Co, Cd, Zn, Ti, V, Ni, Ba, Cu, Cr, Mo, Sr, Fe, Mg, Pb, Ca, Na, Al, K | PM _{2.5} , PM ₁₀ | PTFE | HNO ₃ a HCl mikrovlny při 175°C | ICP-AES | 53 |
| Cd, Cr, Sr, Cu, Mn, Pb, Mg, Ca | LV | QFF | Přímé stanovení | LA-ICP-MS | 79 |
| Cr | impinger | KOH | Separace na silikagelu, prekoncentrace APDC | ICP-MS | 87 |
| Cr, Zn, Pb, Cd, Ni, Mn, Fe | cyklón, PM ₁₀ | QFF | HNO ₃ | ICP-AES | 88 |
| Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Te, Ti, Tl, V, Zn, Zr | KI | GFF | – | ICP-AES | 89 |
| As, Ba, Be, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb, Se, Ti, V, Co, Mn, Zn, Fe | TSP, PM ₁₀ | GFF | HNO ₃ , HClO ₄ mikrovlny při 270°C | ICP-AES, ICP-MS | 43 |
| As, Co, Cu, Cd, Cr, Mn, Ni, V, Zn, Fe, Pb | LV, TSP, PM ₁₀ a PM _{2.5} | PTFE, ZFF, QFF | HNO ₃ , H ₂ O ₂ a HF (celkový obsah) | ICP-MS | 65 |
| As, Co, Cu, Cd, Cr, Mn, Ni, V, Zn, Fe, Pb | LV, TSP, PM ₁₀ a PM _{2.5} | PTFE, ZFF, QFF | voda (ve vodě rozpustné kovy) | ICP-MS | 65 |
| Cu, Cr, Pb, Ni, Zn | RI, TSP | PTFE | HNO ₃ | ICP-MS | 64 |
| Na, Mg, Al, K, Ti, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sb, Cd, Cs, Ba, Pb | PM _{2.5} | PTFE | HNO ₃ , HF a H ₃ BO ₃ , mikrovlny při 200°C | ICP-MS | 90 |
| Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ | HV, PM ₁₀ | PTFE | voda, IEC | ELC | 42 |
| Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ | MOUDI | PTFE | voda, IEC | ELC | 91 |
| Zn, Cd, Pb, Cu, Ni, As | LV, PM ₁₀ | QFF | HNO ₃ , H ₂ O ₂ mikrovlny při 220°C | SV | 78 |
| Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Pb ²⁺ , Fe ²⁺ | HV | GFF | HNO ₃ v ultrazvuku nebo mikrovlny, IEC | UV/VIS | 80 |
| Cr | LV | GFF | NaOH, prekoncentrace na anexu | UV/VIS | 81 |
| Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Fe ³⁺ | HV, PM ₁₀ | QFF | HNO ₃ , mikrovlny a HPIC | UV/VIS | 82 |

ELC – elektrochemická detekce; APDC – pyrolidin dithiokarbamat amonný; MOUDI – „micro-orifice uniform deposit impactor“; HV – vysoko-obъемové čerpadlo; KI – kaskádový impaktor; NCF – nitrocelulosový filtr; GFF – filtr ze skelných vláken; VI – virtuální impaktor; QFF – filtr z křemenných vláken; LV – nízkoobjemové čerpadlo; PTFE – teflonový filtr; ZFF – teflonový (ze fluoru) filtr; RI – rotující impaktor; HPIC – vysoko-účinná iontová chromatografie; PSF – polystyrenový filtr

Tabulka VI
Pokračování

| Kov(y) | Vzorkovací zařízení nebo frakce | Odběrové médium | Rozklad filtru | Detekce | Lit. |
|---|--|-----------------|---|-----------|------|
| K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Zr, Pb | KI, PM ₁₀ , PM _{2.5} | QFF | HNO ₃ , HF a H ₂ O ₂ , tlakový rozklad | TXRF | 92 |
| K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Pb | PM _{10-2.5} a PM _{2.5} | PTFE | – | PIXE | 93 |
| K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Ga, Rb, Sr, Pb | KI | PTFE | – | EDXRF | 24 |
| Na, Al, K, Ca, Ti, V, Cr, Ni, Mn, Fe, Cu, Yn, Ga, Hg, As, Pb, Se, Rb, Sr, Yr, Y | PM ₁₀ | PTFE | – | PIXE, XRF | 30 |
| Na, Mg, Al, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Sr, Zr, Mo, Ba, Pb | 2-st. „streaker“ | – | – | PIXE | 94 |
| Ca, Ti, V, Cu, Al, Na, Mg, Mn, In, K, Cu, Zn, W, Au, Ga, As, Sb, Se, Cr, Fe, Co, Ni, Ag, Zn, Hg, Sb | HV | PSF | – | NAA | 95 |
| As, Mo, Cd, Sb, Sn, Ca, Fe, Se, Cr, Ba, Ni, Zn | HV | GFF | – | NAA | 96 |

ELC – elektrochemická detekce; APDC – pyrolidin dithiokarbamat amonný; MOUDI – „micro-orifice uniform deposit impactor“; HV – vysoko-obъемové čerpadlo; KI – kaskádový impaktor; NCF – nitrocelulosový filtr; GFF – filtr ze skelných vláken; VI – virtuální impaktor; QFF – filtr z křemenných vláken; LV – nízkoobjemové čerpadlo; PTFE – teflonový filtr; ZFF – teflonový (ze fluor) filtr; RI – rotující impaktor; HPIC – vysoko-účinná iontová chromatografie; PSF – polystyrenový filtr

4. Závěr

Chemické složení aerosolu je značně variabilní a je odvislé od zdrojů, meteorologických charakteristik a posuzované lokality. Stanovení iontových forem kovů a velikostní distribuce aerosolu přispívají k identifikaci zdrojů znečištění ovzduší a z toxikologického hlediska k hodnocení zdravotních účinků aerosolů, protože potenciálně toxické kovy se nachází zejména v jemné frakci částic.

Analýza iontových forem kovů v ovzduší se dnes rozvíjí spolu s on-line analýzou v reálném čase, zatím však stále převažují off-line techniky na stanovení celkového obsahu kovu.

Autoři tímto děkují za podporu v rámci Výzkumného záměru Ústavu analytické chemie AVČR č. AV0 Z40310501 a v rámci grantu Grantové agentury AVČR č. A400310505.

LITERATURA

- Dulka J. J., Risby T. H.: *Anal. Chem.* 48, 640A (1976).
- <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7.pdf>, staženo 13. září 2007.
- <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>, staženo 6. prosince 2007.
- Council Directive 1999/30/EC of 22 April 1999 rela-

ting to limit values for sulphur dioxide, nitrogen dioxide and oxides of nitrogen, particulate matter and lead in ambient air.

- <http://epa.gov/air/criteria.html>, staženo 6. prosince 2007.
- Nářízení vlády č. 350/2002 Sb., kterým se stanoví imisní limity a podmínky a způsob sledování, posuzování, hodnocení a řízení kvality ovzduší.
- <http://www.mnp.nl/bibliotheek/rapporten/650010015.pdf>, staženo 6. prosince 2007.
- Brunekreef B., Holgate S. T.: *Lancet* 360, 1233 (2002).
- Alvarez F. F., Rodriguez M. T., Espinosa A. J. F., Daban A. G.: *Anal. Chim. Acta* 524, 33 (2004).
- Espinosa A. J. F., Rodriguez M. T.: *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 684 (2004).
- Gawel J. E., Ahner B. A., Friedland A. J., Morel F. M. M.: *Nature* 381, 64 (1996).
- Fernandez A. J., Ternero M., Barragan F. J., Jimenez J. C.: *Chemosphere - Global Change Science* 2, 123 (2000).
- Ledoux F., Courcot L., Courcot D., Aboukais A., Puskaric E.: *Atmos. Res.* 82, 633 (2006).
- Lin C. C., Chen S. J., Huang K. L., Lee W. J., Lin W. Y., Liao C. J., Chung H. C., Chiu C. H.: *Environ. Pollut.* 145, 562 (2007).
- Vassilakos C., Veros D., Michopoulos J., Maggos T., O' Connor C. M.: *J. Hazard. Mater.* 140, 389 (2007).

16. Janssen N. A. H., Van Mansom D. F. M., Van Der Jagt K., Harssema H., Hoek G.: *Atmos. Environ.* **31**, 1185 (1997).
17. Shevchenko V., Lisitzin A., Vinogradova A., Stein R.: *Sci. Total. Environ.* **306**, 11 (2003).
18. Al-Momani I. F., Daradkeh A. S., Haj-Hussein A. T., Yousef Y. A., Jaradat Q. M., Momani K. A.: *Atmos. Res.* **73**, 87 (2005).
19. Shaheen N., Shah M. H., Jaffar M.: *Water, Air, Soil Pollution* **164**, 275 (2005).
20. Harrison R. M., Jones M.: *Sci. Total. Environ.* **168**, 195 (1995).
21. Bilos C., Colombo J. C., Skorupka C. N., Presa M. J. R.: *Environ. Pollut.* **111**, 149 (2001).
22. Fang G. C., Wu Y. S., Lin J. B., Lin C. K., Rau J. Y., Huang S. H.: *Chemosphere* **63**, 1912 (2006).
23. Wang X., Sato T., Xing B.: *Chemosphere* **65**, 2440 (2006).
24. Gatari M., Bomanl J., Maina D.: *X-Ray Spectrom.* **34**, 118 (2005).
25. Deng W. J., Louie P. K. K., Liu W. K., Bi X. H., Fu J. M., Wong M. H.: *Atmos. Environ.* **40**, 6945 (2006).
26. Allen A. G., Nemitz E., Shi J. P., Harrison R. M., Greenwood J. C.: *Atmos. Environ.* **35**, 4581 (2001).
27. Moreno T., Querol X., Alastuey A., Minguillon M. C., Pey J., Rodriguez S., Miro J. V., Felis C., Gibbons W.: *Atmos. Environ.* **41**, 913 (2007).
28. Wang Y., Zhuang G., Xu C., An Z.: *Atmos. Environ.* **41**, 417 (2007).
29. Ahmed F., Ishiga H.: *Atmos. Environ.* **40**, 3835 (2006).
30. Carvacho O. F., Trzepla-Nabaglo K., Ashbaugh L. L., Flocchini R. G., Melin P., Celis J.: *Atmos. Environ.* **38**, 5349 (2004).
31. Dutkiewicz V. A., Qureshi S., Husain L., Schwab J. J., Demerjian K. L.: *Atmos. Environ.* **40**, S347 (2006).
32. Morawska L., Zhang J. J.: *Chemosphere* **49**, 1045 (2002).
33. Kleeman M. J., Schauer J. J., Cass G. R.: *Environ. Sci. Technol.* **34**, 1132 (2000).
34. Huang X., Olmez I., Aras N. K., Gordon G. E.: *Atmos. Environ.* **28**, 1385 (1994).
35. Harrison R. M., Tilling R., Romero M. S. C., Harrad S., Jarvis K.: *Atmos. Environ.* **37**, 2391 (2003).
36. Hien P. D., Binh N. T., Truong Y., Ngo N. T., Sieu L. N.: *Atmos. Environ.* **35**, 2669 (2001).
37. Wroble A., Rokita E., Maenhaut W.: *Sci. Total. Environ.* **257**, 199 (2000).
38. Kumar A. V., Patil R. S., Nambi K. S. V.: *Atmos. Environ.* **35**, 4245 (2001).
39. Fang G. C., Chang C. N., Wu Y. S., Fu P. P. C., Yang C. J., Chen C. D., Chang S. C.: *Atmos. Environ.* **36**, 1921 (2002).
40. Ragosta M., Caggiano R., D'Emilio M., Macchiato M.: *Atmos. Environ.* **36**, 3071 (2002).
41. Gonzalez B. E., Andrade-Garda J. M., Serrano-Velasco E., Lopez-Mahia P.: *Sci. Total. Environ.* **196**, 131 (1997).
42. Chen J. S., Hsieh L. T., Tsai C. C., Fang G. C.: *Chemosphere* **53**, 29 (2003).
43. Kim K. H., Lee J. H., Jang M. S.: *Environ. Pollut.* **118**, 41 (2002).
44. Mori I., Nishikawa M., Tanimura T., Quan H.: *Atmos. Environ.* **37**, 4253 (2003).
45. Salam A., Bauer H., Kassim K., Ullah S. M., Puxbaum H.: *Atmos. Environ.* **37**, 2517 (2003).
46. Sharma V. K., Patil R. S.: *Environ. Technol.* **13**, 1043 (1992).
47. Khillare P. S., Balachandran S., Meena B. R.: *Environ. Monit. Assess.* **90**, 1 (2004).
48. Smith D. J. T., Harrison R. M., Luhana L., Casimiro A. P., Castro L. M., Tariq M. N., Hayat S., Quraishi T.: *Atmos. Environ.* **30**, 4031 (1996).
49. Sohrabpour M., Mirzaee H., Rostami S., Athari M.: *Environ. Int.* **25**, 75 (1999).
50. Pirrone N., Keeler G. J., Warner P. O.: *Sci. Total. Environ.* **162**, 43 (1995).
51. Borbely K. I., Koltay E., Szabo G. Y., Bozo L., Tar K.: *J. Aerosol. Sci.* **30**, 369 (1999).
52. Var F., Narita Y., Tanaka S.: *Atmos. Environ.* **34**, 2755 (2000).
53. Kim K. H., Choi G. H., Kang C. H., Lee J. H., Kim J. Y., Youn Y. H., Lee S. R.: *Atmos. Environ.* **37**, 753 (2003).
54. Espinosa A. J. F., Oliva S. R.: *Chemosphere* **62**, 1665 (2006).
55. Horvath H., Kasahara M., Pesava P.: *J. Aerosol. Sci.* **27**, 417 (1996).
56. Mazzera D. M., Lowenthal D. H., Chow J. C., Watson J. G., Grubisic V.: *Atmos. Environ.* **35**, 1891 (2001).
57. Willeke K., Baron P. A. (ed.): *Aerosol Measurement: Principles, Techniques and Applications*. Van Nostrand Reinhold, New York 1992.
58. Spurny K. R.: *Analytical Chemistry of Aerosols*. Lewis Publishers, USA 1999.
59. Chow J. C.: *J. Air Waste Manage. Assoc.* **45**, 320 (1995).
60. McMurry P. H.: *Atmos. Environ.* **34**, 1959 (2000).
61. Low P. S., Hsu G. J.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **337**, 299 (1990).
62. Fang G. C., Chang C. N., Chu C. C., Wu Y. S., Fu P. P. C., Chang S. C., Yang I. L.: *Chemosphere* **51**, 983 (2003).
63. Voutsas D., Samara C.: *Atmos. Environ.* **36**, 3583 (2002).
64. Sabin L. D., Lim J. H., Venezia M. T., Winer A. M., Schiff K. C., Stolzenbach K. D.: *Atmos. Environ.* **40**, 7528 (2006).
65. Karthikeyan S., Joshi U. M., Balasubramanian R.: *Anal. Chim. Acta* **576**, 23 (2006).
66. Khlystov A., Wyers G. P., Slanina J.: *Atmos. Environ.* **29**, 2229 (1995).
67. Liu S., Dasgupta P. K.: *Microchem. J.* **62**, 50 (1999).
68. Belostotsky I., Gridin V. V., Schechter I., Yarnitzky C. N.: *Anal. Chim. Acta* **429**, 215 (2001).
69. Liu S., Dasgupta P. K.: *Anal. Chem.* **68**, 3638 (1996).

70. Poruthoor S. K., Dasgupta P. K.: *Anal. Chim. Acta* 361, 151 (1998).
71. Khlystov A., Ma Y.: *Atmos. Environ.* 40, 8088 (2006).
72. Weber R. J., Orsini D., Daun Y., Lee Y. N., Kotz P. J., Brechtel F.: *Aerosol. Sci. Tech.* 35, 718 (2001).
73. Nore D., Gomes A. M., Bacri J., Cabe J.: *Spectrochim. Acta, Part B* 48, 1411 (1993).
74. Seelig M., Broekaert J. A. C.: *Spectrochim. Acta, Part B* 56, 1747 (2001).
75. Belostotsky I., Gridin V. V., Schechter I., Yarnitzky C. N.: *Anal. Chem.* 72, 1672 (2000).
76. Gomez V., Callao M. P.: *Trends Anal. Chem.* 25, 1006 (2006).
77. Smichowski P., Gomez D., Polla G.: *Curr. Anal. Chem.* 1, 373 (2005).
78. Buzica D., Gerboles M., Borowiak A., Trincherini P., Passarella R., Pedroni V.: *Atmos. Environ.* 40, 4703 (2006).
79. Ludke C., Hoffmann E., Skole J.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 350, 272 (1994).
80. Rahmalan A., Abdullah M. Z., Sanagi M. M., Rashid M.: *J. Chromatogr., A* 739, 233 (1996).
81. Samanta G., Boring C. B., Dasgupta P. K.: *Anal. Chem.* 73, 2034 (2001).
82. Bruno P., Caselli M., de Gennaro G., Ielpo P., Ladisa T., Placentino C. M.: *Chromatographia* 64, 537 (2006).
83. Wang J., Ashley K., Marlow D.: *Anal. Chem.* 71, 1027 (1999).
84. Wilson W. E., Chow J. C., Claiborn C., Fusheng W., Engelbrecht J., Watson J. G.: *Chemosphere* 49, 1009 (2002).
85. Kasahara M., Choi K. C., Takahashi K.: *Atmos. Environ.* 24A, 457 (1990).
86. Fang G. C., Wu Y. S., Huang S. H., Rau J. Y.: *Chemosphere* 56, 509 (2004).
87. Li Y., Pradhan N. K., Foley R., Low G. K. C.: *Talanta* 57, 1143 (2002).
88. Karar K., Gupta A. K.: *Atmos. Res.* 81, 36 (2006).
89. Brewer R., Belzer W.: *Atmos. Environ.* 35, 5223 (2001).
90. Kulkarni P., Chellam S., Flanagan J. B., Jayanty R. K. M.: *Anal. Chim. Acta* 599, 170 (2007).
91. Chen S. J., Hsieh L. T., Kao M. J., Lin W. Y., Huang K. L., Lin C. C.: *Atmos. Environ.* 38, 5925 (2004).
92. John A. C., Kuhlbusch T. A. J., Fissan H., Schmidt K. G.: *Spectrochim. Acta, Part B* 56, 2137 (2001).
93. Saliba N. A., Kouyoumdjian H., Roumie M.: *Atmos. Environ.* 41, 6497 (2007).
94. Mazzei F., Lucarelli F., Nava S., Prati P., Valli G., Vecchi R.: *Atmos. Environ.* 41, 5525 (2007).
95. Dams R.: *Anal. Chem.* 42, 861 (1970).
96. Lambert J. P. F., Wilshire F. W.: *Anal. Chem.* 51, 1346 (1979).
97. Ziemann P. J.: *Trends Anal. Chem.* 17, 322 (1998).
98. Wood S. H., Prather K. A.: *Trends Anal. Chem.* 17, 346 (1998).
99. Noble C. A., Prather K. A.: *Environ. Sci. Technol.* 30, 2667 (1996).
100. Prather K. A., Nordmeyer T., Salt K.: *Anal. Chem.* 66, 1403 (1994).
101. Liu D. Y., Rutherford D., Kinsey M., Prather K. A.: *Anal. Chem.* 69, 1808 (1997).
102. Silva P. J., Prather K. A.: *Environ. Sci. Technol.* 31, 3074 (1997).
103. Spencer M. T., Shields L. G., Sodeman D. A., Toner S. M., Prather K. A.: *Atmos. Environ.* 40, 5224 (2006).
104. Carreras H. A., Pignata M. L., Saldiva P. H. N.: *Atmos. Environ.* 40, 7824 (2006).
105. Bosco M. L., Varrica D., Dongarra G.: *Environ. Res.* 99, 18 (2005).
106. Figueiredo A. M. G., Nogueira C. A., Saiki M., Milian F. M., Domingos M.: *Environ. Pollut.* 145, 279 (2007).
107. Lau O. W., Luk S. F.: *Atmos. Environ.* 35, 3113 (2001).
108. Monaci F., Moni F., Lanciotti E., Grechi D., Bargagli R.: *Environ. Pollut.* 107, 321 (2000).
109. Cloquet C., Carignan J., Libourel G.: *Atmos. Environ.* 40, 574 (2006).
110. Garty J., Tomer S., Levin T., Lehr H.: *Environ. Res.* 91, 186 (2003).
111. Fernandez J. A., Aboal J. R., Real C., Carballeira A.: *Atmos. Environ.* 41, 2098 (2007).
112. Lee C. S. L., Li X., Zhang G., Peng X., Zhang L.: *Atmos. Environ.* 39, 397 (2005).
113. Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrini P., Benedetti S., Bovolenta A., Coppi S.: *Atmos. Environ.* 36, 4069 (2002).
114. Anicic M., Frontasyeva M. V., Tomasevic M., Popovic A.: *Environ. Monit. Assess.* 129, 207 (2007).
115. Bergamaschi L., Rizzio E., Giaveri G., Profumo A., Loppi S., Gallorini M.: *Chemosphere* 55, 933 (2004).

M. Vojtěšek^{a,b}, P. Mikuška^a, and Z. Večeřa^a
^a*Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno* ^b*Faculty of Science, Masaryk University, Brno*: **Occurrence, Sources and Determination of Metals in Air**

Metals in air are predominantly bound to particulate matter. Their occurrence and composition depend on sources which are of natural or anthropogenic origin. Many hazardous metals show harmful effects on human health. The intensity of negative health effects of metals depends on the size distribution of aerosol particles. Examples of methods for the determination of metals in air, especially on-line and off-line techniques, are presented. Determination of metal ions is also discussed.

PALLADIOVÉ NANOČÁSTICE V KATALÝZE SPOJOVACÍCH REAKCÍ

JAN DEMEL^{a,b}, JIŘÍ ČEJKA^b
a PETR ŠTĚPNIČKA^a

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2, ^b Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České Republiky, v.v.i, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
demell@natur.cuni.cz; jiri.cejka@jh-inst.cas.cz;
stepnic@natur.cuni.cz

Došlo 11.1.08, přijato 25.6.08.

Klíčová slova: palladium, palladiové nanočástice, Heckova reakce, Suzukiho reakce, Sonogashirova reakce, Stilleho reakce, Negishiho reakce, Buchwaldova-Hartwigova reakce

Obsah

1. Úvod
2. C-C spojovací reakce
3. Historická poznámka
4. Spojovací reakce vedoucí ke vzniku vazby C-heteroatom
5. Palladiové katalyzátory
6. Použití palladiových nanočástic v katalýze
7. Závěr

1. Úvod

Při spojovacích reakcích („cross-coupling“) dochází ke spojení dvou organických molekul novou vazbou, která vzniká z jejich funkčních skupin¹. Nejstarší a stále nejčastěji používané jsou reakce, při kterých vzniká nová C-C vazba²; praktický význam však mají i reakce vedoucí ke vzniku C-N a C-O (obecně C-heteroatom) vazeb³. Spojovací reakce obvykle vyžadují přítomnost katalytického množství sloučeniny přechodného kovu, typicky palladia.

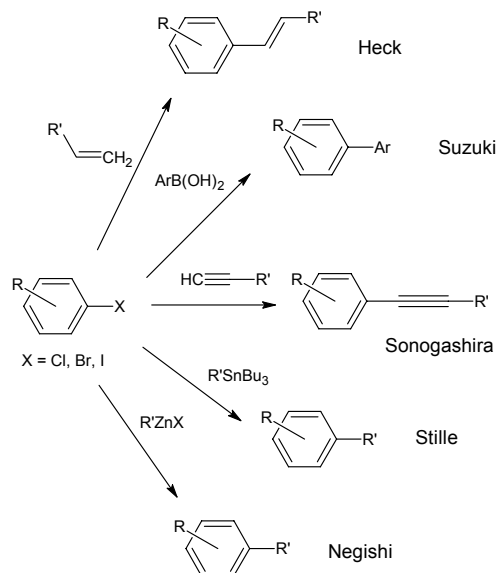
Díky své široké použitelnosti nacházejí spojovací reakce časté uplatnění při syntéze organických látek v běžné laboratorní praxi i v průmyslu, zvláště pak při výrobě speciálních chemikálií a léčiv. S výhodou poslouží při výstavbě molekulárního skeletu, neboť dokáží selektivně spojit dvě někdy velmi odlišné organické molekuly za relativně mírných podmínek. Přitom většinou tolerují přítomnost reaktivních funkčních skupin, které zaručují možnost dalších syntetických transformací nově vzniklé molekuly. Cílem tohoto článku je uvést základní typy těchto reakcí a především diskutovat pokroky, jichž bylo dosaže-

no v přípravě nových typů palladiových katalyzátorů s důrazem na význam a využití palladiových nanočástic. Vývoj spojovacích reakcí není zdaleka ukončen. Objevují se nové aplikace, katalyzátory a dokonce i nové typy reakcí s alternativními substráty (kupř. sirmými). I proto je úplný přehled těchto reakcí rozsahem mimo rámec tohoto příspěvku.

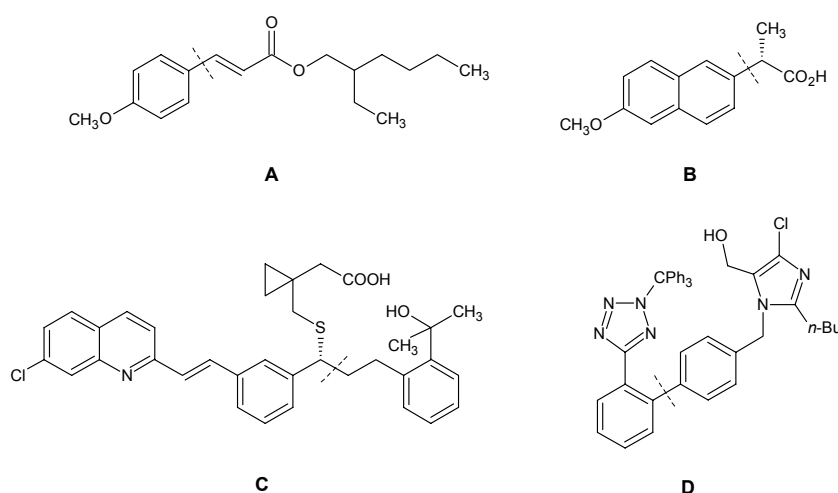
2. C-C spojovací reakce a jejich využití

Známa i prakticky používaná je celá řada spojovacích reakcí katalyzovaných palladiem, při kterých vzniká nová C-C vazba. Výběr nejnámějších z nich je uveden v obr. 1. Obecně přijímaný katalytický cyklus spojovacích reakcí zahajuje oxidační adice halogenderivátu R-X na palladiovou částici (L_nPd^0) za vzniku meziprojektu $L_nPd^{II}X(R)$. Rychlost oxidační adice pro stejný uhlovodíkový zbytek R klesá v řadě $RI > RBr > RCl$, což se přirozeně odráží v relativní reaktivitě těchto substrátů¹ (tj. levné a dostupné chloroderiváty jsou nejméně reaktivními substráty). V následujícím kroku reakční sekvence dochází k připojení druhého uhlovodíkového zbytku (formální náhradou halogenu nebo inzerce násobné vazby). Cyklus uzavírá redukční eliminace produktu, jež regeneruje výchozí katalyticky aktivní částici.

I přes poměrně vysokou cenu palladiových katalyzá-



Obr. 1. Spojovací reakce vedoucí ke vzniku vazeb C-C katalyzované palladiem; reakce probíhají s různými typy substrátů; pro názornost jsou však v obrázku uvedeny pouze arylhalogenidy



Obr. 2. Použití spojovacích reakcí při výrobě speciálních chemikálií: A – látka chránící před UV zářením (2-ethylhexyl-(4-methoxycinnamát) dostupný pod různými komerčními názvy; Heckova reakce), B – protizánětlivý lék naproxen (Heckova reakce), C – lék proti astmatu Singulair™ (Heckova reakce), D – antihypertenzivum losartan (Suzukiho reakce). Vznikající vazba je vyznačena

torů jsou spojovací reakce běžně využívány v průmyslových procesech při výrobě speciálních chemikálií. Na obr. 2 jsou uvedeny příklady látek („fine chemicals“), v jejichž výrobách se využívá některé z uvedených spojovacích reakcí⁴.

3. Historická poznámka

Mezi prvně studované spojovací reakce patří reakce alkylitných sloučenin nebo Grignardových činidel s alkyl- či arylhalogenidy. Tyto reakce, které můžeme považovat za předchůdce spojovacích reakcí katalyzovaných kovy, byly velmi omezeny použitelnými substráty. V první polovině 70. let Kumada, Tamao a spol. popsali spojovací reakce Grignardových činidel s organickými halogenidy katalyzované sloučeninami niklu⁵. Výhodou těchto reakcí byla vyšší selektivita a především menší podíl nežádoucího produktu vzniklého zdvojením činidla (tzv. „homocoupling“). Jako stálý pre-katalyzátor uvedení autoři použili fosfinové komplexy niklu. Právě různé fosfiny byly v pozdější době úspěšně využity jako pomocné ligandy v celé řadě spojovacích reakcí.

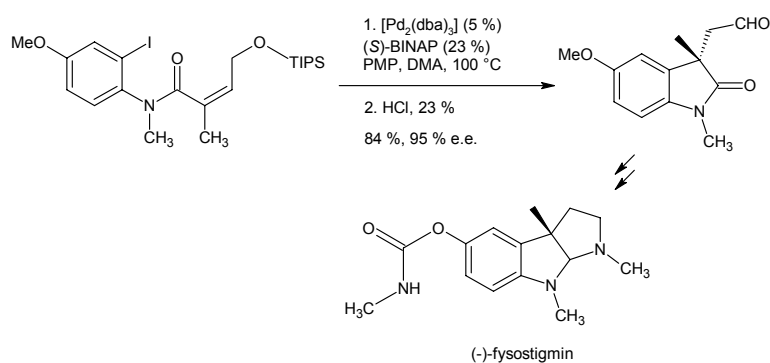
V letech 1975-1976 bylo v katalýze spojovacích reakcí poprvé použito palladium, a to nezávisle několika skupinami chemiků⁶. Oproti niklovým katalyzátorům vykazovaly palladiové katalyzátory vyšší selektivitu a navíc tolerovaly různé funkční skupiny přítomné v substrátech. Místo Grignardových sloučenin byly testovány organokovové sloučeniny elektronegatивnějších prvků, z nichž se jako velice slibné ukázaly sloučeniny organozinečnaté, borité a cíníčné⁷. V následujících letech se tyto reakce rychle vyvinuly z reakcí testovacích v běžně používané syntetické postupy.

Fosfinové komplexy palladia nebo jeho jednoduché anorganické soli patřily mezi první používané palladiové

katalyzátory⁶. Až později byly do praxe zavedeny fosfinové ligandy s objemnými elektrondonorovými substituenty (např. *t*-Bu₃P), které umožnily provést reakce i s méně reaktivními chloridy⁸. Herrmann a Beller použili také palladacykly⁹, tedy palladiové komplexy s organickými C,X-chelatajícími ligandy (X je donorový heteroatom). Tyto komplexy vynikají obzvláště vysokou katalytickou aktivitou a jsou přitom velmi dobře definované. Odlišnou cestou se vydal Jeffery¹⁰, který zjistil, že po přidání tetrabutylammonium-chloridu k octanu palladnatému se výrazně zvýší aktivita katalytického systému. To je pravděpodobně způsobeno lepší stabilizací palladiových nanočástic vytvořených v reakční směsi (viz dále).

V dnešní době se výzkum zaměřený na spojovací reakce ubírá čtyřmi základními cestami: (i) studiem mechanismu těchto reakcí a určením skutečné katalyticky aktivní formy palladia, (ii) přípravou katalyzátorů umožňujících reakce s méně reaktivními substráty, (iii) přípravou katalyzátorů pro enantioselektivní spojovací reakce a (iv) přípravou ekonomicky a ekologicky výhodných katalyzátorů pro průmyslové aplikace.

Průmyslově vhodné katalyzátory pro spojovací reakce je možné získat několika způsoby. Lze kupříkladu připravit homogenní katalyzátor s vysokou aktivitou, jehož bude potřeba jen malé množství, ale který bude po ukončení reakce nutno odstranit z reakční směsi a tak zpravidla zničit¹¹, nebo připravit katalyzátor, který bude použitelný opakovaně. Jednou z intenzivně studovaných možností recyklace palladiových katalyzátorů je využití iontových kapalin, které jsou za zvýšené teploty mísitelné s reaktanty i produkty, ale po ochlazení se reaktanty a produkty oddělí od iontové kapaliny obsahující katalyzátor¹². V běžné průmyslové praxi se však jako výhodnější recyklovatelné katalyzátory jeví heterogenní systémy. Jejich zásadní výhodou je robustnost, jednoduchá separace filtrací nebo centrifugací a možnost použití v průtokovém reaktoru.

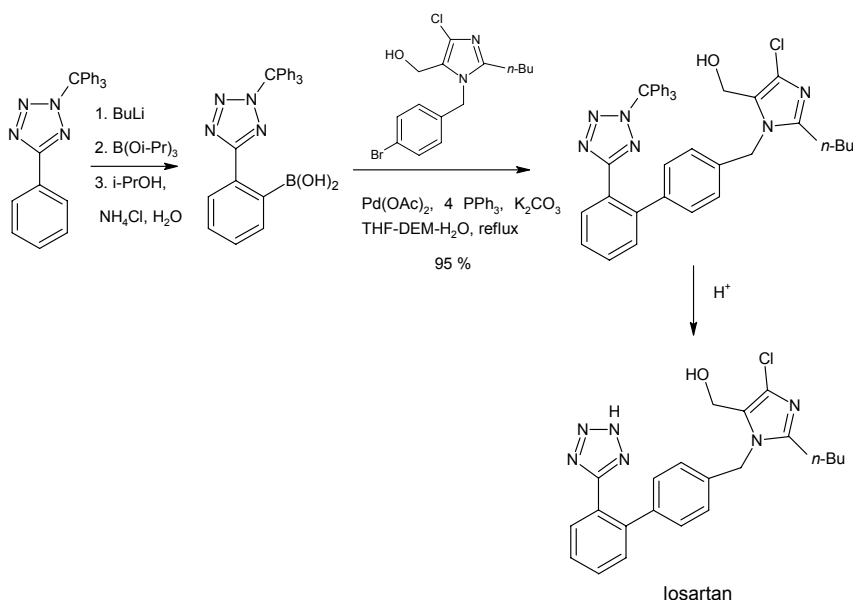


Obr. 3. Použití intramolekulární Heckovy reakce při syntéze (-)-fysostigminu (TIPS = triisopropylsilyl, PMP = 1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin, DMA = *N,N*-dimethylacetamid, (*S*)-BINAP = (*S*)-(-)-2,2'-bis(difenylofosfino)-1',1'-binaftyl a dba = dibenzylidenacetone)

S cílem přiblížit se k aktivitě a selektivitě komplexů přechodných kovů, které se běžně používají jako homogenní katalyzátory, byly navrženy a studovány katalyzátory, které kombinují výhody obou skupin. Tyto tzv. heterogenizované katalyzátory jsou většinou připravovány navázáním komplexu přechodného kovu na povrch pevného nosiče¹³. Komplex může být vázán buď kovalentně zakotveným ligandem nebo pouze elektrostatickými (nekovalentními) interakcemi. Obvyklou nevýhodou takových katalyzátorů však stále zůstává vymývání aktivních center (kovu), které vede k postupné ztrátě katalytické aktivity.

3.1. Heckova reakce

Heckova reakce^{1,14} byla objevena nezávisle Mizorokim¹⁵ a Heckem¹⁶. V obvyklé variantě se jedná o reakci alkenů substituovaných elektronakceptorovou skupinou s arylhalogenidem v přítomnosti báze. Heckova reakce je jedním z nejjednodušších postupů, kterým lze připravit substituované alkeny, jejichž reaktivní dvojná vazba zůstává k dispozici pro další syntetické přeměny. Běžně se Heckova reakce používá jak v intermolekulární variantě ke spojování dvou různých molekul, tak k intramolekulárnímu uzavírání nenasycených kruhů. Snad proto je Heckova reakce pravděpodobně nejstudovanější ze všech spojova-



Obr. 4. Použití Suzukiho reakce ke spojení dvou arenových prekurzorů při syntéze losartanu; THF – tetrahydrofuran, DEM – diethoxymethan

cích reakcí. Např. Overman a spol. použili enantioselektivní Heckovu reakci při totální syntéze (–)-fysostigminu¹⁷, přírodního alkaloidu, který je silným inhibitorem acetylcholinesterasy (obr. 3).

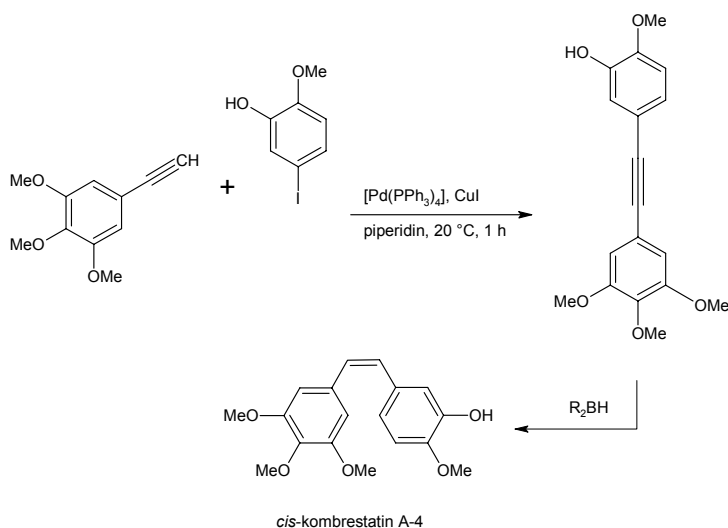
3.2. Suzukiho reakce

Suzukiho reakce^{1,18}, tedy reakce halogenderivátu s organoboritou sloučeninou (typicky arylboronovou kyselinou) v přítomnosti báze, se používá nejčastěji pro přípravu biarylových sloučenin, poslouží však stejně dobře i ke spojení sp^2 a sp^3 uhlíků. Reakce je omezena použitím relativně silné báze, která může reagovat s citlivějšími reaktanty. Na druhé straně jsou však organoborité většinou dostupné jednoduchými reakcemi organolithných nebo hořečnatých sloučenin s trialkyl-boráty nebo také adicí dialkylboranů na terminální alkeny. Celá řada jich je dostupná komerčně.

Jelikož jsou arylboronové kyseliny relativně polární, je možné tuto reakci úspěšně provádět ve vodném prostředí nebo ve směsi organického rozpouštědla s vodou. Jako praktický příklad využití Suzukiho reakce může sloužit příprava losartanu¹⁹, který se používá k léčbě vysokého krevního tlaku (obr. 4).

3.3. Sonogashirova reakce

Reakce, při které přímo reaguje terminální alkyne s aryl- nebo vinylhalogenidem za přítomnosti báze, se nazývá Sonogashirova reakce¹. Používá se především k přípravě arylalkynů a enynů. Její výhodou oproti výše zmíněným reakcím je možnost provedení reakce za mírnějších reakčních podmínek, často za laboratorní teploty. Lawrence a spol. např. využili Sonogashirovy reakce při syntéze *cis*-kombrestatinu A-4, který byl studován jako potenciální cytostatikum (obr. 5, cit.²⁰).



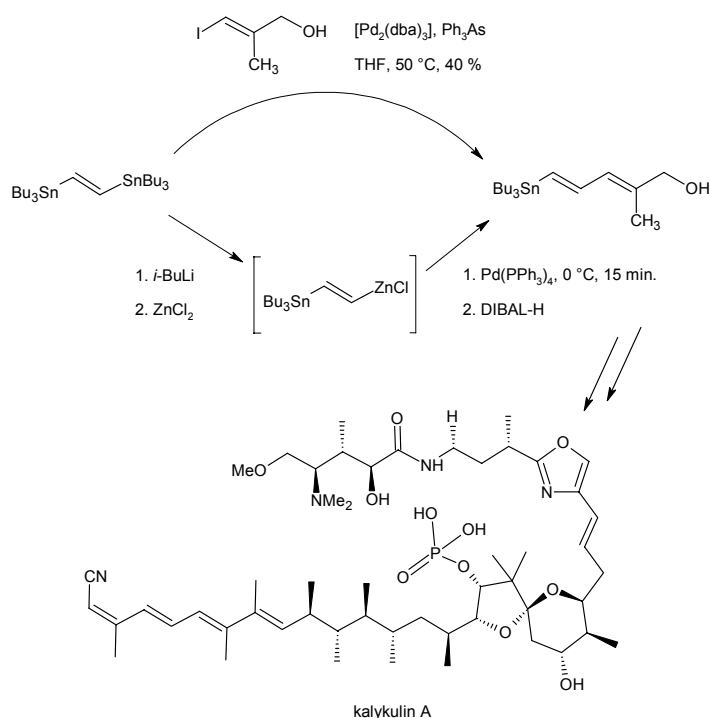
Obr. 5. Použití Sonogashirovy reakce při přípravě *cis*-kombrestatinu A-4

Sonogashirova reakce je katalyzována palladnatými komplexy a typicky se provádí v přítomnosti sloučenin Cu^I jako kokatalyzátoru²¹. Měďné ionty (obdobně i ionty jiných kovů) pravděpodobně reagují s alkynem a bázi za vzniku acetylidu měďného²², který vstoupí do katalytického cyklu a reaguje s komplexem $L_nPd(R)X$.

V roce 1992 Genêt a spol. jako první popsali úspěšnou Sonogashirovu reakci provedenou bez přidání sloučenin mědi (tj. pouze v přítomnosti octanu palladnatého a tris (3-sulfonatofenyl)fosfinu jako pomocného ligandu)²³. Jako katalyzátory byly později v reakcích prováděných bez sloučenin mědi úspěšně použity také jednoduché palladnaté soli bez stabilizujících ligandů²⁴ a dokonce i palladium deponované na aktivním uhlí²⁵.

3.4. Stilleho a Negishiho reakce

Reakce organocinických sloučenin s nenasycenými halogenderiváty (Stilleho reakce)¹ a reakce organozinečnatých sloučenin s alkenyl- nebo arylhalogenidy (Negishiho reakce)¹, katalyzované sloučeninami palladia, jsou často používány v syntézách analogů přírodních látek. Jejich hlavní výhodou představuje možnost slučovat méně reaktivní uhlíky s sp^3 hybridizací. Zdá se, že tyto reakce jsou do jisté míry komplementární. Když jedna z nich selhává, druhá často probíhá velice dobře. Jako příklad zde poslouží syntéza kalykulinu A (obr. 6, cit.²⁶). Tyto reakce nebyly zkoumány z hlediska využití rozličných katalyzátorů do takové míry jako reakce předchozí, zvláště pak v heterogenních variantách. Proto také není tolik objasněna role nanočástic v těchto reakcích. Předpokládá se však, že je podobná jako v předchozích případech²⁷.

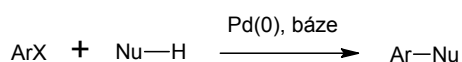


Obr. 6. Porovnání použití Stilleho a Negishiho reakce při totální syntéze kalykulinu A; DIBAL-H je *i*-Bu₂AlH, dba je dibenzylidenacetone

4. Spojovací reakce vedoucí ke vzniku vazby C-heteroatom

Již v 70. letech dvacátého století byly publikovány reakce, ve kterých byla spojovací reakcí vytvořena vazba uhlík-dusík²⁸. Tyto reakce však dlouho nenalezly tak široké použití jako C-C spojovací reakce. Až Buchwald a Hartwig^{1,29} zavedli obecně použitelné metody tvorby vazeb C-heteroatom. Ve svých pracích studovali reakce arylhalogenidů s neorganokovovými nukleofily za přítomnosti palladnatých komplexů (definovaných či připravovaných *in situ* z palladnatých solí a ligandů; obr. 7). Nukleofily v Buchwaldově-Hartwigově reakci mohou být aminy, amidy, iminy, hydraziny, alkoholy, thioly atp. Běžně se tak touto reakcí dají tvořit nejen vazby C-N, C-O, ale také vazby C-S a C-P.

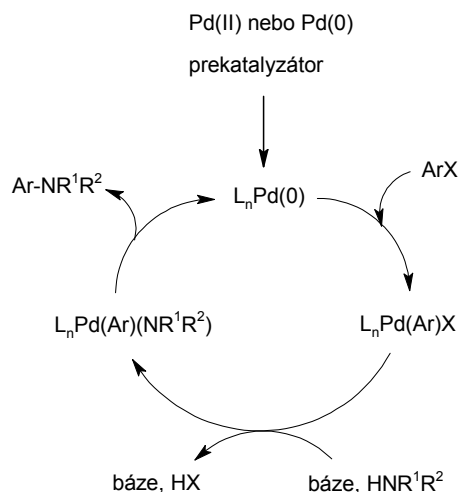
Předpokládá se, že zjednodušený katalytický cyklus³⁰ této reakce je podobný jako v C-C spojovacích reakcích (viz obr. 8). Prvním krokem je oxidační adice arylhalogenidu na palladiovou species (Pd(0)). Následuje reakce s nukleofilem za přítomnosti báze, kdy nukleofil nahradí



Obr. 7. Obecné schéma Buchwaldovy-Hartwigovy reakce

koordinovaný halogenid. Posledním stupněm je pak redukční eliminace produktu, kterou se zároveň regeneruje výchozí palladiový komplex.

V dnešní době se jako katalyzátory pro spojovací reakce C-heteroatom běžně používají definované (předem připravené) fosfinové komplexy palladia, nebo se do re-



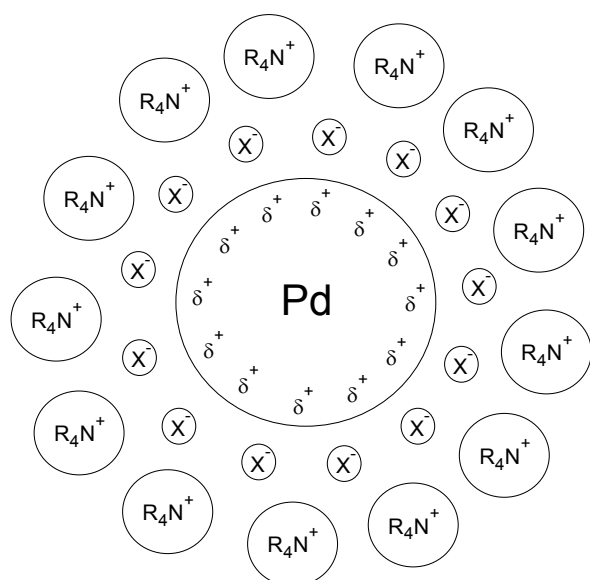
Obr. 8. Zjednodušený katalytický cyklus Buchwaldovy-Hartwigovy aminace; L značí obecný ligand

akční směsi přidávají palladnaté soli a fosfinové ligandy, ze kterých následně komplex vzniká³. Objevují se ale také práce, ve kterých jsou k palladiovým solím místo fosfinových ligandů přidávány tetrabutylamoniové soli³¹, což by mohlo znamenat, že i v těchto reakcích palladiové nanočástice hrají podobnou úlohu jako v C-C spojovacích reakcích (podrobněji viz dále).

5. Palladiové katalyzátory

Za dobu uplynulou od objevu palladiem katalyzovaných spojovacích reakcí^{1,32} se postupně ukázalo, že palladium v téměř všech formách je schopné s nižší nebo vyšší aktivitou tyto reakce zprostředkovat. Mezi nejčastěji používané katalyzátory však stále patří tradiční fosfinové komplexy a palladacykly¹⁴. Předpokládalo se, že tyto látky nejsou skutečnými katalyzátory, nýbrž jen pre-katalyzátory, které jsou za podmínek reakce převedeny v katalyticky aktivní sloučeniny palladia s oxidačním číslem nula. Později se však prokázalo, že v řadě případů jsou v reakční směsi detegovatelná množství kovových (tj. palladiových) nanočástic, a to již při nízkých konverzích³³. Rovněž reakční kinetika uvedených reakcí nasvědčuje tomu, že složité a drahé komplexy mnohdy slouží jen jako zásobárna palladia, ze které se aktivní forma kovu pomalu uvolňuje ve formě palladiových nanočástic³⁴.

Následný výzkum potvrdil, že samotné palladiové nanočástice mohou katalyzovat spojovací reakce³⁵. Ve srovnání s většími kompaktními formami kovu vynikají nanočástice vysokým poměrem specifického povrchu k hmotnosti a vysokým podílem ploch a hran přístupných pro reaktanty. Jejich základní nevýhodou je však nestálost,



Obr. 9. Schematické znázornění elektrostaticky stabilizované nanočástice, jež je obklopena dvojitou vrstvou elektricky nabitých částic³⁸

způsobená povrchovým napětím. To se projevuje vysokou tendencí k agregaci, jež samozřejmě snižuje jejich katalytickou aktivitu. Proto je třeba palladiové nanočástice připravovat způsobem, který zamezí jejich samovolnému shlukování.

Přímou možností je kondenzace kovu z plynné fáze³⁶. Tato technika je však v běžné praxi nevýhodná pro přípravu většího množství nanočástic. Proto byly vyvinuty další způsoby přípravy založené např. na elektrochemických dějích nebo prosté chemické redukci palladnatých solí. Aby nedocházelo k agregaci vznikajících nanočástic, je do směsi přidáváno stabilizující činidlo. Tím mohou být tetraalkylamoniové soli, polymery (např. poly(1-vinyl-2-pyrrolidon)), dendrimery³⁷ nebo silná polární rozpouštědla jako propylen-karbonát (příklady viz dále).

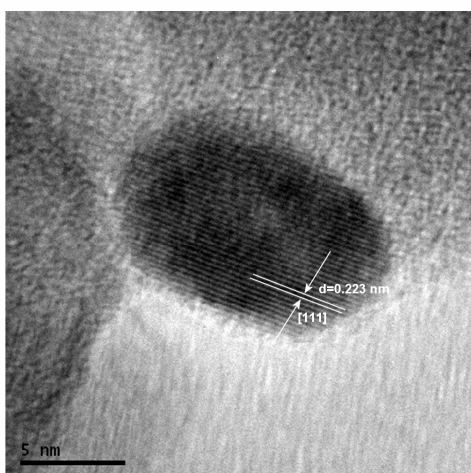
Stabilizující činidla mohou působit dvěma základními mechanismy: (i) elektrostatickými interakcemi (obr. 9), kdy jsou na povrchu kovu adsorbovány vhodné anionty (např. halogenidy nebo citráty), které kompenzují kladný náboj nanočástice, nebo (ii) sterickými interakcemi, které brání přiblížení a agregaci částic (např. adsorpcí polymerního řetězce na povrch nanočástice³⁸).

Takto připravené nanočástice se mohou použít přímo v roztoku ke katalýze podobně jako obvyklý homogenní katalyzátor nebo mohou být naneseny na povrch vhodného inertního nosiče (např. SiO₂, Al₂O₃ a oxidy kovů, aktivní uhlí, uhlíkové nanotrubičky).

6. Použití palladiových nanočástic v katalýze

Jak již bylo uvedeno dříve, jsou palladiové nanočástice aktivními katalyzátory spojovacích reakcí. Narozdíl od komplexů palladia se však během reakce snadno shlukují, čímž výrazně klesá jejich katalytická aktivita. De Vries a spol.³⁴ kupříkladu zjistil, že při Heckově reakci brombenzenu s butyl-akrylátem katalyzované octanem palladnatým závisí počet reakčních obrátů (TON) na množství katalyzátoru v reakční směsi. Čím menší množství palladia je v reakční směsi přítomno, tím vyšší je TON. Toto pozorování se vysvětlilo pomalejší agregací kovových nanočástic v důsledku jejich nižší koncentrace v reakčním prostředí.

Jiný způsob zvýšení katalytické aktivity palladiových nanočástic představuje přidání stabilizujícího činidla do reakční směsi. Jeffery zvolil tetrabutylamonium-chlorid (reakce methyl-akrylátu se substituovanými aryljodidy při 30 °C po 1 až 3 dnech probíhala s více než 90% konverzí)¹⁷, zatímco Reetz použil *N,N*-dimethylglycin (Heckova reakce styrenu s aktivovanými i deaktivovanými arylbromidy: po 10 hodinách při 130 °C bylo dosaženo 60-100 % konverze)³⁹. Často byly studovány systémy, ve kterých jsou palladiové nanočástice vytvořeny před začátkem reakce. V těchto případech bylo jako stabilizátorů použito silně polárních rozpouštědel. Reetz a spol.⁴⁰ připravili nanočástice redukcí octanu palladnatého v přítomnosti propylen-karbonátu a jimi pak katalyzovali reakci bromarenů se styrenem. Aktivovaný 1-brom-4-nitrobenzen zreagoval úplně již po 5 h při 130 °C, zatímco neaktivovaný brombenzen zreagoval pouze z 8 % po 15 h při 147 °C.



Obr. 10. Snímek palladiové nanočástice adsorbované na povrch mezoporézního molekulového síta MCM-41 získaný z transmisního elektronového mikroskopu; částice má pravidelnou strukturu kovu. Zvýrazněna je vzdálenost krystalografických rovin [111] (cit.⁵⁸)

Trzeciak a spol.⁴¹ zkoumali nanočástice stabilizované poly (1-vinyl-2-pyrrolidonem), které použili jako katalyzátory reakce brombenzenu s butyl-akrylátem. Po 2 h při 130 °C dosáhli 73% konverze brombenzenu. Katalyzátor byl následně ještě třikrát použit, ale jeho aktivita postupně klesala. Při čtvrtém použití dosáhla konverze po 4 h pouhých 18 %.

Jinou možností, jak zachovat aktivitu palladiových nanočástic v reakční směsi po delší dobu, je nanosení na povrch pevného nosiče⁴², jímž může být kupříkladu aktivní uhlí⁴³, uhlíkové nanotrubicce⁴⁴, organické polymery⁴⁵ nebo inertní anorganické materiály jako křemičitany, hlinitokřemičitany, a oxidy kovů. Zvláštní pozornost si zaslouží zeolity a v posledních letech také mezoporézní molekulová síta. Zeolity jsou mikroporézní krystalické hlinitokřemičitany. Náboj jejich krystalické mřížky je kompenzován elektrostaticky vázanými protony, kationty amonnými nebo kationty kovů⁴⁶, což umožňuje rovnoměrně nanést palladnaté ionty („volné“ nebo koordinované) jednoduchou iontovou výměnou z roztoku palladnatých solí. Například de Vos a spol.⁴⁷ připravili modifikované zeolity mordenit, ZSM-5 a zeolit Y iontovou výměnou za ionty $[\text{Pd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ a použili je v Heckově reakci 4-bromacetofenonu s butyl-akrylátem. Dosažené konverze se pohybovaly mezi 65 a 90 % po 25 až 50 h. V průtokovém uspořádání pak dosáhli stejní autoři 33% konverze.

Po iontové výměně může být palladnatý ion přímo zredukován na palladiové nanočástice. Djakovitch a spol.⁴⁸ porovnali katalytickou aktivitu mordenitu a zeolitu Y iontově vyměněných s $[\text{Pd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ s jejich redukovanými obdobami, získanými redukcí v proudu vodíku při 350 °C. Tyto katalyzátory testovali v reakci brombenzenu se styrenem. Stanovené konverze dosahovaly hodnot okolo 90 % po 20 h reakce při 140 °C. Katalyzátory obsahující Pd(0)

sice měly nižší aktivitu než jejich neredukované obdoby, ale nevykazovaly indukční periodu.

Corma a spol.⁴⁹ připravili bifunkční zeolitické katalyzátory zavedením báze na heterogenní katalyzátor iontovou výměnou za cesné nebo draselné ionty a následně dopovali nosič roztokem chloridu palladnatého. Takto připravené katalyzátory však vykazovaly v reakci brombenzenu s fenylboronovou kyselinou výtěžky produktu pouze kolem 40 %, a to i při použití více než 10 mol.% palladia v reakční směsi.

Nevýhodou použití zeolitů ve spojovacích reakcích je omezená velikost vstupních oken do kanálů zeolitu¹⁴, z toho důvodu se v současné době zaměřila pozornost spíše na mezoporézní molekulová síta⁵⁰. Ta byla poprvé připravena na začátku 90. let v laboratořích firmy Mobil⁵¹. Jedná se opět o křemičitanové nebo hlinitokřemičitanové materiály, které disponují póry o velikosti několika nanometrů (2-30 nm).

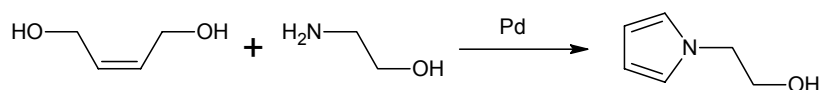
Mezoporézní molekulová síta se připravují templátovou syntézou za použití polárních micel. Tyto micely jsou po přidání vhodného prekurzoru (např. tetraethoxysilanu nebo vodního skla) obaleny amorfními křemičitany. Po kondenzaci křemičitanového obalu je templát odstraněn kalcinací nebo extrakcí organickým rozpouštědlem. Kromě definované porézní struktury je výhodou mezoporézních molekulových sít především jejich velký měrný povrch, který často převyšuje $1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, a lze jej poměrně snadno chemicky modifikovat.

Palladium bylo zavedeno na povrch mezoporézních molekulových sít depozicí $[\text{Pd}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)]$ z plynné fáze a následným tepelným rozkladem⁵². Takto nanosené palladiové nanočástice byly použity v reakci styrenu a butyl-akrylátu s aktivovanými arylbromidy. Konverze různých arenů byla téměř 100 % po 20 min až 2 h reakce při 120 °C v *N,N*-dimethylacetamidu.

Další možnost, jak zabezpečit vznik malých palladiových nanočástic, představuje nanosení palladiového klastru na povrch nosiče a jeho následný rozklad. Behrens a spol.⁵³ impregnovali mezoporézní molekulové síto MCM-41 osmijaderným klastrem $[\text{Pd}_8(\text{CO})_8(\text{PMe}_3)_7]$, který poté rozložili při 180 °C. Takto připravili nanočástice palladia o průměru zhruba 4,5 nm. Pokud byl místo karbonylového klastru použit octan, chlorid nebo acetylacetonát palladnatý, vznikaly nanočástice o průměru 7 až 30 nm.

Molnár a spol.⁵⁴ přidali chlorid palladnatý přímo do syntézní směsi při přípravě mezoporézního molekulového síta. Takto připravený katalyzátor testovali v reakci styrenu a methyl-akrylátu s aktivovanými i deaktivovanými bromareny; do reakční směsi přidali také tetrabutylamonium-chlorid. Dosažené konverze se pohybovaly mezi 80 a 100 % po 6 h reakce v 1-methyl-2-pyrrolidonu při 150 °C.

Shi a spol.⁵⁵ nechali zreagovat mezoporézní molekulové síto s trimethoxysilanem, čímž pokryli jeho povrch molekulami s vazbou Si-H, které následně sloužily jako redukční činidlo v reakci s octanem palladnatým. Takto připravený katalyzátor použili v reakci styrenu a methyl-akrylátu s brombenzenem a aktivovanými bromareny. Při



Obr. 11. Kondenzační reakce 2-aminoethanolu se (Z)-but-2-en-1,4-diolem za vzniku 1-(2-hydroxyethyl)pyrrolu

reakci aktivovaných arylbromidů dosáhli konverzí vyšších než 95 % již po 8 h při 120 °C, ovšem brombenzen zreagoval pouze z 40–50 % po 2 dnech při 170 °C. Takto připravený katalyzátor nevykazoval snižování aktivity při opakovaném použití.

V naší práci jsme ukázali⁵⁸, že i předem připravené palladiové nanočástice mohou být naneseny na mezopórní molekulové síto. Nanočástice jsme připravili termochemickou redukcí octanu palladnatého v tetrahydrofuranu za přítomnosti stabilizujícího činidla tetrabutylamonium-acetátu nebo jen v propylen-karbonátu, který je díky své polaritě a donorovým vlastnostem schopen částice stabilizovat. Připravené kovové nanočástice byly jednoduše deponovány (adsorbovány) na mezopórní molekulové síto MCM-41 a získané katalyzátory následně použity při kondenzační reakci (Z)-but-2-en-1,4-diolu s 2-aminoethanolem za vzniku 1-(2-hydroxyethyl)pyrrolu (obr. 11). Katalyzátor získaný z nanočástic připravených v přítomnosti tetrabutylamonium-acetátu jako stabilizačního činidla vykázal v uvedené reakci poněkud vyšší aktivitu, což odpovídá menšímu průměru nanočástic.

Následně jsme připravili hlinitokřemičitanová mezopórní molekulová síta, která jsme vyměnili do cesné formy a na ně nanesli palladiové nanočástice připravené opět předem redukcí octanu palladnatého v přítomnosti tetrabutylamonium-acetátu⁵⁶. Tyto bifunkční (bazické a zároveň palladiové) katalyzátory jsme testovali v Heckově reakci butyl-akrylátu s brombenzenem bez přítomnosti báze. Jelikož bifunkční katalyzátory vykazovaly zhruba pětkrát nižší aktivitu než obdobně připravený katalyzátor obsahující pouze palladiové nanočástice kombinované s octanem sodným, je velmi pravděpodobně, že limitujícím faktorem je kromě ostatních podmínek také množství báze využitelné pro reakci. Porovnali jsme také rychlost reakce prováděné za obvyklých podmínek (tj. s ohřevem v olejové lázni) a v mikrovlnné peci. Při mikrovlnném ohřevu probíhala reakce zhruba desetkrát rychleji; dosažená konverze po 10 h byla 35 %. Pomocí rentgenové difrakce a transmisní elektronové mikroskopie s vysokým rozlišením jsme prokázali, že mikrovlnný ohřev zároveň urychluje agregaci palladiových částic.

7. Závěr

Spojovací reakce se běžně používají při syntéze speciálních chemikálií a přírodních látek⁵⁷. Jejich rozšíření v průmyslových aplikacích prozatím mnohdy brání cena palladnatých komplexů používaných jako katalyzátory. Protože cena ligandů často převyšuje cenu samotného palladia, jsou stále častěji studovány katalytické systémy,

kteří ligandy neobsahují. Jako vhodné se jeví aktivní formy kovového palladia ve formě nanočástic. Zatím jsou studované především v laboratorních podmínkách, ale mnoho vědeckých skupin se intenzivně zabývá možnostmi jejich stabilizace a recyklace a tím otevřít cestu k jejich využití v běžné chemické praxi.

I když stále není popsána vlastní katalyticky aktivní částice palladia, zdá se, že nanočástice hrají podstatnou roli v katalýze spojovacích reakcí. Hlavním problémem zůstává, jak zabránit jejich shlukování a s tím spojené deaktivaci katalyzátoru. Dále také není známo, z jakého důvodu malá změna katalytického systému, např. změna báze, nebo použití jen mírně odlišného substrátu, vede často k velmi odlišným rychlostem reakce. Pochopení těchto základních principů při spojovacích reakcích je nutné k jejich většímu rozšíření v průmyslových výrobcích a k zefektivnění těchto procesů.

LITERATURA

1. de Meijere A., Diederich F. (ed.): *Metal-Catalysed Cross-Coupling Reactions*, 2. vydání. Wiley-VCH, Weinheim 2004.
2. Hong B.-C., Nimje R. Y.: *Curr. Org. Chem.* 10, 2191 (2006).
3. Schlummer B., Scholz U.: *Adv. Synth. Catal.* 346, 1599 (2004).
4. (a) Higgs G.: *Chem. Ind.* 827 (1997); (b) de Vries J. G.: *Can. J. Chem.* 79, 1086 (2001).
5. (a) Tamao K., Sumitani K., Kumada M.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4374 (1972), (b) Tamao K., Sumitani K., Kiso Y., Zembayashi M., Fujioka A., Kodama S., Nakajima I., Minato A., Kumada M.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 49, 1958 (1976).
6. (a) Yamamura M., Moritani I., Murahashi S. I.: *J. Organomet. Chem.* 91, C39 (1975), (b) Cassar L.: *J. Organomet. Chem.* 93, 253 (1975); (c) Negishi E., Baba S.: *Chem. Commun.* 596 (1976); (d) Fauvarque J. F., Jutand A.: *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1976, 765; (e) Sekiya A., Ishikawa N.: *J. Organomet. Chem.* 118, 349 (1976); (f) Dieck H. A., Heck F. R.: *J. Organomet. Chem.* 93, 259 (1975).
7. Negishi E.: *Acc. Chem. Res.* 15, 340 (1982).
8. Littke A. F., Fu G. C.: *J. Org. Chem.* 64, 10 (1999).
9. Herrmann W. A., Brossmer C., Öfele K., Reisinger C.-P., Priermeier T., Beller M., Fischer H.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 34, 1844 (1995).
10. Jeffery T.: *Chem. Commun.* 1984, 1287.
11. Farina V.: *Adv. Synth. Catal.* 346, 1553 (2004).
12. Pârvulescu V. I., Hardacre C.: *Chem. Rev.* 107, 2615 (2007).

13. (a) De Vos D. E., Dams M., Sels B. F., Jacobs P. A.: *Chem. Rev.* 102, 3615 (2002); (b) Corma A., García H.: *Adv. Synth. Catal.* 348, 1391 (2006).
14. Beletskaya I. P., Cherpakov A. V.: *Chem. Rev.* 100, 3009 (2000).
15. Mizoroki T., Mori K., Ozaki A.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 44, 581 (1971).
16. Heck R. F., Nolley J. P.: *J. Org. Chem.* 37, 2320 (1972).
17. Ashimori A., Matsuura T., Overman L. E., Poon D. J.: *J. Org. Chem.* 58, 6949 (1993).
18. Miyaura N., Suzuki A.: *Chem. Rev.* 95, 2457 (1995).
19. Larsen R. D., King A. O., Chen C. Y., Corley E. G., Foster B. S., Roberts F. E., Yang C., Lieberman D. R., Reamer R. A., Tschaen D. M., Verhoeven T. R., Reider P. J.: *J. Org. Chem.* 59, 6391 (1994).
20. Lawrence N. J., Ghani F. A., Hepworth L. A., Hadfield J. A., McGown A. T., Pritchard R. G.: *Synthesis* 9, 1656 (1999).
21. Sonogashira K., Tohda Y., Hagihara N.: *Tetrahedron Lett.* 1975, 4467.
22. (a) Tykwinski R. R.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 42, 1566 (2003); (b) Sonogashira K.: *J. Organomet. Chem.* 653, 46 (2002).
23. Genet J.-P., Blart E., Savignac M.: *Synlett* 1992, 715.
24. Li J.-H., Liang Y., Xie Y.-X.: *J. Org. Chem.* 70, 4393 (2005).
25. Heidenreich R. G., Köhler K., Krauter J. G. E., Pietsch J.: *Synlett* 2002, 1118.
26. Pihko P. M., Koskinen A. M. P.: *Synlett* 1999, 1966.
27. Astruc D.: *Inorg. Chem.* 46, 1884 (2007).
28. (a) Yoshimura N., Moritani I., Shimamura T., Murahashi S.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 3038 (1973); (b) Murahashi S., Shimamura T., Moritani I.: *Chem. Commun.* 1974, 931; (c) Muzart J.: *Eur. J. Org. Chem.* 2007, 3077.
29. (a) Guram A. S., Rennels R. A., Buchwald S. L.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 34, 1348 (1995); (b) Louie J., Hartwig J. F.: *Tetrahedron Lett.* 36, 3609 (1995).
30. Prim D., Campagne J. M., Joseph D., Andrioletti B.: *Tetrahedron* 58, 2041 (2002).
31. Battistuzzi G., Bernini R., Cacchi S., De Salve I., Fabrizi G.: *Adv. Synth. Catal.* 349, 297 (2007).
32. Negishi E.: *J. Organomet. Chem.* 653, 34 (2002).
33. de Vries J. G.: *Dalton Trans.* 2006, 421.
34. de Vries A. H. M., Mulders J. M. C. A., Mommers J. H. M., Henderickx H. J. W., de Vries J. G.: *Org. Lett.* 5, 3285 (2003).
35. Reetz M. T., de Vries J. G.: *Chem. Commun.* 2004, 1559.
36. Benfield F. W. S., Green M. L. H., Ogden J. S., Young D.: *Chem. Commun.* 1973, 866.
37. Scott R. W. J., Wilson O. M., Crooks R. M.: *J. Phys. Chem., B* 109, 692 (2005).
38. Özkar S., Finke R. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 5796 (2002).
39. Reetz M. T., Westermann E., Lohmer R., Lohmer G.: *Tetrahedron Lett.* 39, 8449 (1998).
40. Reetz M. T., Lohmer G.: *Chem. Commun.* 1996, 1921.
41. Gniewek A., Trzeciak A. M., Ziółkowski J. J., Kepiński L., Wrzyszczyk J., Tylus W.: *J. Catal.* 229, 332 (2005).
42. Yin L., Liebscher J.: *Chem. Rev.* 107, 133 (2007).
43. Juli M., Duteil M., Gard C., Kuntz E.: *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1973, 2791.
44. Pan H., Yen C. H., Yoon B., Sato M., Wai C. M.: *Synth. Commun.* 36, 3473 (2006).
45. (a) Mastrolilli P., Nobile C. F.: *Coord. Chem. Rev.* 248, 377 (2004); (b) Hahn F., Schepers U.: *Top. Curr. Chem.* 278, 135 (2007).
46. Čejka J., Žilková N.: *Chem. Listy* 94, 278 (2000).
47. Dams M., Drijkoningen L., Pauwels B., Van Tendeloo G., De Vos D. E., Jacobs P. A.: *J. Catal.* 209, 225 (2002).
48. Djakovitch L., Koehler K.: *J. Mol. Catal., A* 142, 275 (1999).
49. Corma A., García H., Leyva A.: *Appl. Catal., A* 236, 179 (2002).
50. Phan N. T. S., Van Der Sluys M., Jones C. W.: *Adv. Synth. Catal.* 348, 609 (2006).
51. Kresge C. T., Leonowicz M. E., Roth W. J., Beck J. S.: *Nature* 359, 710 (1992).
52. Mehnert C. P., Weaver D. W., Ying J. Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12289 (1998).
53. Behrens S., Spittel G.: *Dalton Trans.* 2005, 868.
54. Papp A., Galbács G., Molnár Á.: *Tetrahedron Lett.* 46, 7725 (2005).
55. Li L., Shi J.-L., Yan J.-N.: *Chem. Commun.* 2004, 1990.
56. Demel J., Čejka J., Bakardjieva S., Štěpnička P.: *J. Mol. Catal., A* 263, 259 (2007).
57. (a) Demel J., Čejka J., Štěpnička P.: *J. Mol. Catal., A* 274, 127 (2007); (b) Demel J., Park S.-E., Čejka J., Štěpnička P.: *Catal. Today* 132, 63 (2008).
58. Hong B.-C., Nimje R.-Y.: *Curr. Org. Chem.* 10, 2191 (2006).

J. Demel^{a,b}, J. Čejka^b, and P. Štěpnička^a (^a *Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague* ^b *J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Science of the Czech Republic*): **Palladium Nanoparticles in the Catalysis of Coupling Reactions**

Cross-coupling reactions have become an indispensable tool for creating new carbon-carbon and, more recently, also carbon-heteroatom bonds. After a brief survey of the most frequently encountered reaction types, the present review gives examples of the reactions performed in the presence of Pd nanoparticles or supported heterogeneous Pd catalysts. The new catalytic systems are effective mediators of cross-coupling reactions with a great practical potential.

KOLOBEH SÍRY VO VÍNE

KATARÍNA FURDÍKOVÁ a FEDOR MALÍK

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemická a potravinárskej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
katarina@furdik.com

Došlo 8.11.07, prijaté 22.2.08.

Kľúčové slová: sírne látky, aróma, aromatické látky, víno, *Saccharomyces cerevisiae*

Obsah

1. Úvod
2. Vinič
3. Oxid siričitý
4. Sírný metabolizmus kvasiniek
5. Vitamíny
6. Sírna aróma vína
 - 6.1. Sulfán
 - 6.2. Tioly a ďalšie sírne látky
7. Záver

1. Úvod

V prírode sa síra nachádza v mnohých organických i anorganických látkach. Z anorganických zlúčenín sú najbežnejšie elementárna síra a sulfidy, oxidy síry, siričitany a sírany. Pre metabolizmus akejkoľvek bunky sú sírne látky nepostrádateľné. Síra je súčasťou esenciálnych vitamínov, koenzýmov, aminokyselín a proteínov a bez nich by živé organizmy nemohli existovať. Bez dostatku tých správnych sírných zlúčenín by nebolo ani kvalitné víno.

2. Vinič

Rastliny, a teda aj vinič hroznorodý (*Vitis vinifera*) prijímajú síru v anorganickej forme. Koreňmi z pôdy ju čerpajú vo forme síranových aniónov, listami zo vzduchu ako oxid siričitý a z prípravkov na ochranu rastlín v podobe síranov a elementárnej síry. Deficit sírných zlúčenín vo výžive rastlín spôsobuje chlorózu listov a celkové žltnutie všetkých zelených častí. Na listoch sa postupne zjavujú výrazné škvrny, tvoria sa lézie, pletivo nekrotizuje a listy sú skrútené a veľmi krehké. Rastliny s vysokým deficitom síry samozrejme nekvitnú a neprinášajú žiadnu úrodu. Aby vinič dobre prosperoval, a aby hrozno obsahovalo dostatok sírných zlúčenín pre ďalšie pôsobenie kvasiniek, potrebuje

vinič dostatočný prísun anorganickej síry. Vzhľadom na správne hnojenie, časté postreky a vzduch s exhalátmi s obsahom síry, nedostatok sírných látok viniču väčšinou nehrozí. Kumulácia síry najmä v emisiách zaťažených oblastiach môže zapríčiniť problémy s jej relatívnym nadbytkom a so znižovaním odolnosti viniča voči rôznym chorobám.

V hroznovom mušte sa síra nachádza najmä v podobe síranov a siričitanov, menšie množstvá sú viazané v proteínoch, peptidoch, niektorých vitamínoch, alebo v podobe viazaných tiolov. Dostatočná koncentrácia asimilovateľnej síry (v spojení s dostatkom dusíkatých látok) je nesmierne dôležitá pre metabolizmus, rast a fermentáciu kvasiniek a následne aj pre výrobu kvalitného vína. Optimálna koncentrácia celkovej síry, ktorá zabezpečí ideálny priebeh fermentácie, je 10 mg l⁻¹.

3. Oxid siričitý

Neodmysliteľnou sírnou zlúčeninou, ktorá zásadne ovplyvňuje výrobu vína, je oxid siričitý (SO₂). Je to bezfarebný reaktívny plyn, ktorý vzniká oxidáciou síry a pri vyšších koncentráciách má ostrý štiplavý zápach. Aplikácia SO₂ má vo vinárstve z technologického hľadiska nenahraditeľný význam. Oxid siričitý zabezpečuje fyzikálno-chemickú a biologickú stabilitu vína, pričom sa využíva jeho antioxidantný a antimikrobiálny účinok.

Antioxidantný účinok SO₂ spočíva v jeho schopnosti viazať molekulový kyslík a zabraňovať tak chemickým i enzýmovým oxidáciám:



Protialdehydický účinok sa zakladá na schopnosti SO₂ viazať acetaldehyd, pričom vzniká senzoriicky neaktívna kyselina acetaldehydsiričitá. Voľný acetaldehyd, ktorý vo vyšších koncentráciách vínu dodáva zvetranú a štiplavú príchuť¹, sa tak eliminuje. Oxid siričitý zároveň bráni vzniku kyseliny octovej z acetaldehydu, čím sa predchádza narušeniu aromatického profilu vína.

Oxid siričitý sa vo víne vyskytuje v rôznych formách, no antiseptické vlastnosti SO₂ sú najmä výsledkom vplyvu molekulového SO₂. Molekulový oxid siričitý je asi päťstokrát účinnejší voči kvasinkám, ako ostatné formy voľného SO₂. Vo víne s pH 3,0–4,0 sa 94–98 % SO₂ vyskytuje vo forme siričitanových (SO₃²⁻) a hydrogénsiričitanových (HSO₃⁻) iónov, a iba malý podiel (2–6 %) sa nachádza v molekulovej forme. Viazaný oxid siričitý na mikroorganizmy negatívne nevlplyva².

Oxid siričitý do bunky prechádza jednoduchou difúziou a v kyslom prostredí cytoplazmy disociuje. V bunke sa siričitan hromadí a reagujú s koenzýmami (NAD, FAD, FMN), kofaktormi, vitamínmi a nukleovými

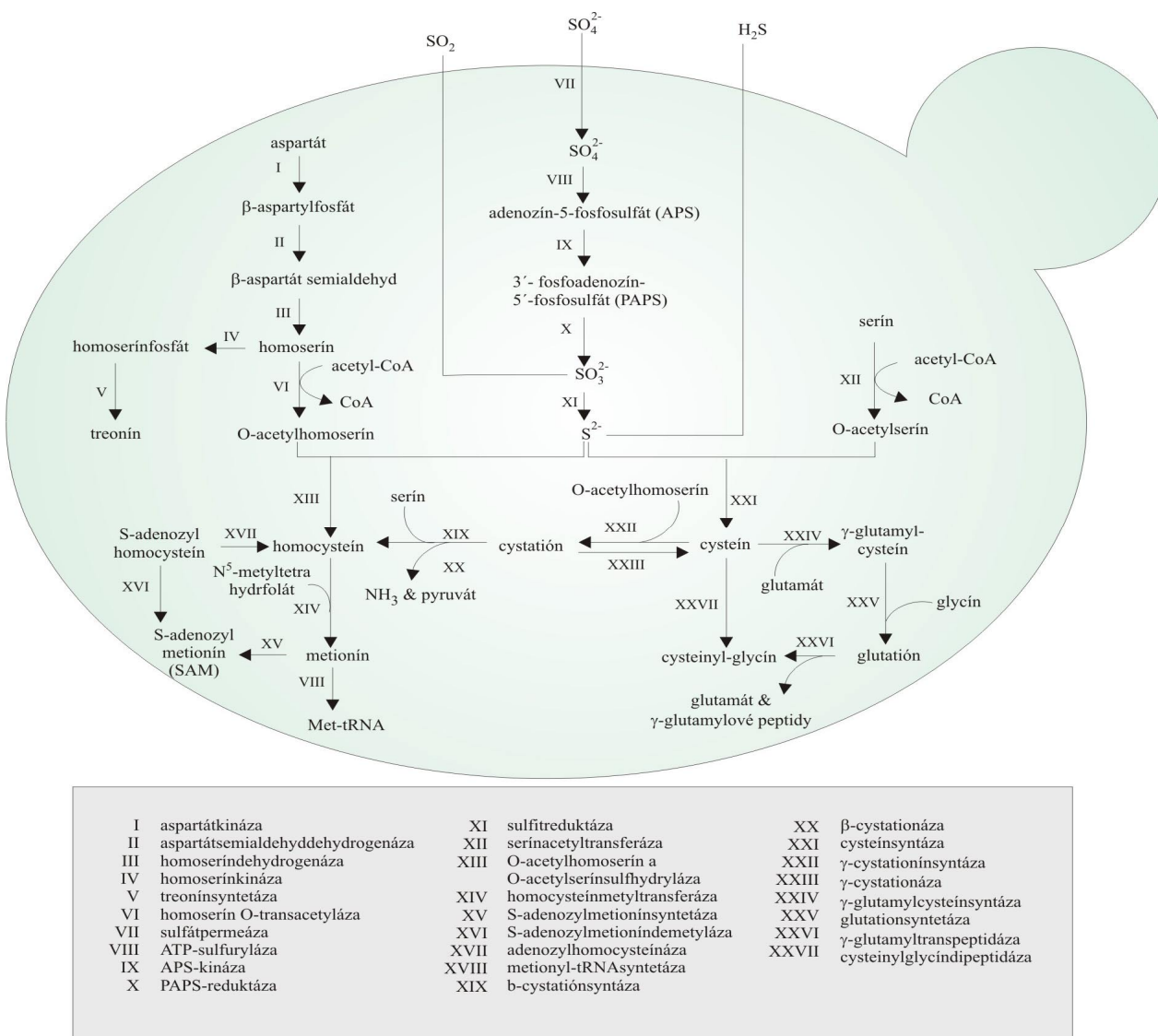
kyselinami³. Tieto a mnohé ďalšie reakcie postupne vedú k nevratnej inhibícii rastu kvasiniek a smrti bunky. Rezistencia niektorých mikroorganizmov ku určitým dávkam SO₂ je daná geneticky. Z mikroorganizmov, ktoré sa vyskytujú v mušte a vo víne, sú na účinok SO₂ citlivé najmä octové a mliečne baktérie, apikulátne kvasinky a vláknité huby. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces bayanus* sú podstatne odolnejšie a tolerujú asi 4 mg l⁻¹ molekulového SO₂. Koncentrácia 8 mg l⁻¹ molekulového SO₂ ich rozmnožovanie zastaví a na kompletnú deštrukciu *S. cerevisiae* je potrebná dávka vyššia ako 50 mg l⁻¹ molekulového SO₂.

Správne dávkovanie SO₂ v spojení s použitím čistej kultúry kvasiniek umožňuje kontrolovať priebeh celej fermentácie a výroby vína. Samotný prídavok komerčnej štartovacej kultúry *S. cerevisiae* do spontánne kvasiaceho

muštu nepostačuje na to, aby sa hneď stal prevládajúcim v populácii prítomných kvasiniek a fermentácia bola od začiatku kontrolovaná. Prídavok SO₂ však jeho dominanciu zabezpečí.

4. Sírny metabolizmus kvasiniek

Rast kvasiniek a ich metabolizmus je podmienený dostatkom sírnych aminokyselín, ako sú cysteín, metionín, S-adenozylmetionín a glutatión. Ak tieto látky vo výžive kvasiniek chýbajú, bunka si ich musí syntetizovať z anorganických sírnych komponentov. Pre hrozňový mušt je typické, že obsahuje nedostatok organických sírnych zlúčenín (menej než 10 mg l⁻¹ cysteínu a metionínu), čo je signálom pre ich syntézu z anorganických zdrojov^{4,5}. Väč-



Obr. 1. Schéma sírneho metabolizmu vinných kvasiniek (Swiegers a spol., 2005)

šina kvasiniek je schopná utilizovať síru v podobe síranov. Tieto sú v bunke pomocou série enzýmov redukované na sulfidy, ktoré sú prekursorom ďalších sírných zlúčenín (obr. 1). Dôležitým krokom metabolickej dráhy sírných zlúčenín je zabudovanie sulfidov do štruktúry aminokyselinových prekursorov *O*-acetylserínu a *O*-acetylhomoserínu. Vytvoria sa tak aminokyseliny cysteín a homocysteín, ktorý je ďalej transformovaný na metionín. Sulfid je v týchto aminokyselinách bezpečne viazaný a podieľa sa na vzniku ďalších látok, napríklad proteínov. Tento krok je pre technológiu výroby vína veľmi dôležitý. Ak totiž aminokyselinové prekursorov v kvasničnej bunke chýbajú, sulfidy sa nemajú na čo naviazať a vo forme sulfánu sa uvoľňujú do prostredia. Na syntézu *O*-acetylserínu a *O*-acetylhomoserínu (dusíkatých látok schopných viazať sulfidy) je potrebný koenzým A a jeho kofaktor kyselina pantoténová. Kyselina pantoténová je dusíkatá látka a v kvasinkách vzniká transformáciou aminokyselín (valínu a kyseliny asparágovej). Sírny metabolizmus kvasiniek je teda veľmi úzko prepojený s metabolizmom dusíkatých látok^{4,6}. Pri dlhodobom nedostatku využiteľného dusíka kvasinky postupne odumierajú, proteíny sa degradujú a síra sa z aminokyselín uvoľňuje opäť vo forme sírovodíka.

5. Vitamíny

Pre správnu funkciu enzýmových systémov a celkovú aktivitu kvasiniek sú dôležité vitamíny. Veľká väčšina vitamínov (inositol, biotín, kyselina listová, kyselina pantoténová) je v mušte prítomná v dostatočných koncentráciách^{7,8}. Kritickými rastovými faktormi sú tiamín (vitamín B₁) a biotín, ktoré oba patria medzi sírne zlúčeniny. *S. cerevisiae* si tiamín dokáže syntetizovať sám, ale biotín potrebuje prijímať v hotovej podobe. Napriek tomu, nedostatok tiamínu v mušte spôsobuje zastavenie fermentácie a rastu kvasiniek.

Nedostatok tiamínu v médiu môžu spôsobovať nesacharomycétné kvasinky (*Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Metchnikowia pulcherrima*). Tieto druhy už za niekoľko hodín spotrebujú majoritnú časť vitamínu B₁ v mušte a fermentácia sa tak môže zastaviť skôr, ako sa mušt zakvasí čistou kultúrou *S. cerevisiae*. Nedostatok tiamínu je typický aj pre hrozno napadnuté plesňou *Botrytis cinerea*. Prídavok vitamínov do média podporuje rast a navýšenie biomasy⁹. Použitím vitamínového preparátu sa zároveň znížia potrebné dávky oxidu siričitého, pretože optimálne živé kvasinky viažu podstatne menej SO₂ ako kvasinky s deficitom vitamínu B₁ (cit.⁸). Optimálna koncentrácia tiamínu pre *S. cerevisiae* je 50–500 µg l⁻¹. Vitamín B₁ sa do muštu pridáva vo forme tiamínhydrochloridu, najviac však v dávke 0,6 mg l⁻¹.

Deficit biotínu spôsobuje inhibíciu fermentácie glukózy a fruktózy a zníženie syntézy mastných kyselín, DNA, RNA a celkových proteínov. V bunkovej stene klesá obsah manánov, narastá koncentrácia glukánov a krehkosť bunkovej steny sa zvyšuje. Pre väčšinu kvasiniek je postačujú-

ca koncentrácia biotínu v prostredí 1 µg l⁻¹, maximálny rast dosahujú pri koncentrácii 100 µg l⁻¹.

6. Sírna aróma vína

Prchavé sírne zlúčeniny hrajú v aróme vína významnú rolu. Je to spojené s ich vysokou prchavosťou, reaktivitou a intenzívnym prejavom aj pri veľmi nízkych koncentráciách¹⁰. Niektoré zo sírných zlúčenín sú dôležité pre kvalitu vína, iné spôsobujú silne negatívne zápachy, a to i pri extrémne nízkych koncentráciách (tab. I). Tvorbu prchavých sírných zlúčenín ovplyvňujú organické a anorganické sírne zlúčeniny, výživové parametre muštu a metabolizmus kvasiniek. Väčšina prchavých sírných látok nachádzajúcich sa vo víne sa vytvára počas alkoholovej fermentácie kvasinkami *S. cerevisiae*¹¹.

Prchavé sírne látky sa podľa prchavosti delia do dvoch základných kategórií: ľahké s bodom varu pod 90 °C a ťažké s bodom varu nad 90 °C. Koncentrácia ľahkých sírných zlúčenín vo víne sa vyzrievaním zvyšuje, ale je možné ich odstrániť. Ťažké sírne zlúčeniny majú nízku prchavosť, vyzrievaním sa ich koncentrácia vo víne nemení a odstrániť sa nedajú. Vysoká koncentrácia prchavých sírných látok vo víne, takzvaná „sírka“, je priamo spojená s metabolickou činnosťou kvasiniek. Túto nepríjemnú vadu vína spôsobujú rôzne sírne zlúčeniny – tioly, polysulfidy a sírne alkoholy, ale majoritné postavenie má sírovodík. Produkciu H₂S ovplyvňuje najmä zloženie muštu, koncentrácia a zastúpenie rôznych sírných a dusíkatých látok, ale tiež genetická výbava zainteresovaných kmeňov kvasiniek.

6.1. Sulfán

Sulfán je vo víne najrozšírenejšou sírnou zlúčeninou. Jeho aróma pripomína hnilé vajcia a prah citlivosti vône je 10–80 µg l⁻¹. Sulfán je vysoko reaktívna zlúčenina, ktorá generuje nové senzorycky aktívne látky¹⁰. Sulfán produkovaný na začiatku fermentácie je asociovaný s rastom kvasiniek a typickým nedostatkom výživových faktorov, špeciálne fosforečnanu amónneho a kyseliny pantoténovej. Hladina 60–250 mg l⁻¹ asimilovateľného dusíka a 250 mg l⁻¹ kyseliny pantoténovej zabezpečí významné zníženie produkcie H₂S a iných prchavých sírných zlúčenín¹².

Mechanizmus tvorby sulfánu počas záverečnej fázy kvasenia je podmienený kmeňom kvasiniek^{13,14}. Pri rovnakých podmienkach produkujú rôzne kmene rôzne množstvá sulfánu^{4,13}. Genetická výbava *Saccharomyces cerevisiae* a expresia génov kódujúcich enzýmy jednotlivých krokov sírneho metabolizmu teda jednoznačne produkciu sulfánu ovplyvňuje. Potvrdzujú to mnohé genetické štúdie. Nadexpresia génu *MET17*, ktorý kóduje *O*-acetylserín/*O*-acetylhomoserín sulfhydrolázu, napr. vedie k vyššiemu vyvážovaniu sulfidov a podstatnej redukcii tvorby sulfánu¹⁵.

„Sírka“ vo víne sa ošetruje modrým čírením – použitím síranu meďnatého. Meďnaté ióny reagujú s voľnými

Tabuľka I
Charakteristika prchavých sírnych zlúčenín vo víne (Swiegers a spol., 2005)

| Prchavé sírne zlúčeniny | Koncentrácia vo víne [$\mu\text{g l}^{-1}$] | Prah vône [$\mu\text{g l}^{-1}$] | Aróma |
|-------------------------|---|------------------------------------|--|
| Sulfán | stopy–80 | 10–80 | hnilé vajíčka |
| Metántiol | 2,1–5,1 | 0,3 | hnilá voda |
| Etántiol | 1,9–18,7 | 1,1 | cibuľa, guma, zemný plyn |
| Dimetylsulfid | 1,4–61,9 | 25 | špargľa, kukurica, melasa |
| Dietylsulfid | 4,1–31,8 | 0,93 | cibuľa, cesnak |
| Dimetyldisulfid | 2 | 15,2 | varená kapusta |
| Dietyldisulfid | stopy–85 | 4,3 | cesnak, spálená guma |
| Metionol | 140–5000 | 500 | karfiol, kapusta, zemiaky |
| Benzotiazol | 0–11 | 50 | guma |
| Tiazol | 0–34 | 38 | pukance, arašidy |
| 4-Metyltiazol | 0–11 | 55 | zelený lieskovec |
| 2-Furánmetántiol | 0–350 ng l^{-1} | 1 ng l^{-1} | spálená guma / pražená káva |
| Tiofén-2-tiol | 0–11 | 0,8 | spálená guma / pražená káva |
| 4MMP | 0–30 ng l^{-1} | 3 ng l^{-1} | „Sauvignon blanc“ aróma, mačací moč / čierne ríbezle |
| 3MH | 0,5–5 | 60 ng l^{-1} | granátové jablko, grapefruit |
| 3MHA | 1–100 ng l^{-1} | 4 ng l^{-1} | „rizlingová“ aróma, granátové jablko, krušpán |

tiolmi a H_2S a vytvárajú sulfidy, ktoré možno odfiltrovať. Znovuvytvorenie zápachov vo víne počas skladovania po ošetroaní síranom mednatým a naľšaovaní je spojená s tvorbou nepríjemných prchavých látok vznikajúcich napr. hydrolyzou esterov kyseliny tiooctovej, pričom sa znova uvoľňujú zápachajúce tioly. Mednaté ióny s esterami kyseliny tiooctovej nereagujú, preto je pre úplné odstránenie týchto nežiadúcich látok nutné ošetrovanie síranom mednatým opakovať.

6.2. Tioly a ďalšie sírne látky

Jednou z najdôležitejších skupín aromatických látok vo víne sú tioly (merkaptány). Tioly vznikajú metabolizmom kvasiniek a ich prekursorom môže byť sulfán¹⁶. Napríklad etántiol vzniká reakciou sulfánu s etanolom alebo acetaldehydom. V závislosti od koncentrácie a typu môžu merkaptány zapáchať alebo príjemne voňať. Tiofén-2-tiol má dymovú arómu, vo vyšších koncentráciách zápacha ako spálená guma a v nízkych vytvára arómu čerstvo pomletej kávy. Najbežnejšími merkaptánmi vo víne sú metántiol a etántiol. Sú to typicky zápachajúce látky. Metántiol má zápach hnijúcej vody, etántiol má zápach surovej cibule.

Niektoré merkaptány v nízkych koncentráciách príjemne voňajú a tvoria tzv. odrodový charakter hrozna. Napríklad 4-merkaptio-4-metylpentán-2-ón (4MMP) je látka zodpovedná za odrodový charakter variety Sauvignon Blanc¹⁷, 3-merkaptiohexylacetát (3MHA) zase za arómu rizlingov. 3-Merkaptiohexanol (3MH) môže voňať po

čiernych ríbezliach, grapefruitu alebo granátovom jablku, 2-furánmetántiol a 2-furfuryltiol môžu mať arómu praženej kávy¹⁸. Prchavé tioly sa v hrozne vo voľnej forme nevyskytujú. Prchavý 4MMP typický pre Sauvignon Blanc je v mušte viazaný na aminokyselinu cysteín a vytvára neprchavú zlúčeninu¹⁹. Aby sa z tohto komplexu uvoľnil, potrebuje zásah kvasiniek. *S. cerevisiae* účinkom karbonsulfurylázy sprostredkúva štiepenie neprchavých cysteínových prekursorov (Cys-4MMP), prchavý tiol sa uvoľňuje a víno získa svoju typickú arómu. Uvoľnenie 4MMP z neprchavého komplexu kódujú štyri gény¹⁹ a možno teda vyhlásiť, že kmeň kvasiniek a jeho genetická výbava aktívne ovplyvňuje aj odrodový charakter vína.

Ďalšími prchavými sírnymi látkami vo víne sú polysulfidy, ktoré vznikajú oxidáciou tiolov. Sú to hlavne dimetyldisulfid, dimetyltrisulfid a dimetyltetrasulfid, ktoré majú arómu gummy alebo cesnaku a nemožno ich odstrániť čírením mednatými iónmi. Kvasinky však dokážu disulfidy spätne redukovať na merkaptány, ktoré s mednatými iónmi reagujú.

Sírna aminokyselina metionín môže byť kvasinkami metabolizovaná na síru obsahujúce alkoholy. Metionol (3-metyltio-1-propanol) je jednou z hlavných sírnych zlúčenín vo víne. Má karfiolovú arómu a môže byť neskôr pozmenený na 3-metyltiopropylacetát, ktorý má hubovú, alebo cesnakovú vôňu¹⁸. Prídavok suplementov (hydrogénfosforečnan amónny) často vedie k významnému úbytku hladiny metionolu vo víne.

Za netypické starnutie vína je zodpovedná sírna zlúčenina 2-aminoacetofenón. Túto vadu možno zaznamenať,

ak víno obsahuje nad $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ 2-aminoacetofenónu. Faktory ako ošetrovanie a hnojenie viniča, stresové podmienky počas vegetačného obdobia, nedostatok dusíkatých zdrojov pre kvasinky, nízka antioxidačná aktivita vína veľmi výrazne vplyvajú na rozvoj tohto fenoménu²⁰. Správnym hnojením, výberom vhodného kmeňa kvasiniek a dávkovaním kyseliny askorbovej možno vzniku 2-aminoacetofenónu a tiež metionalu efektívne predísť.

7. Záver

Sírne zlúčeniny sú pre výrobu kvalitného vína rovnako nepostrádateľné ako sacharidy, kyseliny, či dusíkaté látky. Sú súčasťou každého živého organizmu a plnia úlohu stavebnú i riadiacu. Bez využiteľnej síry a niektorých jej aktívnych komponentov by nebolo možné dopestovať hrozno, fermentovať mušt, ani vyrábať víno. K výrobe vína s bezchybnou arómou a chuťou však nestačí len mušt s dostatočnou koncentráciou síry. Metabolizmus sacharidov, dusíkatých a sírnych látok je u kvasiniek kódovaný geneticky a je navzájom veľmi úzko poprepájaný. Preto je výroba zdravého, bezchybného vína ovplyvnená celkovým zložením muštu, zastúpením všetkých výživových parametrov (majoritných i minoritných) a tiež výberom konkrétneho kmeňa čistej kultúry kvasiniek.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0488-07.

Zoznam skratiek

| | |
|------|-------------------------------|
| 4MMP | 4-merkaptó-4-metylpentán-2-ón |
| 3MH | 3-merkaptóhexanol |
| 3MHA | 3-merkaptóhexylacetát |

LITERATÚRA

- Bujan J., Atrajona J.: *Degustácia vína. Zošity o víne*. Rubes editorial, Barcelona 1997.
- du Toit W. J., Pretorius I. S., Lonvaud-Funel A.: *J. Appl. Microbiol.* **98**, 862 (2005).
- Rose A. H., Pilkington B. J., v knihe: *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures* (Gould G.W., ed.), kap. *Sulphite*. Elsevier, London 1989.
- Henschke P. A., Jiranek V., v knihe: *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet G. H., ed.), kap. *Yeast – Growth during fermentation*. Harwood Academic Publishers, Chur 1993.
- Park S. K., Boulton R. B., Noble A. C.: *Am. J. Enol. Viticult.* **51**, 91 (2000).
- Jiranek V., Langridge P., Henschke P. A.: *J. Appl. Bact.* **81**, 329 (1996).
- Ough C. S., Davenport M., Joseph K.: *Am. J. Enol. Viticult.* **40**, 208 (1989).
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A.: *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*, 2. vydanie. John Wiley, Chichester 2006.
- Kocková-Kratochvílová A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Alfa, Bratislava 1990.
- Vermeulen C., Gijs L., Collin S.: *Food Rev. Intern.* **21**, 69 (2005).
- Rauhut D., Kürbel H., Dittrich H. H., Großmann M.: *Die Wein-Wissenschaft* **51**, 187 (1996).
- Wang X. D., Bohlscheid J. C., Edwards C. G.: *J. Appl. Microbiol.* **94**, 349 (2003).
- Spiropoulos A., Tanaka J., Flerianos I., Bisson L. F.: *Am. J. Enol. Viticult.* **51**, 233 (2000).
- Mendes-Ferreira A., Mendes-Faia A., Leao C.: *J. Food Prot.* **65**, 1033 (2002).
- Spiropoulos A., Bisson L. F.: *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4421 (2000).
- Lambrechts M. G., Pretorius I. S.: *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97 (2000).
- Dubourdieu D., Tominaga T., Masneuf I., Peyrot de Gachons C., Murat, M. L.: *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 81 (2006).
- Swiegers J. H., Bartowsky E. J., Henschke P. A., Pretorius I. S.: *Aust. J. Grape Wine. Res.* **11**, 139 (2005).
- Howell K. S., Swiegers J. H., Elsey G. M., Siebert T. E., Bartowsky E. J., Fleet G. H., Pretorius I. S., de Barros Lopes M. A.: *FEMS Microbiol. Lett.* **240**, 125 (2004).
- Švejcar V.: *Vinič a víno 2006*, 70.

K. Furdíková and F. Malík (*Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Sulfur Cycle of Wine**

In winegrowing, sulfur compounds are as important as sugars, acids or amino nitrogen. They are present in every living organism serving for building-up of tissues and control functions. Without utilizable sulfur and some of its active compounds it would not be possible to raise grapes, ferment grape juice and produce wine. Concentrations of sulfur in musts are not sufficient for creation of perfect aroma of wine. The metabolisms of sugars, nitrogen and sulfur compounds in yeasts are closely linked. Production of perfect, healthy wine is influenced by the composition of must, presence of all nutritional components and by the strain of wine yeasts as well.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYUŽITÍ PASIVNÍHO VZORKOVÁNÍ VOD A PORÉZNÍCH MÉDIÍ PŘI SLEDOVÁNÍ ORGANICKÝCH POLUTANTŮ

JANA PULKRABOVÁ, MARIE SUCHANOVÁ,
JANA HAJŠLOVÁ, VLADIMÍR KOCOUREK
a MONIKA TOMANIOVÁ

Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
jana.hajslova@vscht.cz

Došlo 16.1.07, přepracováno 24.9.08, přijato 8.10.08.

Klíčová slova: pasivní vzorkování, organické polutanty, semipermeabilní membránové zařízení, Chemcatcher, polychlorované bifenyly, organochlorové pesticidy, polycyklické aromatické uhlovodíky

Úvod

Aktuální stav životního prostředí je zpravidla hodnocen podle hladiny kontaminujících látek opakovaně měřené v ovzduší, vodě nebo půdě. Vzhledem k tomu, že úroveň a charakter kontaminace abiotických složek jsou v dané lokalitě v čase proměnlivé, ovlivňují výsledek analýzy prostředí při jednorázovém odběru vzorku i aktuální klimatické podmínky, doba vzorkování, či okamžitá lokální kontaminace. Pro získání komplexní informace o celkové (dlouhodobé) zátěži ekosystému je proto výhodnější využívat nové pasivní vzorkovací techniky vhodné pro tzv. integrální vzorkování *in situ*¹. Tyto techniky poskytují, mimo jiné, rozhodující údaje pro odhad zátěže biotické složky ekosystému.

Zařízení pro pasivní vzorkování, využívající dlouhodobou (řádově dny) kumulaci polutantů z vody do absorpčního (sekvestračního) média, se skládají ze dvou hlavních komponent: (i) kapalně či pevně fáze, ke které mají cílové analyty vysokou afinitu, a (ii) membrány řídící difuzi sloučenin do tohoto média. Rychlost transportu a sekvestrace cílových sloučenin je potom určována difuzní bariérou (vlastnostmi membrány, její plochou, velikostí pórů a materiálem, ze kterého je vyrobena) a v neposlední řadě také absorpčním médiem, jehož množství je rozhodující zejména pro celkovou kapacitu vzorkovače^{1,2}.

Jedním z nejstarších typů pasivních vzorkovačů je např. membránové zařízení PISCES (Passive In Situ Concentration Extraction Sampler), které je tvořeno polyethy-

lenovou membránou naplněnou hexanem jako absorpčním médiem. Od počátku 90. let 20. století začala být využívána trubicová zařízení se semipermeabilními polyethylenovými membránami (SPMD), které obsahují jako absorpční médium triolein (glycerol-trioleát), pro monitorování hydrofobních polutantů životního prostředí – polychlorovaných bifenyly (PCB), polyaromatických uhlovodíků (PAU), organochlorových pesticidů (OCP)^{2–4}.

V posledním desetiletí se vývoj zaměřil na diskové vzorkovače, z nichž nejznámější je diskový vzorkovač s pevnou fází, Chemcatcher, který byl navržen v různých variantách lišících se typem semipermeabilní membrány. Kromě varianty pro organické nepolární látky (polyethylenová membrána) je k dispozici i varianta pro polární látky, jako jsou např. moderní pesticidy a jejich metabolity, rezidua farmaceutických látek (polyethersulfonová membrána), ale dokonce i pro těžké kovy (acetylcelulosa nebo polyethersulfonová membrána)^{5,6}. Teoretické základy nejrůznějších typů pasivních vzorkovačů používaných nejen pro vodné ekosystémy uvádějí Stuer-Lauridsen⁷ nebo Vrana a spol.⁸.

Předkládaná studie uvádí příklady aplikace obou typů těchto pasivních vzorkovačů, tj. SPMD a nepolární varianty Chemcatcher, na vybrané organické sloučeniny (polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované bifenyly (PCB) a organochlorové pesticidy (OCP) při analýze vody a porézních médií.

Experimentální část

Standardy a další chemikálie

Směs standardů sedmi indikátorových kongenerů PCB – PCB MIX 3 (kongenerů dle IUPAC č. 28, 52, 101, 118, 138, 153 a 180) v isooktanu (10 $\mu\text{L mL}^{-1}$) a pevné standardy OCP [pentachlorbenzen (QCB), hexachlorbenzen (HCB), α -, β -, γ -isomer hexachlorcyklohexanu (HCH), 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan (DDT) a metabolitů 1,1-dichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan (DDD) a 1,1-dichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethylen (DDE), dieldrin] byly od firmy Dr. Ehrenstorfer GmbH (Německo). Směs standardů PAU – individuální roztoky standardů PAU – naftalen (Naph), acenaften (Ace), fluoren (Fln), fenantren (Phe), anthracen (Ant), fluoranthen (Flt), pyren (Pyr), benzo[a]anthracen (B[a]A), chrysen (Chr), benzo[b]fluoranthen (B[b]F), benzo[k]fluoranthen (B[k]F), benzo[a]pyren (B[a]P), dibenzo[ah]anthracen (DB[ah]A), benzo[ghi]perylen (B[ghi]P) a indeno[1,2,3-cd]pyren (I[cd]P) v toluenu byly od firmy Dr. Ehrenstorfer GmbH (Německo). Organická rozpouštědla – dichlormethan, hexan, isooktan a ethyl-acetát byly dodány firmou Merck (Německo), oktan-1-ol byl od firmy Supelco (Německo),

aceton a síran sodný bezvodý p. a. byly od firmy Penta (ČR). Gel použitý při gelové permeační chromatografii Bio-Beads S-X3 (styren-divinylbenzenový kopolymer), velikost částic 37–75 μm , byl od firmy Bio-Rad Laboratories (USA).

Pracovní postupy při stanovení organických polutantů

Vzorkování půdy za laboratorních podmínek

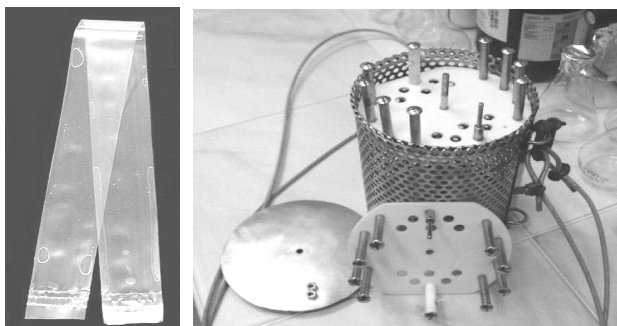
Pro demonstraci funkce SPMD při analýze biologicky dostupné frakce (frakce porézních médií dostupná živým organismům) environmentálních matric byly odebrány vzorky orné půdy v lokalitě Malé Žernoseky (levý břeh Labe; N = 50°32,327'; E = 14°03,611'). Vzorkování půdy probíhalo za podmínek uvedených ve dřívější studii⁹. V první fázi experimentu byl za statických podmínek (bez použití míchání) připraven vodný výluh (1,5 kg vysušené půdy a 3 L destilované vody), který byl po 24 h dekantován. Pro daný experiment byl vodný výluh definován jako vodný sloupec nad porézním médiem, který vedle sledovaných látek obsahoval i další složky matrice, ať již ve formě roztoku nebo suspendovaných částic. Experiment probíhal s membránami (30 × 300 mm naplněnými 350 mg trioleinu; Labicom, ČR) navinutými na nerezový stojánek (obr. 1) a ponořenými do vodného výluhu půdy o objemu 2,5 L na dobu 1 h, 6 h, 24 h, 48 h a 96 h. Po ukončení vzorkování byly membrány vyjmuty ze vzorkovacího zařízení a po opatrném odstranění povrchového znečištění (otřením buničinou navlhčenou destilovanou vodou) uchovávány při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby analýzy.

Vzorkování říční vody v Labi v lokalitě Střekov

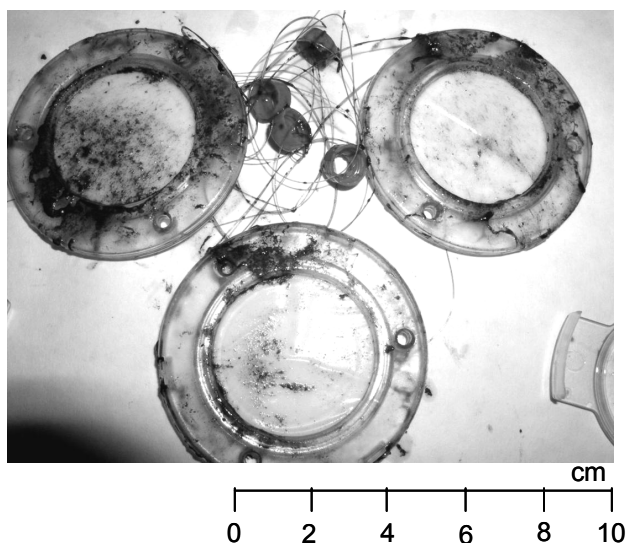
(i) Chemcatcher

Tento nový typ pasivního vzorkovače byl získán z University v Portsmouth (Velká Británie) v rámci studie jejich funkčnosti prováděné při přípravách britské normy pro pasivní vzorkování vod v rámci Evropského projektu STAMPS (Standardised Aquatic Monitoring of Priority Pollutants by Passive Sampling, EVK1-CT-2002-00119)^{4,5,8}.

Využití vzorkovačů Chemcatcher (obr. 2) se stacionární oktaedrylovou fází (C_{18} Empore[®]) bylo testováno v reálných podmínkách na řece Labi (jez Střekov). Na



Obr. 1. Semipermeabilní membrána a vzorkovací koš



Obr. 2. Pasivní vzorkovače Chemcatcher po 28denní expozici v Labi

počátku vzorkování bylo do řeky ve speciální kleci umístěno 6 vzorkovačů pro vzorkování polárních a 6 vzorkovačů pro vzorkování nepolárních látek (polyethylenová membrána). Tři disky z každé série byly exponovány 14 dní, zbylé tři 28 dní.

(ii) Vzorky vody („spotsamples“)

Po celou dobu vzorkování vzorkovačem Chemcatcher byly také v pravidelných intervalech odebírány vzorky říční vody. V nich byl stanoven obsah cílových látek, a to jednak jako podíl rozpuštěný ve vodě po odfiltrování pevných částic (skleněný filtr 0,7 μm ; Whatman, Velká Británie), jednak jako podíl organických polutantů sorbovaný na pevných částicích.

Izolace a přečištění

(i) SPMD

Exponované membrány SPMD byly rozstříhány na části dlouhé cca 2 cm a extrahovány hexanem v ultrazvukové lázni. Před vlastním stanovením byl extrakt přečištěn gelovou permeační chromatografií (GPC). Podrobně byla metoda popsána Šetkovou a spol.¹⁰.

(ii) Chemcatcher

Z povrchu disku C_{18} Empore[®] pasivního vzorkovače byla odebrána polyethylenová membrána, ze které byl acetonem extrahován oktan-1-ol, kterým byl disk nasycen. Disk C_{18} Empore[®] byl následně extrahován acetonem s použitím ultrazvuku po dobu 5 min a poté směsí ethylacetát-isoooktan (1:1, v/v) také 5 min. Spojené extrakty (z membrány a disku C_{18} Empore[®]) byly přefiltrovány přes vrstvu bezvodého síranu sodného a odpařeny na rotační vakuové odparce. Odparek byl poté převeden do roztoku

ku v oktan-1-olu obsahujícího D₁₀-antracen a PCB 207 jako vnitřní standardy pro GC/MS.

(iii) Vzorky vody

Vzorek říční vody byl po filtraci přes skleněné filtry třepán v děličce po dobu 3 × 4 min s dichlormethanem. Spojené organické vrstvy byly po filtraci přes vrstvu bezvodého síranu sodného zahuštěny na odparce a odparek byl rozpuštěn v isooktanu.

Cílové analyty byly izolovány ze skleněných filtrů použitých pro filtraci vzorků extrakcí v Soxhletově aparatuře směsí hexan:aceton (1:1, v/v) po dobu 6 h. Extrakty byly odpařeny na odparce a zbytek rozpouštědla byl odstraněn jemným proudem dusíku. Získaný odparek byl rozpuštěn v isooktanu.

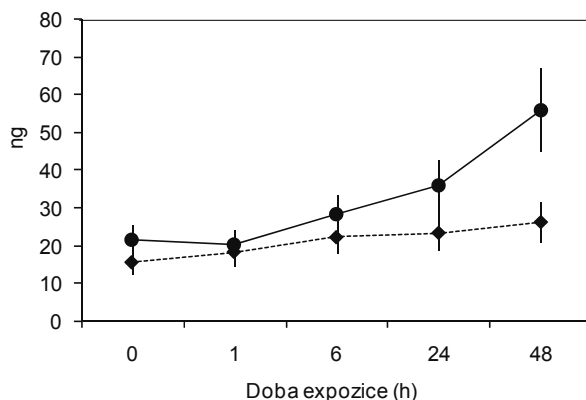
Identifikace a kvantifikace

Identifikace a kvantifikace (i) PAU a (ii) PCB a OCP v analyzovaných vzorcích byla provedena na plynovém chromatografu HP 6890 (Agilent Technologies, USA) na kapilární koloně DB-5MS (30 m × 0,25 mm, tloušťka filmu stacionární fáze 0,25 μm) od firmy J&W Scientific, USA, za následujících podmínek: (i) teplotní program pro PAU: 140 °C (2 min), 6 °C min⁻¹ do 300 °C (5 min); nosný plyn helium za konstantního průtoku 1 mL min⁻¹; teplota nástřiku 250 °C; objem nástřiku 1 μL v modu pulzní splitless – puls 345 kPa, splitless perioda 2 min a teplota GC/MS rozhraní 300 °C, teplota kvadrupólového analyzátoru 150 °C a teplota zdroje 230 °C; (ii) teplotní program pro OCP: 120 °C (2 min), 12 °C min⁻¹ do 300 °C (5 min); nosný plyn helium za konstantního průtoku 2 mL min⁻¹; teplota nástřiku 250 °C; objem nástřiku 1 μL v modu pulzní splitless – puls 345 kPa, splitless perioda 2 min a teplota GC/MS rozhraní 300 °C, teplota kvadrupólového analyzátoru 106 °C a teplota zdroje 150 °C, ionizační plyn methan (2,4·10⁻² Pa). Detekce všech sledovaných kontaminantů probíhala v módu SIM (selective ion monitoring).

Výsledky a diskuse

Semipermeabilní membránové zařízení (SPMD)

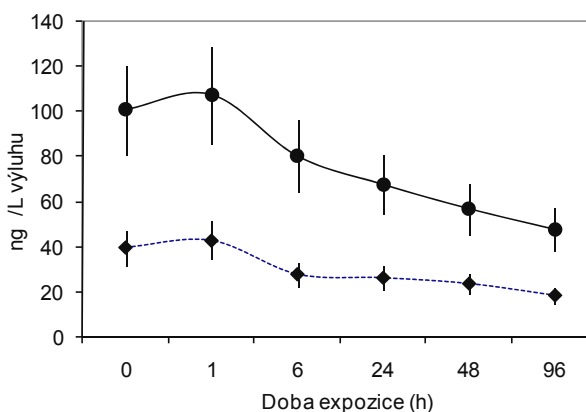
Jak již bylo v úvodu zmíněno, SPMD umožňují mimo jiné i sledování biodostupné frakce organických polutantů v porézních médiích, jako je půda. Vzorkování těchto matric pomocí SPMD přímo v terénu se s ohledem na malou mechanickou odolnost polyethylenových membrán a obtíž při dosahování standardních, či alespoň reprodukovatelných podmínek, ukázalo jako poněkud nepraktické. V úvahu bylo nutno vzít především fakt, že pohyb kontaminantů v porézním médiu je prostorově velice omezen. Přestup analytů do membrány proto poměrně rychle snižuje jeho koncentraci v okolí SPMD a rychlost vzorkování zřejmě již neomezují sama semipermeabilní membrána, ale daleko pomalejší difuze analytů porézním médiem do prostoru s taktó sníženou koncentrací. Předpoklady pro



Obr. 3. Suma indikátorových kongenerů PCB a suma DDT a jeho metabolitů DDD a DDE v membráně SPMD v závislosti na době vzorkování; ◆ suma PCB, ● suma DDT

difuzi analytů podle kinetiky reakcí 1. řádu (konstantní koncentrace analytu v médiu) tak nejsou splněny a uvažovat by se dalo spíše o rovnovážném způsobu vzorkování, který ovšem vyžaduje daleko delší doby expozice. Z výše uvedených důvodů bylo rozhodnuto, že vzorkování půdy bude realizováno v laboratorních podmínkách na základě vyšetření vodného výluhu z porézního média.

Na obr. 3 je uveden příklad dynamiky přestupu pro sumu indikátorových kongenerů PCB (č. 28, 52, 101, 118, 138, 153 a 180) a pro sumu isomerů DDT a jeho metabolitů DDD a DDE z vodného výluhu do SPMD. Vzrůst koncentrací analytů absorbovaných v SPMD (obr. 3) byl současně doprovázen jejich poklesem ve výluhu (obr. 4); v testovaném období však nebylo dosaženo rovnováhy. Přesto bylo množství sorbovaných analytů, resp. detekční limity za daných podmínek dostatečné. Jak ukázala hmotnostní bilance sledovaných analytů, do SPMD přešlo po



Obr. 4. Suma indikátorových kongenerů PCB a suma DDT a jeho metabolitů DDD a DDE ve výluhu v závislosti na době vzorkování; ◆ suma PCB, ● suma DDT

Tabulka I

Obsah nepolárních kontaminantů v disku (ng) – výsledky souběžně exponovaných vzorkovačů

| Varianta | QCB | HCB | lindan | Phe | Flt | Pyr |
|--------------------------|---------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| Doba vzorkování 14 dní | 0,2 | 0,6 | 1,7 | 55,9 | 14,4 | 12,5 |
| | 0,2 | 0,4 | 1,1 | 59,7 | 13,9 | 12,0 |
| | 0,3 | 0,6 | 2,0 | 64,1 | 14,6 | 12,7 |
| | <i>Průměr</i> | <i>0,2</i> | <i>0,6</i> | <i>1,6</i> | <i>59,9</i> | <i>14,3</i> |
| RSD (%) | 23,1 | 25,2 | 31,3 | 6,8 | 2,4 | 2,9 |
| Doba vzorkování 28 dní | 0,4 | 0,6 | 3,2 | 84,8 | 18,1 | 15,3 |
| | 0,4 | 0,7 | 2,5 | 87,8 | 22,1 | 17,0 |
| | 0,4 | 0,8 | 2,6 | 57,9 | 22,5 | 19,2 |
| | <i>Průměr</i> | <i>0,4</i> | <i>0,7</i> | <i>2,7</i> | <i>76,8</i> | <i>20,9</i> |
| RSD (%) | 12,5 | 15,6 | 13,0 | 21,4 | 11,7 | 11,2 |
| Slepý pokus – zpracování | < 0,2 | < 0,2 | < 0,5 | 35,6 | 4,9 | 4,7 |
| | < 0,2 | < 0,2 | < 0,5 | 30,4 | 3,5 | 3,7 |
| | < 0,2 | < 0,2 | < 0,5 | 20,7 | 2,3 | 2,0 |
| <i>Průměr</i> | – | – | – | 28,9 | 3,6 | 3,5 |
| RSD (%) | – | – | – | 26,2 | 37,5 | 39,5 |
| Slepý pokus – terénní | < 0,2 | < 0,2 | < 0,5 | 34,5 | 4,0 | 4,1 |

QCB – pentachlorbenzen; HCB – hexachlorbenzen; Phe – fenanthren; Flt – fluoranthen; Pyr – pyren; Slepý pokus terénní (field blank) – umožňuje zaznamenat případnou kontaminaci, která se vyskytne během převozu a manipulace se vzorkem v průběhu vzorkování; s těmito disky se zachází stejně jako se vzorky, nejsou však exponovány vzorkovanému médiu (po dobu expozice jsou uzavřeny a skladovány v chladu). Slepý pokus zpracování (fabrication blank) – umožňuje zaznamenat míru kontaminace, která pochází z použitých materiálů a zařízení. Tyto disky se po vložení do teflonového těla vzorkovacího zařízení skladují za stejných podmínek jako exponované disky, a to po celou dobu vzorkování a skladování exponovaných disků, až do doby zpracování příslušným analytickým postupem. Disky použité jako slepé pokusy se připravují stejným způsobem jako disky použité pro vzorkování vody.

96 h přibližně 50 % látek přítomných v původním výluhu. Obr. 3 dokumentuje, že rychlost nárůstu PCB byla v průběhu vzorkovacího intervalu relativně nízká; tato skutečnost může mimo jiné souviset se současně probíhající sorpcí molekul analytů na pevné částice výluhu, které v průběhu experimentu sedimentovaly.

U některých analytů (HCB, isomery HCH), které se ve vodném výluhu vyskytovaly ve stopových koncentracích, nebyl vzestup jejich koncentrací v membráně jednoznačně prokázán. Důvodem byl poněkud větší rozptyl výsledků v blízkosti mezí stanovitelnosti (vyjádřený jako relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti celého experimentu).

V dalších experimentech by bylo vhodné ověřit i vliv míchání výluhu při vzorkování na rychlost sekvence. Kromě prodloužení kontaktu pevných částic s membránou může ale proudění vzorkovaného média významně ovlivnit ztenčení hraniční vrstvy vody, která řídí difuzi analytů k membráně. Oba tyto efekty pak mohou rychlost přestupu analytů z výluhu zvyšovat. Přechodem ze statického na dynamický způsob pasivního vzorkování by se ovšem experimentální uspořádání ještě více vzdálilo od reality, kde uvnitř porézního média k žádnému výraznějšímu proudění vodné fáze prakticky nedochází. Pokud by koncentrace analytů v trioleinu nebyly dostatečné pro jejich kvantifi-

kaci, bylo by možné uvažovat o delší expozici a realizovat odběr až po dosažení rovnováhy. Tento přístup však dosud nebyl pro uzavřený systém v literatuře popsán, studie popisují pouze otevřený systém^{1,2,6}, kde obvykle během vzorkování nedochází ke změně koncentrace v prostředí způsobené přechodem analytu do SPMD, a změna koncentrací je v důsledku vzorkování ve vnějším prostředí zanedbatelná. U PAU se nepodařilo předpokládané závislosti dostatečně reprodukovatelně ověřit. Důvodem byly vysoké koncentrace PAU nacházené v neexponovaných SPMD membránách a současně nízké nálezy PAU ve vodných výluzích porézních médií. Odstranění PAU přítomných již v dodané membráně je prakticky nereálné (na rozdíl např. od extrakčních patron, které se používají při extrakci v Soxhletově aparatuře, kde lze hladinu PAU významně snížit předextrakcí vhodným organickým rozpouštědlem). Lze tedy říci, že pro vzorkování prostředí s relativně nízkými koncentracemi PAU není použití této membrány připravované v běžných laboratorních podmínkách příliš vhodné, a proto by bylo výhodnější použít spíše komerčně dostupné standardní membrány plněné v řízeném čistém prostředí (ve kterých na základě předchozích zkušeností při vzorkování říční vody koncentrace PAU ve slepém pokusu vždy vyhovovaly).

Chemcatcher

V tab. I jsou shrnuty nálezy vybraných OCP a PAU v discích C₁₈ Empore® použitých pro vzorkování vody na přítomnost nepolárních látek. Aplikace vzorkovacího zařízení Chemcatcher pro sledování zátěže vodního ekosystému polárnějšími látkami (simazin, atrazin a lindan) byla diskutována v již dříve publikované studii¹¹.

Účinnost vzorkování je charakterizována rychlostní konstantou vzorkování (R_S), která představuje objem vody, ze kterého je vzorkovačem odstraněn analyt za jednotku času. Hodnota konstanty není závislá na koncentraci dané látky ve vodě. Rychlostní konstanty byly měřeny v rámci kalibrace těchto pasivních vzorkovačů za podmínek simulujících vzorkování^{5,6}. Je ovšem nezbytné podotknout, že odhad koncentrace kontaminantů v říční vodě při použití dat získaných kalibrací za laboratorních podmínek je zatížen značnou nejistotou. Důvodem je proměnlivost podmínek během vzorkování v reálném prostředí (změna teploty vody, turbulence); důležitým faktorem je rovněž míra znečištění vzorkovacích zařízení biologickým nárůstem (biofouling).

Jak vyplývá z údajů uvedených v tab. I, koncentrace všech analytů rostly s dobou vzorkování. Nárůst sledovaných analytů mezi jednotlivými odběry po 14 a 28 dnech se pohyboval v rozmezí 17–100 %. Relativní směrodatná odchylka odhadnutá ze tří souběžných experimentů dosáhla maximálně 31 %.

Přepočet obsahů analytů v discích (ng/disk, viz tab. I) na jejich koncentrace ve vodě C_w (ng L⁻¹, viz tab. II) byl proveden podle následujícího vztahu:

$$C_w = (M_S - M_0)/(R_S \times t)$$

kde M_S je nalezené množství látky v disku (ng), M_0 je množství látky v disku před zahájením vzorkování (ng), R_S je rychlostní konstanta vzorkování (L/den) a t je doba vzorkování (dny). Rychlostní konstanty vzorkování použité pro výpočet jsou uvedeny v tab. II (cit.¹²). Tato tabulka zároveň shrnuje obsahy sledovaných látek zjištěné ve vodě v průběhu celého vzorkování. Pro obě vzorkovací doby (14 a 28 dní) byl vypočítán vážený průměr obsahů látek v říční vodě (T_{WA}).

$$T_{WA} = [\sum(c_i \times \Delta t_i)/\Delta t]$$

kde c_i je koncentrace látky ve vodě (ng L⁻¹), Δt_i je doba mezi dvěma po sobě následujícími vzorkováními (den) a Δt je celková doba vzorkování (dny). Koncentrace analytů ve vodě (C_w) zjištěné přepočtem pomocí jejich koncentrace v discích byly srovnatelné s průměrnými hladinami sledovaných kontaminantů v jednorázových odběrech, jak vyplývá z porovnání hodnot T_{WA} a C_w uvedených v tab. II. Jisté rozdíly mezi naměřenou a teoreticky vypočtenou hodnotou mohou být způsobeny kolísáním teploty či změnami rychlosti proudění vody během vzorkování; v neposlední řadě mohlo mít významný vliv i již zmiňované biologické znečištění vzorkovačů.

Schopnost Chemcatcheru vzorkovat pouze biologicky dostupnou frakci kontaminantů vyplývá z porovnání dat

Tabulka II

Obsah nepolárních látek v říční vodě odebírané a analyzované v průběhu pasivního vzorkování – filtrát (ng L⁻¹)

| Den vzorkování | Teplota vody [°C] | QCB | HCB | lindan | Phe | Flt | Pyr |
|-----------------------------|-------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| R_S (L/den) ¹² | – | 0,295 | 0,137 | 0,045 | 0,657 | 0,514 | 0,335 |
| 0 | 20,8 | < 0,1 | 0,1 | 1,1 | 7,1 | 1,9 | 2,6 |
| 1 | 20,1 | < 0,1 | 0,1 | 1,1 | 5,3 | 1,9 | 2,4 |
| 3 | 20,0 | < 0,1 | 0,1 | 0,9 | 5,4 | 1,9 | 2,5 |
| 7 | 19,1 | < 0,1 | 0,1 | 1,3 | 6,1 | 2,8 | 2,8 |
| 10 | 17,7 | < 0,1 | 0,1 | 1,3 | 5,9 | 2,3 | 2,1 |
| 14 | 19,4 | < 0,1 | 0,1 | 1,2 | 5,7 | 2,7 | 2,7 |
| T_{WA} (0–14. den) | – | < 0,1 | 0,1 | 1,2 | 5,8 | 2,5 | 2,6 |
| C_w (14) | – | 0,05 | 0,3 | 2,5 | 6,5 | 2,0 | 2,6 |
| 17 | 19,9 | < 0,1 | 0,1 | 1,5 | 5,5 | 2 | 1,6 |
| 21 | 15,2 | < 0,1 | 0,1 | 1,3 | 4,5 | 1,7 | 1,7 |
| 25 | 14,2 | < 0,1 | 0,1 | 1,2 | 6,1 | 1,6 | 2,1 |
| 28 | 14,4 | < 0,1 | 0,1 | 1,4 | 6,5 | 2 | 2 |
| T_{WA} (0–28. den) | – | < 0,1 | 0,1 | 1,3 | 5,7 | 2,1 | 2,2 |
| C_w (28) | – | 0,05 | 0,2 | 2,1 | 4,2 | 1,5 | 1,8 |

QCB, HCB, Phe, Flt, Pyr – viz Tab. I; R_S – rychlostní konstanta vzorkování (L/den); T_{WA} – vážený průměr obsahů analytů ve vodě (ng L⁻¹); C_w – obsah analytů ve vodě zjištěný přepočtem pomocí nálezů v discích (ng L⁻¹)

Tabulka III

Celkový obsah nepolárních kontaminantů v říční vodě – včetně pevných částic* (ng L⁻¹)

| Den vzorkování | Teplota vody [°C] | QCB | HCB | lindan | Phe | Flt | Pyr |
|-----------------------------------|-------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 20,8 | 0,1 | 0,2 | 1,3 | 32,6 | 12,2 | 9,1 |
| 1 | 20,1 | 0,1 | 0,2 | 1,2 | 26,4 | 9,2 | 6,4 |
| 3 | 20,0 | 0,1 | 0,3 | 1,7 | 83,9 | 18,4 | 12,6 |
| 7 | 19,1 | 0,1 | 0,2 | 1,6 | 28,3 | 11,4 | 7,3 |
| 10 | 17,7 | 0,1 | 0,3 | 2 | 113,2 | 15,7 | 9,7 |
| 14 | 19,4 | 0,1 | 0,4 | 1,9 | 80,8 | 17,5 | 12,7 |
| <i>T_{WA} (0–14. den)</i> | | <i>0,1</i> | <i>0,3</i> | <i>1,8</i> | <i>69,3</i> | <i>14,9</i> | <i>10,1</i> |
| 17 | 19,9 | 0,1 | 0,4 | 1,9 | 66,8 | 36,6 | 25,1 |
| 21 | 15,2 | 0,1 | 0,3 | 2,1 | 92,1 | 14,9 | 8,9 |
| 25 | 14,2 | 0,1 | 0,3 | 1,7 | 67,6 | 11,5 | 8,1 |
| 28 | 14,4 | 0,1 | 0,4 | 2 | 82,6 | 13,3 | 8,9 |
| <i>T_{WA} (0–28. den)</i> | | <i>0,1</i> | <i>0,3</i> | <i>1,8</i> | <i>73,5</i> | <i>16,6</i> | <i>11,1</i> |

QCB, HCB, Phe, Flt, Pyr – viz Tab. I; *T_{WA}* – vážený průměr obsahů analytů ve vodě (ng L⁻¹); * – velikost částic byla definovaná velikostí pórů použitého filtru – 0,7 μm

uvedených v tab. II a III. V tab. II je uveden obsah látek ve filtrátu říční vody, v tab. III pak celkový obsah látek ve vodě včetně podílu sorbovaného na pevné částice rozptýlené ve vodě vlivem proudění („plaveniny“). Rozdíl mezi hodnotami je patrný především u PAU, jejichž celkový obsah ve vodě byl až o jeden řád vyšší než obsah v biologicky dostupné frakci. Např. obsah fenanthrenu ve filtrátu (5,8 ng L⁻¹), který odpovídá obsahu vypočítanému z obsahu fenanthrenu z disku (6,5 ng L⁻¹), je přibližně 10krát nižší než hladina zjištěná ve vzorku vody obsahující pevné částice (69,3 ng L⁻¹). U sledovaných OCP není rozdíl mezi celkovým obsahem a dostupným podílem tak zřetelný, vzhledem k tomu, že se koncentrace těchto látek v říční vodě pohybovaly blízko meze stanovitelnosti.

Závěr

Možnost využití SPMD pro sledování zátěže životního prostředí organickými kontaminanty byla ověřena v laboratorních podmínkách modelovou studií zaměřenou na vzorkování vodních výluhů porézních médií. Pasivní vzorkování v uzavřeném systému s konstantním celkovým množstvím polutantu (a tedy snižováním jeho koncentrace ve vzorkovaném médiu) však vyžaduje modifikace běžně používaných postupů i jejich kvantitativní hodnocení. Lze předpokládat, že podmínky vzorkování porézních médií (zejména půdy) *in situ* se bude blížit spíše uzavřenému systému.

U vzorkovacího zařízení Chemcatcher byla ověřena jeho použitelnost pro vzorkování říčních vod. Odhadovaná střední koncentrace látek sledovaných ve vodě v průběhu až 28 dní odpovídala koncentraci vypočtené podle množ-

ství nalezeného v exponovaných vzorkovacích po odpovídající době expozice.

Pasivní vzorkovače jsou tedy slibným nástrojem pro monitorování stopových koncentrací biologicky dostupné frakce polutantů ve vodním prostředí i v půdách a posouzení trendu kontaminace v čase. Vzhledem k jednoduchosti konstrukce a použití, komerční dostupnosti pasivních vzorkovačů a reprodukovatelnosti podmínek vzorkování poskytují tyto techniky možnost studia transportních mechanismů organických látek v prostředí.

Tato studie byla realizována v rámci projektu COST 629 – Znečištění vod v přírodních porézních médiích různých měřítek, Zhodnocení vlivu povodní na agrární ekosystémy v ČR a dále projektu COST 636 – Nové analytické strategie pro identifikaci a kvantifikaci xenobiotik v městských odpadních vodách. Vývoj analytické strategie je součástí projektu MSM 6046137305.

LITERATURA

- Górecki T., Namiesnik J.: Trends Anal. Chem. 21, 276 (2002).
- Huckins J. N., Manuweera G. K., Petty J. D., Mackay D., Lebo J. A.: Environ. Sci. Technol. 27, 2489 (1993).
- Holoubek I., Houšková L., Šeda Z., Holoubková I., Kott F., Kořínek P., Boháček Z., Čáslavský J.: Toxicol. Environ. Chem. 29, 73 (1990).
- Huckins J. N., Petty J. D., Lebo J. A., Orazio C. E., Clark R. C., Gibson V. L.: *SPMD Technology Tutorial* (3. vydání). USGS, St. Joseph 2002.
- Vrana B., Mills G. A., Dominiak E., Greenwood R.:

- Environ. Pollut. 142, 333 (2006).
- Kingstone J.: *Disertační práce*. University of Portsmouth, Portsmouth 2002.
 - Stuer-Lauridsen F.: Environ. Pollut. 136, 503 (2005).
 - Vrana B., Mills G. A., Allan I. J., Dominiak E., Svensson K., Knutsson J., Morrison G., Greenwood R.: Trends Anal. Chem. 24, 845 (2005).
 - Pulkrabová J., Jánská M., Tomaniová M., Kocourek V., Hajšlová J.: Chem. Listy 99, 152 (2005).
 - Šetková L., Hajšlová J., Bergqvist P.-A., Kocourek V., Kazda R., Suchan P.: J. Chromatogr., A 1092, 170 (2005).
 - Hájková K., Kocourek V., Hajšlová J.: Chem. Listy 99, 139 (2005).
 - Vrana B., Greenwood R., Mills G.: *STAMPS – Barcelona Workshop, Barcelona, Španělsko, 30. 5. 2003*. str. 26.

J. Pulkrabová, M. Suchanová, J. Hajšlová, V. Kocourek, and M. Tomaniová (*Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Passive Sampling of Water and Porous Media for Monitoring of Organic Pollutants**

Passive sampling techniques have been increasingly used to evaluate pollution of various environmental compartments. In many studies, fish and other aquatic biota have been monitored to assess the bioavailable fraction of pollutants. This review discusses the potential of two types of passive sampling devices (SPMD and Chemcatcher), which may serve as an efficient tool for monitoring of environmental pollutants, such as organochlorine pesticides (OCP), polychlorinated biphenyls (PCB) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in river waters, sediments and soil. Purification of SPMD extracts was performed by gel permeation chromatography (GPC). For identification and quantification GC/MS was used. Passive sampling devices are suitable tools for routine monitoring of environmental pollution enabling the examination of environmental matrices without repeated sampling and analyzing high water volumes.

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v. i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6
vyhlašuje výběrové řízení
na pozici **vědecký pracovník**

se zaměřením na studium struktury polymerních materiálů a makromolekulárních systémů pomocí NMR spektroskopie vysokého rozlišení. Experimentální část pracovní náplně bude prováděna na špičkově vybavených NMR spektrometrech 600 MHz a 300 MHz. Nabízíme možnost zapojení do řešení zajímavých projektů a současně jsou vítány návrhy vlastních projektů v oblasti makromolekulárních věd. Požadujeme vysokoškolské vzdělání, fyzikální nebo chemické zaměření, dokončené Ph.D. nebo jeho ekvivalent. Praxe v oboru NMR spektroskopie je výhodou. Podrobnosti o náplni práce sdělí RNDr. Jiří Dybal, CSc., vedoucí oddělení strukturální analýzy, e-mail: dybal@imc.cas.cz. Příhlášky doplněné profesním životopisem a seznamem publikací zasílejte na adresu tumova@umch.cz; informace na tel. č. 296 809 385 (osobní odd.). Uzávěrka přihlášek: **20. února 2009**.

STANOVENÍ LAMOTRIGINU V SÉRU POMOCÍ ON-LINE SPOJENÍ KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZY A KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY

LUCIE BUDÁKOVÁ^{a,c}, HANA BROZMANOVÁ^a,
FRANTIŠEK KVASNIČKA^b a MILAN
GRUNDMANN^{a,c}

^a Ústav klinické farmakologie, Fakultní nemocnice Ostrava a Fakulta zdravotnických studií Ostravské Univerzity, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava, ^b Ústav konzervace potravin a technologie masa, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, ^c Farmakologický ústav lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc
lucie.budakova@fnspo.cz

Došlo 26.4.07, přepracováno 10.4.08, přijato 22.5.08.

Klíčová slova: lamotrigin, krevní sérum, elektromigrační metody, izotachoforéza, kapilární zónová elektroforéza

Úvod

Terapeutické monitorování léků (TDM) slouží ke kontrole účinků podaných léků a používá se hlavně tehdy, je-li měřitelnost účinku léku obtížná. Mezi monitorované léky patří především antiepileptika (AEP), které mají úzké terapeutické rozmezí a je u nich prokázána přímá závislost účinku na koncentraci v krvi^{1–3}. První AEP (fenobarbital, fenytoin) se objevila v klinické praxi v roce 1900. Stanovení jejich sérových koncentrací se stalo rutinní záležitostí okolo roku 1960 po zavedení vhodných analytických metod. U nás se začala AEP analyzovat později, zhruba od 80. let 20. století^{4–6}.

Během posledního desetiletí bylo uvedeno na trh několik nových AEP třetí generace, mezi něž patří i lamotrigin (LAM)⁷. LAM byl poprvé podán v Evropě v roce 1991 a v USA v roce 1994 (cit.⁸). LAM, 3,5-diamino-6-(2,3-dichlorofenyl)-1,2,4-triazin, je širokospektrální AEP, které se používá v monoterapii nebo v kombinacích s ostatními AEP. V době zavedení do klinické praxe se předpokládalo, že TDM nebude nutné, ale později se ukázalo, že LAM může ve vyšších koncentracích vyvolávat záchvaty podobně jako jiná AEP. Vzhledem k tomu, že některá AEP mohou ovlivňovat metabolismus LAM a snižovat jeho koncentraci v séru (např. fenytoin, karbamazepin, barbituráty) nebo naopak zvyšovat jeho koncentraci v séru (především kyselina valproová), je stanovení hladin jednotlivých AEP nutné a významně přispívá ke zlepšení léčby epilepsie⁹.

Na základě preklinických dat bylo navrženo terapeutické rozmezí 1–4 mg l⁻¹. Nicméně mnoho pacientů vyža-

duje na kompenzaci křečových stavů vyšší koncentrace. Nové terapeutické rozmezí 3–14 mg l⁻¹ navrhl Morris v roce 2000 na základě svých zkušeností s TDM epileptiků¹⁰.

Stanovení LAM v séru je popsáno různými autory. Nejvíce prací se týká chromatografických metod. Ke stanovení hladiny LAM byla použita metoda HPLC (cit.^{9,11–15}) i GC (cit.^{16–20}).

Z elektromigračních metod se ke stanovení LAM v biologických tekutinách použila micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)^{21,22}, kapilární elektrochromatografie (CEC)^{21–23} a kapilární zónová elektroforéza (CZE)²⁴.

V poslední době lze tedy sledovat nárůst publikací týkající se analýzy léků v biologickém materiálu, především v séru a moči^{21–36}. I když elektromigrační metody nacházejí uplatnění především v biochemii, v analýze životního prostředí a v analýze potravin, začínají se v poslední době používat i v TDM, to je v problematice, která ještě donedávna nebyla jejich typickou aplikační oblastí. Chromatografickým metodám mohou konkurovat rychlejší analýzou a jednodušší extrakcí vzorku při zachování stejné citlivosti.

Cílem práce bylo vypracovat podmínky pro separaci, identifikaci a kvantifikaci LAM v séru novou metodou on-line spojením kapilární izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy (ITP-CZE), validovat ji a výsledky reálných vzorků od pacientů porovnat s výsledky rutinně používané HPLC³⁷.

Experimentální část

Použité přístroje a zařízení pro ITP-CZE

Měření probíhalo na elektroforetickém analyzátoru EA 101 (Villa-Labeco, Spišská Nová Ves, SR) v dvoukolonovém uspořádání (předseparační teflonová kapilára 110 mm × 0,8 mm; analytická teflonová kapilára 90 × 0,3 mm) s UV detekcí při 254 nm. Použitý hnací proud byl v předseparační kapiláře 200 μA a v analytické 40 μA. Sběr dat a vyhodnocení výsledků bylo provedené počítačovým programem dodaným s analyzátozem EA 101. Analýzy se prováděly v kationtovém módu s přímým nástřikem vzorku (30 μl), při laboratorní teplotě a délka analýzy byla 20 min.

Chemikálie, roztoky a příprava elektrolytů

K přípravě elektrolytů a mobilní fáze byl použit acetonitril a methanol, (oba gradientové čistoty pro kapalinnou chromatografii, Merck, Darmstadt, Německo), voda Milli-Q kvality a voda pro HPLC, ε-aminokapronová kyselina, morfolinethansulfonová kyselina a triethylamin p.a (Aldrich, Buchs, Švýcarsko). Jako vnitřní standard při HPLC sloužila ethyl(*p*-tolyl)barbiturová kyselina (Aldrich, Buchs, Švýcarsko). Kyselina fosforečná p.a., dihydrofos-

forečnan sodný p.a. a diethylether byly výrobky Lachemy (Brno, ČR). Lamotrigin byl získán od firmy Glaxo Wellcome (Velká Británie). Sérum od neuzívajícího dárce bylo z transfúzního oddělení Fakultní nemocnice Ostrava (FNO) od zdravého dárce bez medikace. Séra pocházela od pacientů z neurologických oddělení a z neurologických ambulancí, která jsou rutinně měřena v Ústavu klinické farmakologie (ÚKF) FNO v rámci TDM antiepileptik

U ITP se používají dva základní elektrolyty, vedoucí (VE) a koncový (KE). VE u analýzy kationtů obsahuje kation s nejvyšší pohyblivostí z celé separované směsi, dále protiion opačného znaménka, který zajišťuje během analýzy definované pH. Naproti tomu koncový elektrolyt obsahuje ion, který má nižší pohyblivost než kterýkoliv ze separovaných iontů. Vzorek se vnáší mezi tyto dva elektrolyty. Po zapnutí stejnosměrného napětí se jednotlivé složky dělí podle svých pohyblivostí. CZE využívá separační kapiláru naplněnou základním elektrolytem, který má v celém systému stejné složení i koncentraci. Rozpuštěné složky disociují v závislosti na pH základního elektrolytu. Ionty jsou separované v důsledku rozdílných poměrů náboje ku hmotnosti. Nejprve migrují nejmenší kationty s největším nábojem, přičemž rychlost se snižuje se snižujícím se nábojem. Dále migrují neutrální látky a potom anionty s nejnižším nábojem, nakonec migrují malé a více nabitě anionty.

K přípravě elektrolytů se použila deionizovaná voda Milli-Q kvality. Vedoucí elektrolyt (VE) obsahoval 10 mM vodný roztok amoniaku, 20 mM morfolinethansulfonovou kyselinu a 10% vodný roztok methanolu; koncový elektrolyt (KE) pak 5 mM ε -aminokapronovou kyselinu, 5 mM morfolinethansulfonovou kyselinu a 15% vodný roztok methanolu a nosný elektrolyt 25 mM ε -aminokapronovou kyselinu, 25 mM morfolinethansulfonovou kyselinu, 0,1% (hydroxypropyl)methylcelulosu a 10% vodný roztok methanolu. (Hydroxypropyl)methylcelulosu jsme do elektrolytů přidali kvůli snížení náboje vnitřní stěny a zvýšení viskozity elektrolytu, což vede k zaostření rozhraní mezi zónami.

Příprava vzorků pro izotachoforetickou analýzu

K otestování vhodných podmínek pro analýzu ITP-ITP se vyzkoušely dvě přípravy vzorku. Prosté ředění séra s LAM (50 mg l^{-1}) nebo extrakce do diethyletheru. V prvním případě byl vzorek séra v množství 0,5 nebo 1 ml doplněn vodou Milli-Q kvality na 10 ml, ve druhém se provedla extrakce diethyletherem. K 200 μl séra s LAM (50 mg l^{-1}) se přidal 1 ml diethyletheru, obsah se míchal na laboratorním mixéru a centrifugoval po dobu 3 min při 4000 ot min^{-1} . Poté se odebrala horní etherová vrstva a ether se odpařil fénem. Odparek se rozpustil ve 200 μl vody a 20 μl se nadávkovalo mikrostříkačkou typu Hamilton do přístroje.

Pro systém ITP-CZE se vzorek připravoval ředěním. 100 μl séra s LAM (100 mg l^{-1}) se v odměrné baňce doplnilo na 10 ml deionizovanou vodou a vzorek se přímo

dávkoval do přístroje. Každý vzorek se analyzoval dvakrát.

Ze zásobního roztoku LAM v methanolu (o koncentraci 200 mg l^{-1}) se připravovaly vzorky pro validaci metody o různé koncentraci LAM tak, aby každý vzorek byl připraven v séru od neuzívajícího dárce. Linearita byla hodnocena 7 kalibračními body ($0,005\text{--}0,20 \text{ mg l}^{-1}$). Přesnost a správnost metody se zjistila opakovaným stanovením ($n = 6$) vzorku s třemi různými koncentracemi LAM ($0,01$; $0,07$ a $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ LAM v $100\times$ zředěném séru od neuzívajícího dárce), přičemž vzorky byly analyzovány v průběhu jednoho dne. U všech tří koncentrací se každý vzorek ($n = 6$) připravil úplným postupem.

Metoda kapalinové chromatografie

50 μl vzorku séra se pipetovalo do zkumavek s vnitřním standardem (ethyl-*p*-tolyl)barbiturová kyselina) a přidalo se 50 μl 1 mol l^{-1} hydrogenfosforečnanu sodného a 1 ml diethyletheru. Obsah zkumavek se míchal 30 s v laboratorním mixéru a zkumavky se centrifugovaly po dobu 3 min při 4000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci se odpipetovala horní etherová vrstva do zkumavek typu Eppendorf a ether se odpařil pod fénem. Odparek se rozpustil ve 200 μl vody pro HPLC a 20 μl methanolu a tím byl vzorek připraven pro chromatografickou analýzu. Každý vzorek se analyzoval dvakrát.

HPLC systém byl vybaven binární izokratickou pumpou P 1500, autosamplerem AS 1000 a detektorem UV 1000 s proměnlivou vlnovou délkou (Spectra System, USA). K vlastní analýze se použila chromatografická kolona SGX C18, $3 \times 150 \text{ mm}$ a velikost částic 5 μm (Tessek, Praha). Měření probíhalo při laboratorní teplotě, nastříkovaný objem byl 20 μl a doba analýzy 20 min. Mobilní fázi tvořila směs voda : acetonitril : methanol : triethylamin v poměru 72:23:5:0,1. Hodnota pH byla upravena 1 mol l^{-1} kyselinou fosforečnou na pH 7. Detekce se prováděla při 220 nm (cit.³⁷).

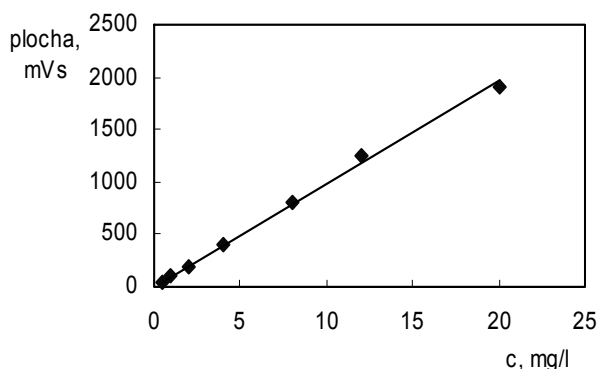
Výsledky a diskuse

Vývoj nové metody

Testovaly se vhodné podmínky pro stanovení LAM v séru metodou ITP-CZE s UV detekcí. Protože jde o bazické léčivo, měření probíhalo v kationtovém módu. Ověřovaly se jednak různé elektrolytové systémy a dvě elektromigrační metody (ITP-ITP a ITP-CZE). Ve spojení ITP-ITP s vodivostní a UV detekcí se používaly následující elektrolyty (VE 10 mM octan amonný, 10 mM octová kyselina, KE 5 mM octová kyselina). LAM se stanovil ve zředěném séru nebo se před analýzou extrahoval ze séra diethyletherem. Při analýze se ani v jednom systému neoděložil LAM od složek matrice (pravděpodobně u zředěného séra byla překročena i separační kapacita systému vlivem velkého množství sodíku).

Metoda ITP-CZE

Ze všech testovaných systémů byl prokazatelně nejlepší systém ITP-CZE s UV detekcí (254 nm) za použití následujících elektrolytů: VE (10 mM vodný roztok amoniaku, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% vodný roztok methanolu); KE (5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% vodný roztok methanolu) a nosného elektrolytu (25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% (hydroxypropyl)methylcelulosa, 10% vodný roztok methanolu). U vzorku séra s LAM zředěného demineralizovanou vodou byl LAM dostatečně oddělen od složek matrice. Pro rutinní použití je důležité, aby se metoda vyznačovala snadnou a rychlou přípravou a malou spotřebou vzorku a chemikálií. 100 μ l séra bylo v odměrné baňce doplněno na 10 ml deionizovanou vodou. Výhodou této přípravy je, že lze ještě snížit spotřeba vzorku až na 10 μ l séra tím, že se vzorek připraví do 1 ml deionizované vody a dává se do přístroje mikrostrůžkačkou typu Hamilton.



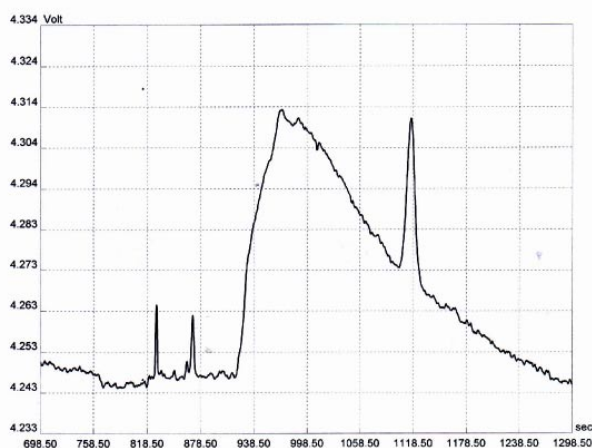
Obr. 1. Kalibrační křivka pro stanovení LAM v séru metodou ITP-CZE; VE 10 mM vodný amoniak, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% methanol; KE 5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% methanol a nosný elektrolyt 25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% hydroxypropylmethylcelulosa, 10% methanol. Hnací proud v předseparační kapiláře 200 mA a v analytické 40 mA; vodivostní detekce

Tabulka I

Přesnost a správnost metody ITP-CZE (n = 6)

| c(LAM) [mg l ⁻¹] | x | SD | VK [%] | R [%] |
|------------------------------|------|------|--------|-------|
| 1 | 1,09 | 0,11 | 9,88 | 109,1 |
| 7 | 7,55 | 0,38 | 4,99 | 107,8 |
| 20 | 22,7 | 1,38 | 6,11 | 113,4 |

c – koncentrace v mg l⁻¹, x – průměr, SD – směrodatná odchylka, VK – variační koeficient, R – výtěžnost

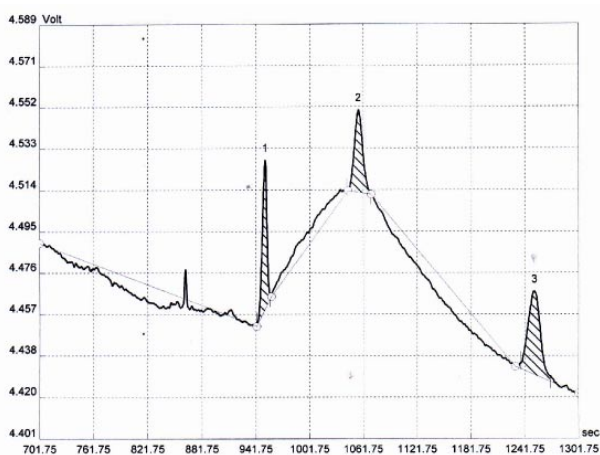


Obr. 2. Záznam analýzy séra od neuživajícího dárce metodou ITP-CZE s UV detekcí (254 nm); píky ze séra na záznamu neinterferují stanovení LAM v séru. VE 10 mM vodný amoniak, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% methanol; KE 5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% methanol a nosný elektrolyt 25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% hydroxypropylmethylcelulosa, 10% methanol. Hnací proud v předseparační kapiláře 200 mA a v analytické 40 mA; vodivostní detekce

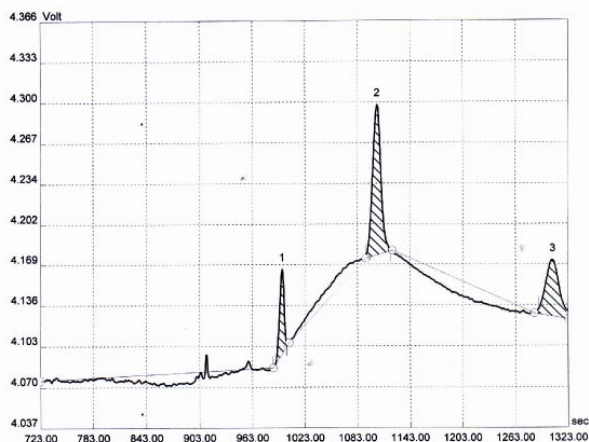
Validace metody ITP-CZE

Na základě sedmi bodové kalibrace bylo zjištěno, že koncentrační závislost je lineární v rozmezí 0–200 mg l⁻¹ (pro 100× zředěné sérum od neuživajícího dárce to představuje 0–20 mg l⁻¹), což zahrnuje terapeutické rozmezí LAM (3–14 mg l⁻¹). Regresní rovnice kalibrační křivky je $y = 98,598x$, přičemž y představuje plochu píku v mVs a x koncentraci v mg l⁻¹. Hodnota korelačního koeficientu ($r = 0,998$) je blízká hodnotě 1, což potvrzuje dobrou linearitu kalibrační závislosti. Kalibrační křivka LAM je na obr. 1.

U výsledků se vyhodnocoval průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (SD), relativní směrodatná odchylka vyjádřená v % jako variační koeficient (VK), který charakterizuje přesnost metody. Hodnota VK nepřekročila 10 %. Správnost metody byla vyjádřena jako výtěžnost R (%). Hodnota výtěžnosti byla v rozmezí 80–120 %. V tabulce I je uveden \bar{x} , SD, VK a průměr R.

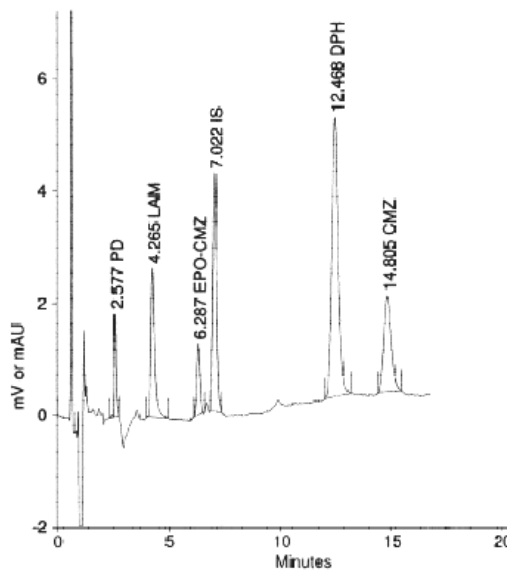


Obr. 3. Záznam analýzy séra metodou ITP-CZE s UV detekcí (254 nm); koncentrace LAM v séru $4,1 \text{ mg l}^{-1}$ (pík č. 2). VE 10 mM vodný amoniak, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% methanol; KE 5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% methanol a nosný elektrolyt 25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% hydroxypropylmethylcelulóza, 10% methanol. Hnací proud v předseparační kapiláře $200 \mu\text{A}$ a v analytické $40 \mu\text{A}$; vodivostní detekce

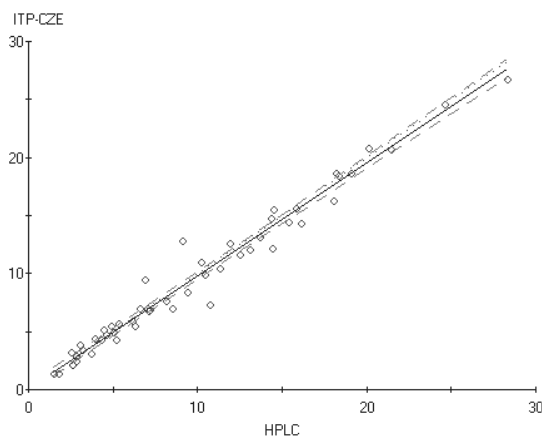


Obr. 4. Záznam analýzy séra metodou ITP-CZE s UV detekcí (254 nm); koncentrace LAM v séru $12,2 \text{ mg l}^{-1}$ (pík č. 2). VE 10 mM vodný amoniak, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% methanol; KE 5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% methanol a nosný elektrolyt 25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% hydroxypropylmethylcelulóza, 10% methanol. Hnací proud v předseparační kapiláře $200 \mu\text{A}$ a v analytické $40 \mu\text{A}$; vodivostní detekce

Limit detekce (LOD) byl na základě proměření nulové linie vypočten pomocí trojnásobné výšky šumu a z kalibrační křivky byla odečtena odpovídající koncent-



Obr. 5. Záznam analýzy séra s LAM ($5,1 \text{ mg l}^{-1}$) metodou HPLC s UV detekcí (220 nm); kolona Separon SGX C 18, 5 mm, ($3 \times 150 \text{ mm}$); UV detekce při 220 nm; mobilní fáze: acetonitril:metanol:voda:TEA 23:5:72:0,1 (v/v/v), pH 7,0; průtok mobilní fáze 1 ml min^{-1}



Obr. 6. Grafické znázornění korelace dvou metod (HPLC a ITP-CZE) podle regresní analýzy podle Passinga a Babloka

race. Limit kvantifikace (LOQ) byl vypočten pomocí desetinásobné výšky šumu. Hodnoty LOD a LOQ jsou $0,25$ a $0,83 \text{ mg l}^{-1}$.

Na obr. 2 je izotachoforeogram vzorku séra od neužívajícího dárce. Ze záznamu je zřejmé, že za daných pracovních podmínek neruší žádné jiné složky ze séra, což potvrzuje selektivitu metody.

Na obr. 3 a 4 jsou uvedeny izotachoforeogramy reálných vzorků (LAM 4,1 mg l⁻¹ a LAM 12,2 mg l⁻¹) a na obr. 5 je chromatogram séra s LAM o koncentraci 5,1 mg l⁻¹.

Srovnání metody ITP-CZE s metodou HPLC

Novou ITP-CZE metodou se proměřilo 50 reálných vzorků a výsledky se srovnaly s těmi, které byly získány rutinní HPLC metodou. Regresní analýza podle Passinga a Babloka ukázala, že 95% interval spolehlivosti pro směrnici se pohyboval v rozmezí 0,89–1,03, což potvrzuje, že odchylka směrnice od 1 je statisticky nevýznamná a 95% interval spolehlivosti pro úsek na ose Y byl –1,73 až +4,25, což potvrzuje, že úsek na ose Y je statisticky nevýznamný. Obě metody tedy poskytují v rámci zvolené pravděpodobnosti (95% hladina významnosti) shodné výsledky. Výsledný graf je na obr. 6.

Závěr

Cílem práce bylo zavést a validovat novou elektromiografickou metodu na stanovení LAM v séru, pro její případné rutinní použití v rámci TDM v ÚKF FNO. Po otestování systémů ITP-ITP a ITP-CZE a několika různých elektrolytů byla jako nejlepší vybrána metoda ITP-CZE s UV detekcí při 254 nm. Ve srovnání s HPLC je příprava vzorku u metody ITP-CZE jednodušší a rychlejší. Potřebné množství séra k analýze se dá snížit až na 10 µl, což je velmi významné zvláště pro TDM u dětí. Obě metody jsou přibližně stejně časově náročné. Výhodou ITP-CZE jsou výrazně nižší provozní náklady na analýzu ve srovnání s HPLC.

Metoda ITP-CZE vyhovuje všem validačním požadavkům, jako je přesnost, správnost, linearita a selektivita a má přijatelné LOD a LOQ. Metoda byla srovnána s původní HPLC metodou pomocí regresní analýzy podle Passinga a Babloka na základě proměření 50 reálných vzorků a zjistilo se, že mezi výsledky obou metod neexistuje statisticky významný rozdíl.

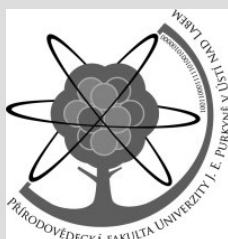
LITERATURA

- Gross A. S.: Br. J. Clin. Pharmacol. 46, 95 (1998).
- Johanessen S. I.: CNS Drugs. 7, 349 (1997).
- Eadie M. J.: Br. J. Clin. Pharmacol. 46, 185 (1998).
- Tomson T., Johanessen S. I.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 55, 697 (2000).
- Buchthal F., Svensmark O.: Epilepsia 1, 373 (1960).
- Grundmann M., Brozmanová H., Bobčíková P.: Ther. Drug Monit. 21, 451 (1999).
- Tomson T., Johanessen S. I.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 55, 697 (2000).
- Leach M. J., Lees G., Riddall D. R., v knize Levy R. H., Mattson R. H., Meldrum B. S. (ed.): *Antiepileptic Drugs*, 4. vydání, str. 861. Raven, New York 1995.
- Tsiropoulos I., Kristensen O., Klitgaard N. A.: Ther. Drug Monit. 22, 517 (2000).
- Morris R. G., Black A. B., Lam E., Westley I. S.: Ther. Drug Monit. 22, 656 (2000).
- Vidal E.: J. Chromatogr., B 736, 295 (1999).
- Beck O., Ohman I., Nordgren H. K.: Ther. Drug Monit. 28, 603 (2006).
- Cheng C. L., Chou C. H., Hu O. Y.: J. Chromatogr., B 817, 199 (2005).
- Croci D., Salmaggi A., Grazia U., Bernardi G.: Ther. Drug Monit. 23, 665 (2001).
- Matar K. M., Nicholls P. J., Bawazir S. A., Hassan M. I., Tekle A. J.: Pharm. Biomed. Anal. 17, 525 (1998).
- Watelle M., Demedts P., Franck F., Degn P. P., Wauters A., Neels H.: Ther. Drug Monit. 19, 460 (1997).
- Queiroz M. E., Silva S. M., Carvalho D., Lancas F. M.: J. Chromatogr. Sci. 40, 219 (2002).
- Wyszomirska E., Czerwinska K.: Acta Pol. Pharm. 56, 101 (1999).
- Hallbach J., Vogel H., Guder W. G.: Eur. J. Clin. Chem. Biochem. 35, 755 (1997).
- Dasgupta A., Hart A. P.: J. Chromatogr., B 23, 101 (1997).
- Lancas F. M., Sozza M. A., Queiroz M. E. C.: J. Anal. Toxicol. 27, 304 (2003).
- Kuldvee R., Thormann W.: Electrophoresis 22, 1345 (2001).
- Ivanova M., Piunti A., Marziali E., Komarova N., Raggi M. A., Kenndler E.: Electrophoresis 24, 992 (2003).
- Shihabi Z. K., Oles K. S.: J. Chromatogr., B 683, 119 (1996).
- Hartinger C. G., Schluga P., Galanski M.: Electrophoresis 24, 2038 (2003).
- Belin G. K., Krähenbühl S., Hauser P. C.: J. Chromatogr., B 847, 205 (2007).
- Lloyd D. K.: J. Chromatogr., A 735, 29 (1996).
- Theurillat R., Kuhn M., Thormann W.: J. Chromatogr., A 979, 353 (2002).
- Zinellu A., Carru C., Sotgia S.: Eur. J. Pharm. Sci. 24, 375 (2005).
- Siren H., Kuldvee R., Karla T., Ekstrom T., Riekkola M. L.: J. Chromatogr., A 1068, 89 (2005).
- Lai E. P. C., Feng S. Y.: J. Chromatogr., B 843, 94 (2006).
- Pacáková V., Coufal P., Štulík K., Gaš B.: Electrophoresis 24, 1883 (2003).
- Schmutz A., Thormann W.: Ther. Drug Monit. 15, 310 (1993).
- Caslavska J., Lienhard S., Thormann W.: J. Chromatogr. 638, 335 (1993).
- Ivanova M., Piunti A., Marziali E., Komarova N., Raggi M. A., Klendler E.: Electrophoresis 24, 992 (2003).
- Ölvecká E., Koníková M., Grobuschek N., Kaniánsky D., Stanislawski B.: J. Sep. Sci. 26, 693 (2003).
- Budáková L., Brozmanová H., Grundmann M., Fischer J.: J. Sep. Sci. 31, 1 (2008).

L. Budáková^{a,c}, H. Brozmanová^a, F. Kvasnička^b, and M. Grundmann^{a,c} (^a *Department of Clinical Pharmacology, University Hospital Ostrava and Faculty of Health Studies, University of Ostrava, Ostrava*, ^b *Department of Food Preservation and Meat Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^c *Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc*): **Determination of Lamotrigine by Isotachopheresis – Capillary Zone Electrophoresis**

The aim of this work was to develop and validate electrophoretic methods for the determination of a new antiepileptic, lamotrigine (LAM). We tested the conditions for analysis of LAM in blood serum by two capillary isota-

chophoreses (ITP-ITP) and by capillary isotachopheresis – capillary zone electrophoresis (ITP-CZE). Best results were obtained using the ITP-CZE method with UV detection at 254 nm. The latter method offers a simple and rapid procedure for the determination of LAM in blood serum. A low sample volume is highly convenient especially for the determination in children. The analysis takes some 20 min. The linearity of the method was proved in the range 0–20 mg LAM/l. The limits of detection and quantification were 0.25 and 0.83 mg LAM/l, respectively. The variation coefficients were below 10 % at three concentration levels (1, 7 and 20 mg l⁻¹). The method was compared with HPLC using the Passing-Bablok regression analysis; no significant differences were found.



Katedra chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem nabízí následující studijní obory:

- Bc. (délka studia 3 roky): Toxikologie a analýza škodlivin
- Bc. (3): Stavební chemie
- Bc. (3): Chemie pro dvouoborové studium
- Bc. (3): Chemie pro dvouoborové studium se zaměřením na vzdělávání
- NMgr. (2): Učitelství chemie pro 2. stupeň ZŠ

Více informací o katedře: www.sci.ujep.cz/chemistry

VYUŽITÍ VÍCEROZMĚRNÝCH STATISTICKÝCH METOD PRO SLEDOVÁNÍ JAKOSTNÍHO PROFILU KOMERČNÍ PŠENICE

IVAN ŠVEC^a, MARIE HRUŠKOVÁ^a a ONDŘEJ
JIRSA^b

^a Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Zemědělský výzkumný ústav, Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž
ivan.svec@vscht.cz

Došlo 7.11.07, přepracováno 12.5.08, přijato 29.5.08.

Klíčová slova: komerční pšenice, odrůdová skladba, technologická kvalita, modelování jakosti

Úvod

V České republice je zaveden systém klasifikace odrůd pšenice do čtyř jakostních tříd (E – elitní, A – kvalitní, B – chlebové a C – ostatní), do něhož jsou odrůdy zařazovány podle výsledků tříletých pěstitelských pokusů, vedených ze zákona Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským Brno. Každoročně tento ústav vydává publikaci Seznam doporučených odrůd/Přehled odrůd, která má pěstitelům usnadnit výběr kultivarů pšenice s ohledem na komerční využití komodity¹.

Technologická jakost potravinářské pšenice je obecně ovlivňována čtyřmi faktory – odrůdou pšenice, lokalitou pěstování, agrotechnickým postupem a klimatem během daného ročníku sklizně^{2–4}. Pěstitel, usilující o co nejvyšší zhodnocení vypěstované komodity, přizpůsobuje volbu pěstovaných odrůd vlastním zkušenostem z předchozích let a znalostem místních podmínek. Je pochopitelné, že osivo odrůd z vyšších jakostních tříd znamená vyšší vstupní investici a také zpravidla vyšší pěstitelskou náročnost. Tyto podmínky spoluutvářejí konečný jakostní profil komerční pšenice daného prvovýrobce^{5,6}. Ve výkupních podnicích jsou pak dodávky od okruhu prvovýrobců míchány podle několika jakostních parametrů (např. obsah a kvalita bílkovin), aby se uspokojily požadavky odběratele (mlýna) na mlynářskou jakost.

V tomto řetězci prvovýroba – výkup – mlýn není možné z rozboru jakosti vzorku komerční pšenice zpětně identifikovat konkrétní odrůdu, ale z dodávek do jednoho mlýna lze kvalifikovaně odhadnout jakostní profil pěstované pšenice alespoň regionálně. Také je možné statisticky vyhodnotit vliv ročníku sklizně a lokality pěstování na technologickou kvalitu potravinářské pšenice.

Experimentální část

Byly zpracovány dva soubory potravinářských pšeníc, pěstovaných v rámci Středočeského kraje v letech 2003 až 2006. První zahrnoval komerční pšenice v celkovém počtu 80 vzorků, pěstovaných ve třech lokalitách středních Čech – západní (A*), jihozápadní (B*) a východní (C*). Do druhého souboru s 30 vzorky byly začleněny čtyři odrůdy pšenice, zařazené do jakostních tříd E (kultivar Sulamit), A (Alana), B (Vlasta) a C (Contra) podle v současnosti platného systému klasifikace odrůd pšenice¹. Soubor odrůd byl využit ke sledování jakostního profilu komerční pšenice z výše uvedených lokalit Středočeského kraje.

Na všechny uvedené vzorky byl aplikován komplexní rozbor kvality potravinářské pšenice dle interní metodiky cereální laboratoře VŠCHT Praha⁷. Kvalita byla popsána 39 znaky, od vlastností a jakosti zrna a mouky přes parametry fermentovaného těsta po charakteristiky pečiva a střídy. Tab. I shrnuje všech 39 uvedených znaků, které byly použity pro statistické hodnocení vlivu ročníku a lokality pěstování a také pro odhad odrůdového profilu komerční pšenice. Z technologického pohledu lze tyto znaky rozdělit do skupin mlynářské a pekařské jakosti.

Mlynářská jakost vzorků

Pod mlynářskou jakost potravinářské pšenice bývají zahrnovány vlastnosti zrna, analytické znaky zrna a mouky, charakteristiky laboratorního zámelu a charakteristiky reologického chování nefermentovaného těsta. Zrno bylo popsáno objemovou hmotností (ČSN 46 10 11-5, cit.⁸), hmotností tisíce zrn (interní postup) a analytickými parametry obsah minerálních látek (popela) a mokrého lepku a bílkovin (ČSN 56 05 12, cit.⁹). Byla charakterizována také amylolytická aktivita (číslo poklesu, ČSN ISO 30 93, cit.¹⁰). Proces mletí byl popsán výtěžnostmi jednotlivých mlýnských frakcí, získaných na laboratorním mlýně CD1 AutoMill (Chopin, Francie) a rovněž byla posouzena efektivita mletí. Sledované analytické znaky mouky se shodují s charakteristikami zrna. V případech analýzy pšenice i mouky byl pro stanovení použit infračervený spektrofotometr Inframatic 8620 švédské firmy Perten Instruments s kalibrací pro pšeničnou mouku hladkou (ČSN 56 05 12, cit.^{9,11}). Číslo poklesu bylo stanoveno pomocí přístroje Falling Number od téže firmy, v případě mouky byla dále specifikována kvalita bílkovin dle Zeleňho (ČSN ISO 55 29, cit.¹²) pomocí přístroje Sedi-tester (ZZN Strakonice, ČR).

Viskoelastické vlastnosti těst byly zjištěny dle ČSN ISO 55 30-4 (cit.¹³) na přístroji Alveograf (Chopin, Francie). Chování těsta během deformace je obvykle popsáno pružností, tažností, jejich poměrem a energií hodnocenou jako plocha pod křivkou. Tyto vlastnosti je možno predikovat také pomocí analýzy NIR spekter mouky¹¹.

Tabulka I
Jakostní parametry komplexního rozboru pšenice

| Krok rozboru ^a | Znak č. | Parametr | Krok rozboru ^a | Znak č. | Parametr |
|---------------------------|---------|---------------------------|---------------------------|---------|--------------------------------|
| A | 1 | objemová hmotnost | C | 21 | alveografický poměr |
| A | 2 | hmotnost tisíce zrn | C | 22 | alveografická energie |
| A | 3 | tvrdost | D | 23 | fermentografický objem těsta |
| A | 4 | popel | D | 24 | doba fermentace |
| A | 5 | mokrý lepek zrna | D | 25 | objem plynů |
| A | 6 | bílkoviny zrna | E | 26 | doba dokynutí |
| A | 7 | číslo poklesu zrna | E | 27 | maturografický odpor těsta |
| B | 8 | výtěžnost krupic | E | 28 | maturografická pružnost těsta |
| B | 9 | luštitelnost krupic | E | 29 | stabilita kynutí |
| B | 10 | výtěžnost mouk | F | 30 | objem těsta |
| B | 11 | výtěžnost Mohse | F | 31 | objem vzorku |
| B | 12 | výtěžnost šrotových mouk | F | 32 | objem pečiva |
| B | 13 | výtěžnost vymílacích mouk | F | 33 | nárůst při zapékání |
| C | 14 | popel | G | 34 | vaznost mouky – pekařský pokus |
| C | 15 | mokrý lepek | G | 35 | měrný objem pečiva |
| C | 16 | bílkoviny | G | 36 | tvár pečiva (výška/průměr) |
| C | 17 | Zelenyho test | G | 37 | senzorické hodnocení pečiva |
| C | 18 | číslo poklesu | G | 38 | penetrace střídy pečiva |
| C | 19 | alveografická pružnost | G | 39 | plocha řezu pečivem |
| C | 20 | alveografická tažnost | – | --- | |

^a A – znaky zrna; B – znaky mlecího pokusu; C – znaky mouky; D, E, F – znaky těsta v I., II., III. fázi fermentace; G – znaky pekařského pokusu)

Pekařská jakost vzorků

V laboratorních podmínkách je proces kynutí sledován adekvátně třem technologickým fázím – zrání, kynutí a zapékání. První fáze je v cereální laboratoři VŠCHT Praha sledována na Fermentografu (SJA, Švédsko), druhá na Maturografu a třetí na OTG (Oventriebgerät) přístroji (oba Brabender, SRN) dle interních metodik. Během I., II. a III. fáze fermentace jsou sledovány jak objemové změny testovaného vzorku těsta, tak časové intervaly související s těmito změnami, např. dosažení objemového maxima těsta (doba fermentace – fermentograf, doba dokynutí, stabilita kynutí – maturograf). Měření na uvedených reologických přístrojích bylo doplněno přímým testem pekařské kvality potravinářské pšenice – pekařským pokusem. Finální pokusný pekařský výrobek byl hodnocen měrným objemem, plochou řezu pečivem, poměrovým číslem výška/průměr, devítibodovou senzoricou analýzou a penetrací pečiva jako kritérii spotřebitelské kvality pečiva.

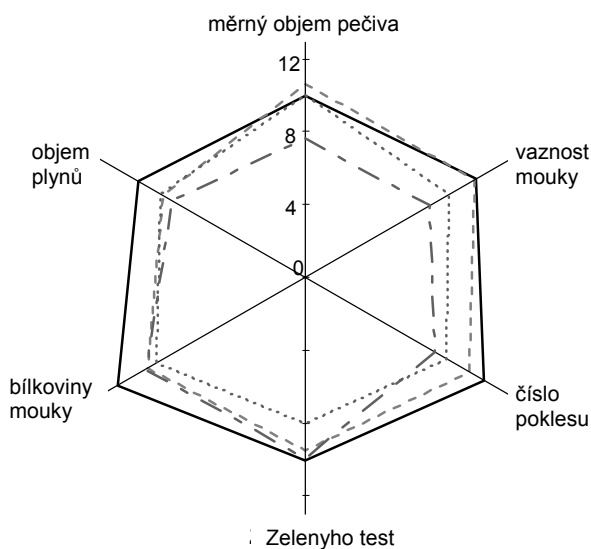
Fermentovaná těsta jsou připravována na konstantní konzistenci pomocí Farinografu (Brabender, SRN). Pro I. fázi fermentace je obsah soli v těstě o 1,0 % nižší ve srovnání s těsty pro II. a III. fázi i pekařský pokus.

Výsledky a diskuse

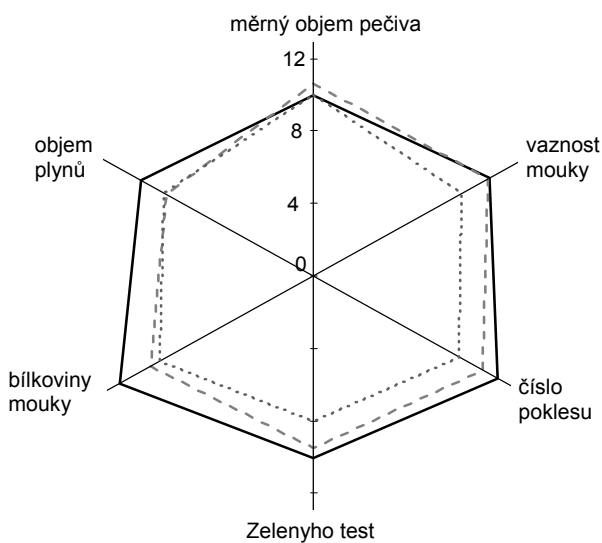
Technologická kvalita pšenice

K názornému porovnání technologické kvality mezi soubory odrůd a komerční pšenice byly použity paprskové grafy (obr. 1a, resp. 1b), konstruované ze šesti významných ukazatelů kvality (obsah bílkovin, Zelenyho test, alveografická energie, objem plynů, odpor těsta a měrný objem pečiva). Volba těchto parametrů je založena na komplexním rozboru technologické kvality potravinářské pšenice tak, aby bylo vystiženo chování v celém pekárenském výrobním procesu. Pro rozdílnost měřítek a jednotek jednotlivých znaků byla použita Z-transformace dat (cit. ¹⁴). Transformované hodnoty jsou proto uvedeny v uzančných jednotkách [u] a plochy datových křivek pak v uzančných čtverečných jednotkách [u²].

V tomto grafickém porovnání je zřejmé, že se kvalita vzorků komerční pšenice ze všech tří lokalit A*, B* a C* (obr. 1b) v průměru ročníků 2003 až 2006 pohybovala na rozhraní jakostních tříd E a A (obr. 1a, křivky 1, 2). Kvantifikace datových ploch, uvedená v tab. II, převahu odrůd



Obr. 1a. **Technologická kvalita odrůd pšenice;** — Sulamit (E), --- Alana (A), Vlasta (B), -.-.- Contra (C)



Obr. 1b. **Technologická kvalita komerční pšenice;** lokalita — A*, --- B*, C*

z těchto dvou tříd potvrzuje a naznačuje, že v lokalitě B* byl podíl odrůd třídy E nejnižší.

Statistická analýza vlivu ročníku sklizně a lokality pěstování

Kvalita sledovaných vzorků se významně odlišovala jak mezi odrůdovými, tak mezi komerčními vzorky pšenice. Proto se v rámci všech 110 zahrnutých vzorků směro-

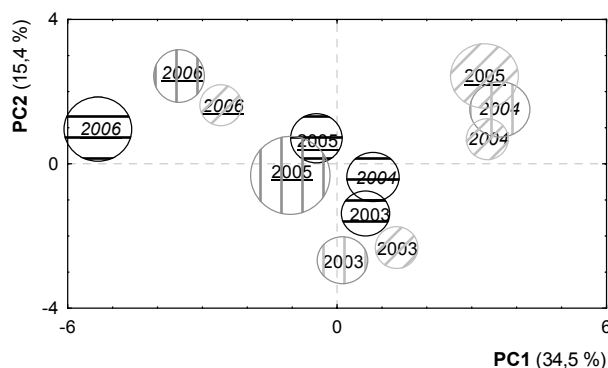
Tabulka II
Plochy paprskových grafů

| Vzorek | | Plocha [u ²] |
|----------------|-------------|--------------------------|
| Odrůda (třída) | Sulamit (E) | 50,3 |
| | Alana (A) | 37,7 |
| | Vlasta (B) | 25,9 |
| | Contra (C) | 19,2 |
| Lokalita | A* | 52,7 |
| | B* | 40,0 |
| | C* | 47,0 |

datné odchylky jednotlivých parametrů pohybovaly od 0,046 (tvar pečiva) do 90,298 (maturografický odpor těsta). Vliv ročníku sklizně a lokality pěstování a jejich interakce byly nejprve hodnoceny analýzou rozptylu (tab. III). Hodnoty F-testu naznačují rozdílnou míru závislosti jakostních charakteristik jak na ročníku sklizně, tak na lokalitě pěstování. Ročník sklizně průkazně neovlivnil ($P > 0,05$) pouze tvrdost zrna, fermentografický objem těsta a stabilitu kynutí, zatímco na lokalitě nezáviselo celkem deset jakostních charakteristik.

Porovnání intenzity obou vlivů v souboru komerčně pěstované pšenice bylo provedeno metodou hlavních komponent (PCA) z korelační matice zjištěných kvalitativních charakteristik mlynářské a pekařské jakosti v programu Statistica (StatSoft, USA, verze 7.1). Seznam použitých znaků je uveden v tab. I. První tři komponenty (PC1 až PC3) vysvětlily 62 % proměnlivosti – první 35, druhá 15 a třetí 12 %. Celková míra vysvětlení je srovnatelná s hodnotou uvedenou v práci¹⁵, která byla zaměřena na hodnocení vlivu odrůdy pšenice a podmínek přípravy těsta. První tři hlavní komponenty vystihly v tomto případě 67 % proměnlivosti vstupních dat.

Z grafu komponentního skóre v rovině PC1×PC2 (obr. 2) vyplývá jednoznačně silnější vliv ročníku sklizně

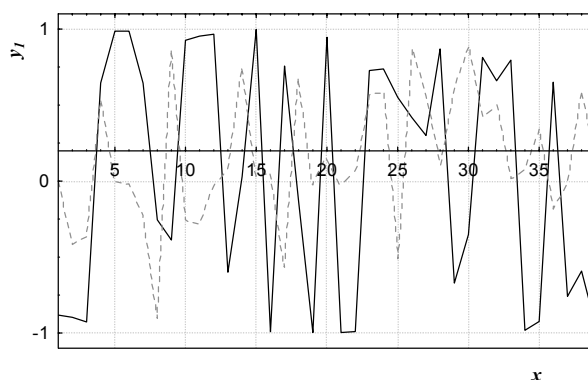


Obr. 2. **Graf komponentních skóre pro lokality pěstování komerční pšenice;** ⊕ lokalita A*, ⊖ lokalita B*, ○ lokalita C* a ročníky sklizně 2003, 2004, 2005, 2006

Tabulka III

Významné hodnoty F-testu ($P > 0,05$) pro vliv ročníku (R) a lokality (L) na technologickou jakost potravinářské pšenice

| Parametr | R | L | R*L |
|-------------------------------|-------|------|------|
| Objemová hmotnost | 20,3 | --- | 6,7 |
| Hmotnost tisíce zrn | 9,0 | 68,7 | 4,7 |
| Tvrdość zrna | --- | 5,5 | --- |
| Popel zrna | 23,2 | 47,7 | 4,7 |
| Mokrý lepek zrna | 17,0 | 16,6 | 4,6 |
| Bílkoviny zrna | 17,6 | 16,7 | 3,7 |
| Číslo poklesu zrna | 9,8 | 7,0 | 13,4 |
| Výtěžnost krupic | 41,2 | 58,7 | 12,2 |
| Luštitelnost krupic | 165,9 | 7,5 | 12,0 |
| Výtěžnost mouk | 14,1 | 41,9 | 6,9 |
| Výtěžnost Mohse | 55,3 | 28,1 | --- |
| Výtěžnost šrotových mouk | 12,5 | 10,3 | 2,9 |
| Výtěžnost vymilacích mouk | 8,7 | 47,5 | 6,1 |
| Popel mouky | 649,4 | 66,5 | 25,3 |
| Mokrý lepek mouky | 28,7 | 9,1 | 3,6 |
| Bílkoviny mouky | 37,2 | 3,2 | 3,2 |
| Číslo poklesu mouky | 15,3 | --- | 7,0 |
| Zelenyho test | 13,8 | --- | --- |
| Alveografická pružnost | 11,8 | --- | 3,9 |
| Alveografická tažnost | 56,4 | 6,3 | --- |
| Alveografický poměr | 21,2 | 5,4 | 9,9 |
| Alveografická energie | 35,4 | --- | --- |
| Fermentografický objem těsta | --- | 17,4 | 5,4 |
| Doba fermentace | 6,9 | --- | 4,8 |
| Objem plynů | 3,2 | 32,6 | 6,7 |
| Doba dokynutí | 23,7 | 6,8 | 7,7 |
| Maturografický odpor těsta | 21,0 | 25,4 | --- |
| Maturografická pružnost těsta | 3,4 | 27,4 | --- |
| Stabilita kynutí | --- | --- | --- |
| Objem těsta | 22,1 | 4,1 | --- |
| Objem vzorku | 20,0 | --- | 11,2 |
| Objem pečiva | 13,2 | --- | 13,4 |
| Nárůst při zapékání | 3,3 | --- | 11,0 |
| Vaznost mouky | 3,9 | 7,3 | 6,2 |
| Měrný objem pečiva | 9,8 | 4,8 | 7,6 |
| Tvar pečiva | 9,1 | 13,5 | 3,6 |
| Senzorické hodnocení | 2,8 | 18,7 | --- |
| Penetrace střídy | 3,8 | 13,2 | 15,5 |
| Plocha řezu pečivem | 7,2 | 14,1 | 19,4 |



Obr. 3. Graf komponentních zátěží; x – pořadové číslo proměnné, y_1 – komponentní zátěž, — PC1, - - - PC2

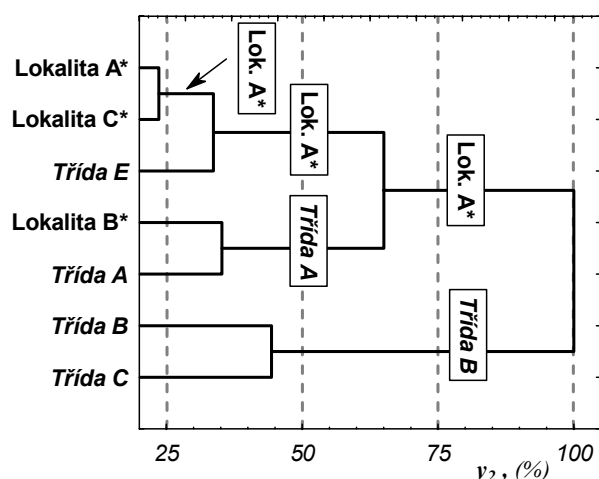
v případě let 2003 a 2006. V ročnících 2004 a 2005 se v tomto souboru uplatnil vliv lokality B*. Podle komponentních zátěží vystihla komponenta PC1 více mlynářskou a druhá více pekařskou kvalitu vzorků komerční pšenice. Graf zátěží (obr. 3) dokládá uspokojivé vysvětlení (zátěž vyšší než 0,80) celkem 18 jakostních parametrů PC1, resp. 4 znaků PC2. Toto naznačuje silné korelace mezi více než polovinou proměnných v souboru 80 vzorků komerční pšenice.

Podrobnější analýza pomocí Tukeyova testu (ANOVA) v tab. III dokazuje celkovou odlišnost technologické kvality komerční pšenice vlivem jednotlivých ročníků sklizně. Podle PC1 byla kvalita potravinářské pšenice nejprůkazněji odlišná v ročníku 2006, kdy bylo hodnocení mlynářské jakosti nejvyšší. Pekařská kvalita byla závislá na ročníku sklizně silněji – v tab. III se v případě ročníku sklizně a PC2 ročník 2004 vyskytuje jak v první, tak druhé homogenní skupině.

Analýza rozptylu vlivu lokality pěstování (tab. III) prokázala statistický rozdíl kvality podle PC1 mezi komerční pšenicí pěstované v lokalitě B* – mlynářská kvalita těchto vzorků byla nejnižší. Ačkoli dle PC2 nebyl rozdíl mezi lokalitou B* a dvojicí A* a C* statisticky významný ($P > 0,05$), záporná hodnota PC2 demonstruje i nižší pekařskou kvalitu v regionu B*.

Odhad jakostního profilu komerční pšenice ve vybraných lokalitách

Identifikace statisticky významné podobnosti ($P > 0,05$) mezi technologickou jakostí komerční pšenice a odrůdami reprezentujícími platné jakostní třídy byla provedena hierarchickou shlukovou analýzou všech 39 jakostních znaků (obr. 4) také v programu Statistica. V dendrogramu lze rozlišit tři základní shluky – vzorky lokalita A*, lokalita C* a třída E v prvním, lokalita B* a třída A ve druhém a třídy B a C ve třetím shluku. Z obr. 4 lze současně odhadnout nejvyšší kvalitu komerční



Obr. 4. Shluková analýza jakostního profilu komerční pšenice pro lokality A*, B*, C*; y_2 – statistická nepodobnost

Tabulka IV
Analýza rozptylu vlivu ročníku sklizně a lokality pěstování

| Ročník | PC1 | 1 | 2 |
|----------|--------|------|------|
| 2006 | -1,370 | | **** |
| 2003 | 0,197 | **** | |
| 2005 | 0,282 | **** | |
| 2004 | 0,891 | **** | |
| Ročník | PC2 | 1 | 2 |
| 2005 | -0,814 | **** | |
| 2006 | -0,505 | **** | |
| 2004 | -0,101 | **** | **** |
| 2003 | 1,420 | | **** |
| Lokalita | PC1 | 1 | 2 |
| A* | -0,380 | **** | |
| C* | -0,089 | **** | |
| B* | 0,469 | | **** |
| Lokalita | PC2 | 1 | |
| B* | -0,164 | **** | |
| C* | 0,050 | **** | |
| A* | 0,114 | **** | |

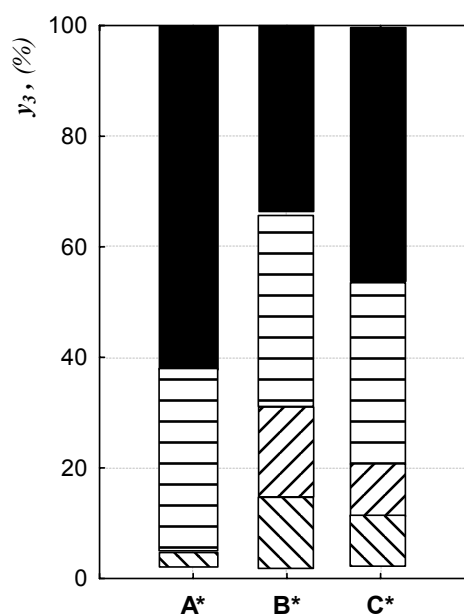
pšenice v lokalitě A*, neboť absolutní nepodobnost byla nalezena mezi kvalitou pšenice v této lokalitě a třídou B (odrůda Vlasta).

Pro první shluk byly charakteristické nejnižší hodnoty objemové hmotnosti, hmotnosti tisíce zrn a tvrdosti, naopak hodnoty znaků mlecího pokusu (B8 až B13, tab. I) byly nejvyšší. Obsahy mokrého lepku a bílkovin byly pro členy tohoto shluku nejvyšší, stejně jako číslo poklesu. Kvalita bílkovin byla podle Zeleného testu (C17) ve všech

třech shlucích srovnatelná, ovšem podle alveografické energie (C22) byla kvalita členů prvního shluku nejnižší. Výsledky fermentografického testu (znaky D23-D25) byly v prvním shluku nejlepší, ve druhé fázi fermentace měly vzorky lokalita A*, lokalita C* a třída E nejvyšší maturografickou pružnost těsta. Nejlepší chování fermentovaného těsta během zapékání (III. fáze fermentace) bylo pro tyto tři vzorky zjištěno v parametrech F30 a F31. Pečivo dosáhlo v průměru prvního shluku nejnižšího měrného objemu a také plochy řezu, zatímco penetrace střídy byla mezi shluky srovnatelná.

Naproti tomu v lokalitě B* byla zjištěna více než 60 % shoda v kvalitě vzorků komerční pšenice s vlastnostmi odrůdy Alana z jakostní třídy A. Vlastnosti shluku byly ve většině znaků průměrné, nejvyšší hodnoty byly zjištěny pouze pro maturografický odpor těsta, objem těsta a nárůst při zapékání (E27, F32 a F33). Nejnižší hodnoty byly naopak pozorovány pro číslo poklesu zrna i mouky (A7, C18) a penetraci střídy pečiva (G38).

Třetí primární shluk zahrnul případy Třída B a Třída C (odrůdy Vlasta a Contra). Vzdálenost mezi těmito odrůdami a komerční pšenicí byla v jednotlivých regionech Středočeského kraje rozdílná (tab. V) – k lokalitě A* byla maximální (vzdálenosti 257 a 252), k lokalitě B* naopak nejmenší (vzdálenosti 179 a 194). Vzdálenost lokality C* k odrůdám Vlasta (B) a Contra (C) byla proti ostatním lokalitám přibližně poloviční (15 a 14). Vzorky odrůd Vlasta (B) a Contra (C) vyznačovaly nejvyššími hodnotami objemové hmotnosti, hmotnosti tisíce zrn i tvrdosti zrna. Mlynářská kvalita byla v průměrech shluků nejhorší, nejprůkazněji v parametru výtěžnost podle Moh-



Obr. 5. Kvantifikace jakostního profilu komerční pšenice ve sledovaných lokalitách; y_3 – odhad podílu jakostní třídy, ■ třída E, ▨ třída A, ▩ třída B, ▧ třída C

Tabulka V

Euklidovské vzdálenosti – porovnání kvality komerční pšenice a odrůd

| Vzorek | Lokalita A* | Lokalita B* | Lokalita C* | Třída E | Třída A | Třída B | Třída C |
|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|---------|---------|---------|
| Lokalita A* | 0 | 107 | 61 | 87 | 167 | 257 | 252 |
| Lokalita B* | 107 | 0 | 80 | 95 | 91 | 179 | 194 |
| Lokalita C* | 61 | 80 | 0 | 78 | 129 | 219 | 221 |
| Třída E | 87 | 95 | 78 | 0 | 117 | 206 | 218 |
| Třída A | 167 | 91 | 129 | 117 | 0 | 102 | 134 |
| Třída B | 257 | 179 | 219 | 206 | 102 | 0 | 114 |
| Třída C | 252 | 194 | 221 | 218 | 134 | 114 | 0 |

se (B11). Vlastnosti nefermentovaného i fermentovaného těsta z odrůd tříd B a C byly v porovnání s ostatními shluky nejhorší i přes průkazné snížení průměrné technologické kvality v prvním a druhém shluku připojením komerční pšenice k odrůdovým vzorkům. Naproti tomu průměrný měrný objem pečiva byl mezi shluky nejvyšší, podobně jako plocha řezu pečivem (G39).

Z matice Euklidovských vzdáleností shlukové analýzy (tab. V) byl vytvořen sloupcový graf s procentními příspěvky jednotlivých jakostních tříd na celkový kvalitativní profil komerční pšenice ve všech třech sledovaných lokalitách (obr. 5). Rozdílly byly zjištěny zejména mezi podíly odrůd ze dvou nejvyšších jakostních tříd E a A. Pro lokalitu A* z tohoto kvalifikovaného odhadu vyplývá, že v ročnicích 2003 až 2006 byly pěstovány pouze odrůdy tříd E a A, neboť celkový profil ze dvou třetin odpovídal odrůdě Sulamit (třída E) a z jedné třetiny odrůdě Alana (třída A). V lokalitě B* byly odrůdy ze stejných tříd pěstovány na cca 70 % osevních ploch. Zbývajících 30 % tvořily odrůdy z jakostní třídy B, neboť pěstování pšenice s potravinářsky nevyhovující kvalitou C nelze pro komerční využití suroviny předpokládat. Lze odhadnout, že interakce odrůdy pšenice s vlivem ročníku sklizně znamená snížení technologické jakosti odrůd třídy B na úroveň třídy C. Pro lokalitu C* byl podíl pěstovaných odrůd ze třídy E v celkovém objemu téměř poloviční, tedy zhruba o 15 % nižší vzhledem k lokalitě A* a naopak o přibližně 15 % vyšší než v lokalitě B*. Odrůdy ze třídy B tvořily ve srovnání s lokalitou B* významně nižší část produkce (20 %). Zajímavým výsledkem je asi třetinový podíl odrůd třídy A ve všech třech sledovaných lokalitách.

Závěr

Využití vícerozměrných statistických metod se jeví jako progresivní metoda kvantifikace jakostního profilu komerční potravinářské pšenice. Komplexní rozbor kvality potravinářské pšenice, zavedený v cereální laboratoři VŠCHT Praha, umožňuje velmi podrobný popis technologické kvality. Poskytuje pro tento účel cenný soubor dat, který dále umožňuje posoudit vlivy ročníku sklizně a lokality pěstování na technologickou kvalitu komerční potravinářské pšenice.

Seznam použitých zkratk

| | |
|-------------------|---|
| ANOVA | analýza rozptylu (analysis of variance) |
| OTG | přístroj pro posouzení chování fermentovaného těsta ve III. fázi fermentace, tzv. zapékání (Ofentriebergerät) |
| PC | hlavní komponenta (principal component) |
| PCA | metoda hlavních komponent (principal component analysis) |
| u, u ² | uzanční jednotky, uzanční čtvereční jednotky |
| ÚKZÚZ | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský |

LITERATURA

- Horáková V., Beneš F., Mezlík T.: Seznam doporučených odrůd / Přehled odrůd 2007. Gill s.r.o., Brno 2007.
- Zimolka J.: Pšenice – pěstování, hodnocení a užití zrna. ProfiPress s. r. o., Praha 2005.
- Petr J.: Pěstování pšenice podle užitkových směrů. ÚZPI, Praha 2001.
- Muchová Z.: Faktory ovlivňující technologickou kvalitu pšenice a jej potravinářské využití. SPU Nitra, Nitra 2001.
- Hrušková M., Švec I., Jirsa O., Váňová M., Palík S.: Obilnářské Listy 4, 1 (2007).
- Švec I., Jirsa O., Hrušková M.: Czech J. Food Sci. 25, 249 (2007).
- Švec I., Hrušková M., Blažek J.: Getreidetechnologie 58, 6 (2004).
- ČSN 46 10 11-5: Zkoušení obilovin, luštění a olejnin. Zkoušení obilovin. Stanovení objemové hmotnosti, ČNI Praha, leden 1988.
- ČSN 56 05 12: Metody zkoušení mlýnských výrobků, ČNI Praha, leden 1993.
- ČSN ISO 30 93: Obiloviny. Stanovení čísla poklesu, ČNI Praha, březen 1993.
- Jirsa O., Hrušková M., Švec I.: Chem. Listy 102, 9 (2008).
- ČSN ISO 55 29: Pšenice. Stanovení sedimentačního indexu – Zeleného testu, ČNI Praha, září 2000.

13. ČSN ISO 55 30-4: Pšeničná mouka. Fyzikální charakteristiky těst. Část 4: Stanovení reologických vlastností na alveografu, ČNI Praha, srpen 1995.
14. Lepš J. : *Biostatistika*. Skriptum, Jihočeská univerzita, České Budějovice, 1996.
15. Magnus E. M., Bråthen E., Sahlström S., Mohsleth Færgestad E., Ellekjær M. R: *J. Cereal Sci.* 25, 289 (1997).

I. Švec^a, M. Hrušková^a, and O. Jirsa^b (^a *Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague;* ^b *Agricultural Research Institute, Kroměříž*): **Application of Multivariate Statistical Methods in Wheat Quality Monitoring**

At present the use of multivariate statistical methods for prediction of quality profile of commercial wheat becomes very interesting. The article describes the results of statistical analysis based on comparison of commercial wheat with wheat cultivars of the exactly defined quality. Effects of the crop year and planting locality on technological quality of wheat were also evaluated. An assessment of quality profile of wheat from three areas was performed.

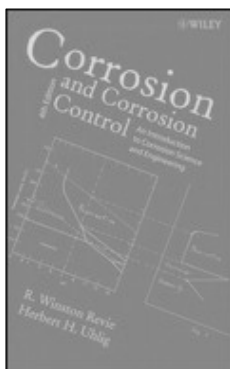
Děkan přírodovědecké fakulty UK vypisuje konkurs na přijetí do doktorského studia

v následujících oborech:

analytická chemie, anorganická chemie, biochemie, fyzikální chemie, makromolekulární chemie, modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, organická chemie a vzdělávání v chemii.

Studium bude zahájeno 1. 10. 2009. Podmínkou přijetí je absolvování VŠ ve shodném nebo blízkém studijním oboru. Přihlášky a podrobné informace jsou na adrese: PŘF UK, oddělení doktorského studia, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel. 221 951 162, 221 951 163. Přihlášky se přijímají do 30. 4. 2009.

RECENZE



Revie R. Winston,
Hubert H. Uhlig
**Corrosion and Corrosion
Control.**
An Introduction to Corrosion
Science and Engineering

Vydal John Wiley & Sons, 2008.
4. vydání, 490 stran.
82.90 Euro
ISBN-10: 0-471-73279-6

Jedná se o čtvrté vydání knihy Huberta H. Uhliga, doplněné R. Winstonem Revie opět pro vydavatelství Wiley Interscience. Základní struktura knihy i její obsah se od prvního vydání z roku 1963 příliš neliší a tak mne poněkud překvapuje, že jako první autor tohoto vydání je uváděn R. W. Revie, přestože se na tvorbě většiny textu nepodílel. Prvé vydání této knihy bylo v 60. a 70. letech minulého století jednou ze základních učebnic o korozi kovů, druhé vydání bylo přeloženo i do němčiny. Při psaní této recenze jsem měl k dispozici jak první, anglicky psané vydání, tak do němčiny přeložené vydání druhé. R. W. Revie je znám především jako editor tzv. Uhlig's Corrosion Handbook, vydaného v tomtéž nakladatelství (Wiley Interscience) v roce 2000. V tomto případě se jednalo sice o rozsáhlý, ale poněkud nesourodý soubor 70 dílčích kapitol od různých autorů, mezi které jsou zařazeny i kapitoly o nekovových materiálech. Tím spíše překvapí v recenzované knize definice koroze, která odporuje všeobecnému trendu nevyomezovat ji pouze pro poškození kovových materiálů.

Téma koroze kovů je stále velmi aktuální především k obrovským ztrátám, které jí jsou způsobeny a málokdo si uvědomuje, že ztráty způsobené požáry jsou jen malým zlomkem ztrát korozních. To je hlavní důvod, proč je stále žádoucí vydávat učebnice, které vysvětlují příčiny korozních dějů a z nich vyplývající racionální opatření vedoucí k účinné protikorozní ochraně. Vývoj způsobů a prostředků protikorozní ochrany i poznání korozních procesů je trvalý a doznal od prvního vydání této knihy významného pokroku. Výzkum a vývoj v této oblasti je často střelba na pohyblivý cíl, protože korozní věda a inženýrství se musí zabývat především praktickými systémy a tedy i novými technologiemi s nimiž jsou korozní problémy spojeny, musí hledat stále nová a často i kompromisní řešení mezi cenou ochrany, její účinností a rizikovostí řešení. V neposlední řadě je vývoj protikorozních opatření stavěn před nutnost nahradit některé osvědčené, velmi účinné a zavedené prostředky pro jejich nežádoucí vliv na životní prostředí. Těmto významným otázkám se čtvrté vydání knihy také částečně věnuje a odlišuje se tak od vydání prvního. Protikorozní ochraně kovů se věnuje téměř polovina textu (z toho více než polovina odolnosti jednotlivých

kovových materiálů), významným prostředím a podmínkám čtvrtina, zbývající čtvrtina je věnována obecným principům koroze. Rozhraní mezi korozními principy a protikorozní ochranou není však zcela zřetelné. Knize jako celku schází logické uspořádání, pořadí kapitol je nahodilé. Popis obecných principů protikorozní ochrany chybí, v textu je jen malá pozornost věnována např. korozním dějům ovlivněných prouděním, mikrobiální aktivitou,

Knihou bohužel obsahuje i nepřesnosti v některých základních věcech. Příkladem může být definice anody resp. katody jako elektrody, na které probíhá (occures) oxidace resp. redukce. Tato definice nebere v úvahu, pro korozi kovů v elektrolytech velmi podstatnou okolnost, že polarizaci elektrody potlačujeme katodický, resp. anodický děj, ale nezastavujeme jej. V knize je několikrát zmíněn článek železných elektrod s různým ovzdušněním, a přestože se jedná o dominantní korozní fenomén z hlediska četnosti jeho praktického výskytu, není správně vysvětlen. Text vychází z nesprávného dogmatu, že anoda prostě koroduje rychleji než katoda. Dominantní vliv změny pH na potlačení koroze katody za podmínek omezené konvekce (katodická pasivace) a naopak urychlení koroze anody oxyselením hydrolyzou ionty kovu, je zmíněn jen okrajově. Velmi významná role tzv. okludovaných roztoků v korozi kovů, které vznikají především v podmínkách neutrálních vodných roztoků činností korozních článků, je ve výkladu principů koroze kovů téměř opomenuta.

Nešťastný je i výklad funkce tzv. suchého článku, jako analogie k pochopení funkce článku. Tvzení, že v tomto případě je katodou uhlík, není správné, protože skutečnou katodou je buřel a uhlík plní hlavní roli sběrače elektronů.

Příkladem zastaralých informací je kapitola o katodické ochraně, převzatá pouze s velmi drobnými úpravami z prvního vydání z roku 1963. Čtenář je např. uváděn v omyl, že při katodické ochraně je korozní rychlost nulová. Je mu vnucována představa, že se jedná o stav rovnováhy - imunitu. Výpočet ochranného potenciálu pomocí Nernstovy rovnice je pochybná aplikace fyzikální chemie (i když v učebnicích koroze tradovaná), rozhodující roli při katodické ochraně oceli má alkalizace povrchového elektrolytu, jejíž míra úzce souvisí s transportními procesy. Z alkalizace plyne významná změna anodické křivky, což může vést až k pasivaci při katodické polarizaci. Současným základním kritériem účinnosti katodické ochrany je korozní rychlost, měřitelná odporovými sondami, nikoli zastaralé metody využívající korozní kupony nebo barevné indikátory.

Kapitola o anodické ochraně také neobráží současný stav poznání a aplikací. Tento speciální způsob elektrochemické protikorozní ochrany se prakticky používá především u korozních systémů, kde dochází k samovolné pasivaci kovu a posun potenciálu polarizací v rámci pasivity vede k zajištění stability pasivního stavu. Jen zřídka užívá-

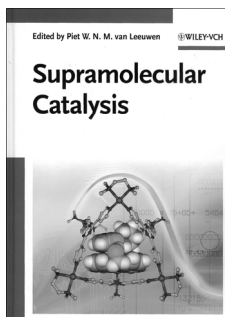
me anodickou ochranu vzhledem k rizikovosti a obtížné realizovatelnosti pro korozní systémy, u kterých je nutno převádět kov polarizací stejnosměrným proudem z aktivního do pasivního stavu.

Podle mého názoru k zbytečným a tradujícím se učebnicovým informacím patří i tzv. Pilling-Bedworthův poměr, uvedený v úvodní kapitole o příčinách koroze. Bývá uváděn v souvislosti s vysokoteplotní oxidací kovů, ale jedná se z praktického hlediska o okrajové a pouze doplňující kritérium odolnosti.

Z dalších připomínek uvádím, že dělení látek snižující agresivitu prostředí na inhibitory a pasivátory neodpovídá obecně přijaté definici inhibitoru koroze kovů. Pro inženýrské použití chybí v knize přehled zásad konstrukčního řešení k omezení koroze a informace o současných metodách korozního monitoringu. Chybou také je, že jsou v textu střídavě uváděny jednotky US soustavy a metrické. Číslovaná literatura v textu jednotlivých kapitol není proti předchozím vydáním podstatně aktualizovaná, ale každá z kapitol obsahuje zcela aktuální literaturu „General references“ k danému tématu, vhodnou pro další čtení.

Celkově se dá říci, že se jedná o knihu, ve které lze z inženýrského hlediska nalézt mnoho informací o korozi kovů, bohužel jen částečně aktualizovaných proti době vzniku rukopisu prvního vydání v roce 1962.

Pavel Novák



Piet W. N. M. van Leeuwen
(Editor)

Supramolecular Catalysis

Wiley-VCH, Weinheim 2008
303 stran, pevná vazba (€ 139,-)
ISBN: 978-3-527-32191-9

Podnětem pro tuto knihu byla „Conference on Supramolecular Approaches to Catalysis“ (SUPRACat),

konaná v březnu 2008 v Barceloně. Organizátoři předem oslovili zvané řečníky konference s žádostí o zpracování obsahu jejich přednášek ve formě knižních kapitol. Je velkým úspěchem snahy všech takto zúčastněných autorů, editora knihy i vydavatelství, že se podařilo knihu vydat

již v počátku roku 2008. Čtenářům tak přináší v devíti originálně zpracovaných kapitolách přehled moderních trendů a nejaktuálnějších výsledků tvorby nových katalyzátorů s užitím nástrojů supramolekulární chemie (elektrostatických interakcí, vazeb kov-ligand, vodíkových vazeb, π - π a van der Waalsových interakcí, hydrofobních a solvatofobních efektů).

Velmi dobře zpracovaná vstupní kapitola (autoři P. Ballester a A. Vidal-Ferran) podává přehled postupného vývoje od klasických supramolekulárních modelů katalytických center založených na kovaletních strukturách (umožňujících spojení substrátového receptoru a vlastního katalytického centra nebo společnou komplexaci reaktantů) k nově rozvíjeným metodám, jejichž efekt spočívá na samoskladné tvorbě molekulárních kontejnerů s vysokou substrátovou specifitou a vysokou katalytickou účinností ze strukturně jednodušších komponent. Tím tyto metody do jisté míry obcházejí náročnou syntézu složitých kovaletních katalyzátorů a umožňují i využití kombinatoriálních postupů k nalezení nejvhodnějších výchozích molekulárních komponent.

Následující část knihy nerozvíjí systematicky tento úvod se snahou o úplný přehled stávajících výsledků, ale jednotlivé kapitoly jsou vyjádřením specifického přístupu jednotlivých vědeckých týmů k tomuto tématu. Podle subjektivního pohledu patří k nejzajímavějším příspěvkům o tvorbě knihoven bidentátních ligandů pomocí vodíkového můstkování (autor B. Breit), o konstrukci biomimetických katalyzátorů (J. A. A. W. Elemans, J. J. L. M. Cornelissen, M. C. Feiters, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte) a o tvorbě supramolekulárních kavit obklopujících kovová katalytická centra (J. N. H. Reek).

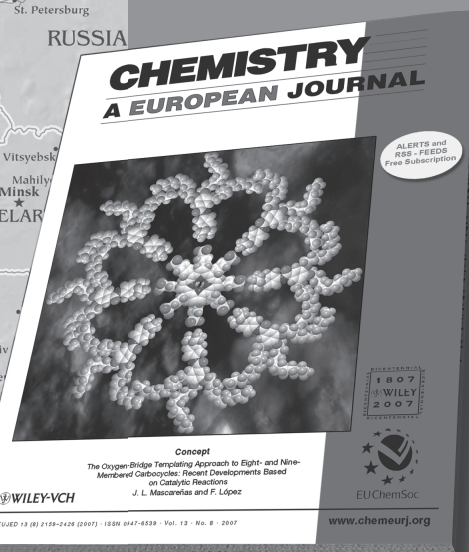
V tomto pojetí není kniha klasickou učebnicí (i přes zmíněnou úvodní kapitolu), sledování textu jednotlivých kapitol vyžaduje základní znalosti z oblasti katalýzy i supramolekulární chemie. K pochopení textu jednotlivých kapitol značně napomáhá množství názorných strukturních obrázků, často ve vynikajícím barevném grafickém provedení. Kniha je tak vhodným doplňkovým studijním materiálem například v doktorandském studiu a rovněž cenným inspiračním pramenem pro odborníky se zájmem o tento směr rozvoje katalýzy.

Petr Holý



EU ChemSoc

Editorial Union
of Chemical
Societies



2008, Volume 14

ISSN: 0947-6539 print
1521-3765 online

Made in Europe for the World

Chemistry - A European Journal has established itself as a truly international journal with top quality contributions. It is the international forum for the publication of outstanding Full Papers and Concept Articles from all areas of chemistry and related fields.

★ Most downloaded articles in 2006:

Organocatalysis Mediated (Thio)urea Derivatives
S. J. Connon (Chem. Eur. J. 2006, 12, 5418)

Easily Prepared Air- and Moisture-Stable Pd-NHC (NHC=N-Heterocyclic Carbene) Complexes: A Reliable, User-Friendly, Highly Active Palladium Precatalyst for the Suzuki-Miyaura Reaction
C. J. O'Brien, E. Assen, B. Kantchev, C. Valente, N. Hadei, G. A. Chass, A. Lough, A. C. Hopkinson, M. G. Organ (Chem. Eur. J. 2006, 12, 4743)

Rapid Room-Temperature Buchwald-Hartwig and Suzuki-Miyaura Couplings of Heteroaromatic Compounds Employing Low Catalyst Loadings
O. Navarro, N. Marion, J. Mei, S. P. Nolan (Chem. Eur. J. 2006, 12, 5142)

Ligand-Template Directed Assembly: An Efficient Approach for the Supramolecular Encapsulation of Transition-Metal Catalysts
A. W. Kleij, Joost N. H. Reek (Chem. Eur. J. 2006, 12, 4218)

Self-Supported Chiral Catalysts for Heterogeneous Enantioselective Reactions
K. Ding, Z. Wang, X. Wang, Y. Liang (Chem. Eur. J. 2006, 12, 5188)

Increased
Impact Factor
(2006): 5.330

For further information
and to subscribe
please send an E-mail to:

cs-journals@wiley.com
(North and South America)

service@wiley-vch.de
(Germany/Austria/Switzerland)

cs-journals@wiley.co.uk
(all other regions)



WILEY-VCH

WILEY
InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT

Subscribe now: www.chemeurj.org

| OBSAH | | CONTENTS | |
|--|-----|---|-----|
| ÚVODNÍK | 123 | EDITORIAL | 123 |
| ZAHRADA | | GARDEN | |
| Fluorescenční korelační spektroskopie | 125 | Fluorescence Correlation Spectroscopy | 125 |
| L. Beranová, J. Humpolíčková a M. Hof | | L. Beranová, J. Humpolíčková, and M. Hof | |
| REFERÁTY | | REVIEW ARTICLES | |
| Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin | 130 | Physical Gels in Capillary Gel Electrophoresis and Their Application in Protein Analysis | 130 |
| T. Křížek, P. Coufal, Z. Bosáková, E. Tesařová a J. Sobotníková-Suchánková | | T. Křížek, P. Coufal, Z. Bosáková, E. Tesařová, and J. Sobotníková-Suchánková | |
| Výskyt, zdroje a stanovení kovů v ovzduší | 136 | Occurrence, Sources and Determination of Metals in Air | 136 |
| M. Vojtěšek, P. Mikuška a Z. Večeřa | | M. Vojtěšek, P. Mikuška, and Z. Večeřa | |
| Palladiové nanočástice v katalýze spojovacích reakcí | 145 | Palladium Nanoparticles in the Catalysis of Coupling Reactions | 145 |
| J. Demel, J. Čejka a P. Štěpnička | | J. Demel, J. Čejka, and P. Štěpnička | |
| Kolobeh síry vo víne | 154 | Sulfur Cycle of Wine | 154 |
| K. Furdíková a F. Malík | | K. Furdíková and F. Malík | |
| LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY | | LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS | |
| Využití pasivního vzorkování vod a porézních médií při sledování organických polutantů | 159 | Passive Sampling of Water and Porous Media for Monitoring of Organic Pollutants | 159 |
| J. Pulkrabová, M. Suchanová, J. Hajšlová, V. Kocourek a M. Tomaniová | | J. Pulkrabová, M. Suchanová, J. Hajšlová, V. Kocourek, and M. Tomaniová | |
| Stanovení lamotriginu v séru pomocí on-line spojení kapilární izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy | 166 | Determination of Lamotrigine by Isotachophoresis – Capillary Zone Electrophoresis | 166 |
| L. Budáková, H. Brozmanová, F. Kvasnička, a M. Grundmann | | L. Budáková, H. Brozmanová, F. Kvasnička, and M. Grundmann | |
| Využití vícerozměrných statistických metod pro sledování jakostního profilu komerční pšenice | 172 | Application of Multivariate Statistical Methods in Wheat Quality Monitoring | 172 |
| I. Švec, M. Hrušková a O. Jirsa | | I. Švec, M. Hrušková, and O. Jirsa | |
| RECENZE | 179 | BOOK REVIEWS | 179 |

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 103 (2009), čís./no. 2 • 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 • REDAKTORŮ/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hettflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvicka (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. Cervený, 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 28.1.2009.