

## Účast České republiky v 5. rámcovém programu EU

Česká republika se od roku 1999 zúčastňuje jako tzv. asociovaná země mezinárodní spolupráce ve výzkumu a vývoji prostřednictvím 5. rámcového programu EU (5. RP). Po dvou letech je čas na první bilanci a posouzení úspěšnosti naší země v tomto, co do rozsahu spolupráce a finančního rozpočtu, nejvýznamnějším evropském kooperačním výzkumném programu.

Úspěšnost země v 5. RP lze posuzovat minimálně ze dvou hledisek – podle šíře zapojení českých výzkumných týmů do mezinárodní spolupráce ve srovnání s ostatními zeměmi a podle výše finančních prostředků, které se podařilo z Bruselu získat na financování našich výzkumných projektů. Jak známo, Česká republika, stejně jako ostatní země, které se 5. RP účastní, platí za možnost zúčastnit se určitý poplatek, jehož výše je odvozena od hrubého národního produktu (země s výkonnou ekonomikou tedy platí více). Platí zde princip evropské solidarity a spolupráce při financování mezinárodních projektů. Přes tato krásná slova a opakované politické deklarace si každá země velmi pečlivě hlídá návratnost vynaložených prostředků. V každé zemi, a zvláště v zemích se slabší ekonomikou a napjatým rozpočtem, je každá ztráta citlivou politickou otázkou. Nejinak je tomu i v České republice.

Posuzujeme-li dosavadní účast naší země v 5. RP podle šíře zapojení do mezinárodní spolupráce, můžeme být spokojeni. Česká republika podává v přepočtu na stejné množství obyvatel přibližně stejné (někdy i vyšší) množství projektů do Bruselu k výběrovému řízení. Našimi nejčastějšími partnery jsou výzkumné týmy z Německa a Velké Británie. Nejvíce projektů pak směřuje do tematických programů „Kvalita života“ (např. biotechnologie, zemědělství, potraviny, medicína a část životního prostředí) a „Technologie pro informační společnost“ (např. multimédia, elektronický obchod, informační systémy, vysokorychlostní sítě). Potěšitelná je účast našich malých a středních podniků zejména ve specifických projektech typu CRAFT, které jsou zaměřeny na rychlý převod výsledků na trh. V této oblasti má Česká republika nejen relativně, ale i absolutně nejvyšší účast ze všech kandidátských zemí a vyrovná se i některým srovnatelně velkým členským státům EU, ve kterých je již sektor malých inovačních podniků stabilizován a jejichž účast v mezinárodních výzkumných projektech má dlouholetou tradici.

Úspěšnost našich projektů ve výběrovém řízení v Bruselu se liší podle jednotlivých specifických programů. V zásadě lze

konstatovat, že průměrná úspěšnost v celém 5. RP byla v letech 1999–2000 okolo 21 %, tj. každý pátý projekt s naší účastí byl vybrán pro finanční podporu. Úspěšnost našich projektů je zhruba stejná jako ve státech s rozvinutou ekonomikou a stabilizovanou výzkumnou základnou. Zdá se tedy, že český výzkum a vývoj prokazuje kromě značné odolnosti vůči leckdy nepřiznivým domácím podmínkám i vysoký potenciál uspět v mezinárodní soutěži o finanční podporu. A to je dobrá zpráva.

Pokud se týče kvantitativního zhodnocení účasti České republiky v 5. RP v letech 1999–2000, do Bruselu bylo s naší účastí podáno celkem 1280 formálně správných projektů, ve kterých participovalo celkem 1694 českých výzkumných organizací. Z toho 265 projektů bylo vybráno k finanční podpoře, což učinilo radost celkem 347 českým účastníkům v těchto projektech. V letech 1999–2000 zaplatila Česká republika na příspěvcích do rozpočtu 5. RP přibližně 830 milionů Kč a zpět se podařilo získat okolo 1320 milionů Kč. Průběžná vysoká návratnost (přibližně 160 % zaplaceného příspěvku) do konce 5. RP rozhodně nevydrží. Jednak se naše poplatky do 5. RP budou každoročně zvyšovat – asociovaným zemím byly v prvních letech 5. RP poskytnuty určité (snižující se) finanční úlevy – jednak ubývá příležitostí k podání projektů, neboť v některých specifických programech se připravují poslední závěrečné výzvy. Dá se však očekávat, že konečná návratnost finančních prostředků se bude pohybovat minimálně okolo 80 %, což je v celoevropském měřítku nadprůměrná hodnota. Z rozpočtu 5. RP je totiž hrazena i režie na chod programu a řada společných mezinárodních akcí (konference, semináře, školení).

Pro dobré výsledky v 5. RP jsou nezbytné kvalitní a včasné informace o tom, kdy, jakým způsobem a za jakých podmínek se lze o finanční prostředky v Bruselu ucházet. Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR, které je garantem účasti země v 5. RP, proto iniciovalo vytvoření národní informační sítě pro 5. RP. Centra této sítě jsou umístěna v regionech s vysokou koncentrací výzkumu a vývoje, tj. v místech s vysokou pravděpodobností vzniku kvalitních výzkumných projektů. Kontaktní údaje pro jednotlivá informační centra a komplexní informace o 5. RP lze najít na stránkách [www.tc.cas.cz](http://www.tc.cas.cz) v sekci „Informace o 5. RP“.

Karel Klusáček

## KVANTIFIKACE CHIRALITY

JAROSLAV JONAS

*Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: jonas@chemi.muni.cz*

Došlo dne 10.XI.2000

Klíčová slova: kontinuální míry symetrie a chiralitu, kvantifikace chiralitu, funkce a parametry chiralitu

Posledních padesát let přineslo poznání, že chiralita je součástí materiální skutečnosti na všech jejích úrovních. Prohloubilo se povědomí o její nezbytné souvislosti se vznikem a trváním života a rozšířilo instrumentarium k jejímu studiu a využití. Není divu, že se množí pokusy popsat tento jev kvantitativně a popisu využít k předpovědím míry jeho vlivu v nejrůznějších souvislostech. Obecný problém kvantifikace chiralitu, vývoj a současný stav jeho řešení je předmětem následujících řádků.

Není obtížné ztotožnit se s intuitivním názorem, že chiralita má svou kvantitativní stránku a že chiralita struktury s asymetrickým stereogenním uhlíkem nesoucím vodík, fenyly, karboxyl a hydroxyl ( $\text{HC}(\text{C}_6\text{H}_5)(\text{OH})(\text{CO}_2\text{H})$ ) je větší než u struktury, kde je na takový uhlík vázán methyl, protium, deuterium a tritium ( $\text{HC}(\text{CH}_3)\text{DT}$ ).

Dokonce bychom mohli podlehnout pokušení považovat za měřítko rozdílného stupně chiralitu uvedených struktur rozdílnou velikost jejich specifických otáčivostí. Optická otáčivost je ovšem výsledek „ohmatání“ chirální struktury pomocí úzkého výřezu elektromagnetických interakcí, tedy zkoumání velmi jednostranného. Navíc, optická otáčivost se sice pro enantiomery liší pouze znaménkem, nulová je však nejen pro jejich ekvimolární směs, ale často i pro jistou vlnovou délku či délky použitého lineárně polarizovaného elektromagnetického záření. Není tak splněn jeden ze základních požadavků na kvantifikátor chiralitu – nulové hodnoty by měl nabývat pouze pro achirální situace.

Jaká je historie našeho problému?

Začíná v době, kdy sám pojem chiralita nebyl ještě zaveden, možnost existence nepřekrytných zrcadlových obrazů byla v oblasti molekulárních struktur označována jako molekulární dissymetrie a v organické chemii byl již jako její konstituční indikátor rozpoznán van't Hoffův asymetrický atom uhlíku. Zatímco Crum Brown<sup>1</sup> při úvahách o vztahu, který by vyjádřil závislost optické otáčivosti na parametrech ligandů vázaných na van't Hoffův atom uhlíku, došel k tomu, že „by měl obsahovat součin rozdílů těchto parametrů“, Guye<sup>2</sup> vytvořil algebraickou funkci („produit d'asymétrie“), odpovídající těmto požadavkům, první funkci chiralitu v chemii.

V následujících sto deseti letech byly zaznamenány desítky pokusů o formulaci vhodného a univerzálního „měřidla“ chiralitu. Při nich se postupně ujasňovala složitost problému i nutnost postihnout chiralitu geometrickou, související větší

nou s izotropně vyplněným prostorem, a chiralitu fyzikální, zhusta odpovídající prostoru zaplněnému anizotropně<sup>3</sup>. Popis a rozbor těchto pokusů je předmětem několika nedávných pojednání<sup>4-7</sup> a přesahuje rámec tohoto mikropřehledu.

Míry chiralitu lze rozdělit do dvou tříd podle toho, zda je stupeň chiralitu definován

A) vzhledem k chirálnímu nebo achirálnímu standardu nebo B) nejnižším rozlišením, umožňujícím chiralitu rozpoznat.

Weinberg a Mislow<sup>5</sup> nazvali třídu A) mírami shodnosti (congruity measures) a třídu B) mírami rozlišení (resolution measures) a ukázali, že lze definovat funkci, která zahrnuje případy A) a B) jako limitní, a takto míry chiralitu unifikovat.

Do třídy A) náleží jak

Aa) míry chiralitu založené na srovnání chirálního objektu s achirálním standardem (např. asymetrického tetraedru s tetraedrem symetrickým – Guye<sup>2</sup>), tak

Ab) míry chiralitu spočívající na srovnání enantiomerů (např. maximální překryv polohami atomových jader definovaných objemů enantiomerů, vyjádřený tzv. Hausdorffovou<sup>7-10</sup> vzdáleností).

Třída B) je prozatím reprezentována pouze přístupem Mezeyovým<sup>11</sup>, v němž je stupeň chiralitu vyjádřen nejnižším rozlišením, s nímž je možno zjistit, že objekt je chirální.

Podrobné analýzy ovšem ukazují<sup>4,5,7,12,22</sup>, že principiálně je možné vytvořit nekonečné množství funkcí a parametrů chiralitu, které definují míru chiralitu bez vzájemné závislosti a různě pro různé pozorované interakce. Chirální parametry se mohou lišit ve znaménku a situace, pro něž mají funkce chiralitu nulovou hodnotu, obecně nekoincidují. Doložme právě uvedená tvrzení několika příklady.

Ve dvourozměrném prostoru jsou různostranné trojúhelníky chirální. Jaká je tedy velikost nejmenšího vnitřního úhlu v nejchirálnějším různostranném pravouhlém trojúhelníku? S každou použitou mírou chiralitu jiný výsledek<sup>4,7</sup>! Odpověď má smysl pouze v rámci jedné míry chiralitu. Analogická je situace u trojrozměrných geometrických objektů<sup>7</sup>, kde např. stupeň chiralitu šroubovice závisí na použité metodě stanovení.

V trojrozměrném prostoru je možno chirální geometrický objekt kontinuálně převést v jeho zrcadlový obraz tak, že transformace nevede přes žádný achirální stav (podrobněji viz citace<sup>4,7,12</sup> a jako příklad necht' slouží počítačovou simulací prozkoumaná<sup>13</sup> enantiomerizace nejjednoduššího chirálního molekulárního systému *cyklo*-SSSeOS). Jestliže je dodržen požadavek, aby chirální parametr byl pseudoskalár, pak v procesu enantiomerizace takové parametry nabývají nulovou hodnotu, obecně každý v jiném bodě, který nemusí představovat achirální stav<sup>12</sup>. To je ovšem v rozporu s uvedeným požadavkem, aby nulová hodnota parametru chiralitu byla vyhrazena pouze pro achirální situace.

Výběr parametru, funkce a měřítka chiralitu je asi nejvhodnější založit na čistém pragmatismu a neočekávat konvergenci k jediné univerzální míře.

Jaká je současná praxe? Je některý z navržených způsobů kvantifikace chiralitu schopen lépe než ostatní vyhovět požadavkům (řekněme, organické chemie, která slouží jako pokus-

né pole)? Kupodivu dávají poslední léta 20. století na tuto otázku odpověď kladnou. V následujícím textu bude podrobněji popsána kvantifikace chiralit<sup>6</sup> odvozená od nediskrétního vyjádření symetrie, měření symetrie na kontinuální škále<sup>14</sup>.

Při posuzování symetrie, např. modelu molekulární struktury, obvykle klademe otázku, zda posuzovaný objekt má nebo nemá jistý prvek symetrie, např. symetrie reflexní. Hledáme odpověď kvalitativní, ale precizní, typu černé nebo bílé, ano nebo ne, kdy *tertium non datur*. Síla argumentů založených na symetrii je v této jednoznačnosti a chemie, v níž tvar hraje tak významnou úlohu, je s úvahami o symetrii spojena<sup>15</sup> do té míry, že se staly neodmyslitelnou součástí intelektuálních nástrojů chemika. Má-li posuzovaný model molekulární struktury na časové škále pozorování reflexní prvek symetrie, např. rovinu symetrie, nemůže existovat enantiomerní struktura, a pátrat po optické otáčivosti struktury, které model odpovídá, nemá smysl. Současně však nejen přírodovědec dobře ví, že ve skutečném světě je klíčovým přístup typu černá i bílá (občas i Black and White), ano i ne, že úspěch je podmíněn správným umístěním více či méně „šedých“ jevů na kontinuální hodnotící škále.

Do oblasti posouzení symetrie byl tento teoreticky zajímavý a prakticky užitečný přístup uveden<sup>14</sup> v roce 1992 a dále rozveden<sup>6,16,17</sup> v letech 1993 a 1995. Je-li posuzovaný objekt definován množinou  $n$  bodů  $p_i$ , hledá se, uvedeným vztahem definovaná, minimální vzdálenost  $S$  mezi množinou  $p_i$  a množinou  $\hat{p}_i$ , definující původní objekt transformovaný do tvaru s požadovanou symetrií bodové grupy symetrie  $G$ . Tato vzdálenost je, aby byl odstraněn vliv velikosti objektu, normalizována (např. vzhledem ke vzdálenosti  $D$  mezi těžištěm objektu a jeho nejvzdálenějším bodem) ( $I$ ).

$$S(G) = \frac{1}{nD^2} \sum_{i=1}^n (p_i - \hat{p}_i)^2 \quad (I)$$

Je tak otevřena cesta pro srovnávání „vzdálenosti“ posuzovaných objektů od zvolené symetrie, např. od symetrie odpovídající bodové grupě  $C_s$ , tedy i cesta pro posouzení „míry“ chiralit. Uvedený přístup náleží do třídy A s tím, že srovnávací standard není definován *a priori*, ale vytvořen výpočtem v souladu se zvolenou symetrií  $G$ .

A dosavadní zkušenosti? Jsou nadějně – jak ukazuje posouzení míry chiralit řady strukturálních typů<sup>6,18</sup>, změn míry chiralit v průběhu některých procesů<sup>6,19</sup>, posouzení míry desymetrizace hraničních orbitalů, způsobené některými běžnými chirálními pomocnými látkami používanými v enantio-selektivních reakcích<sup>20</sup>, a konečně i nalezení korelace mezi mírou chiralit substrátů a efektivitou jejich interakce s aktivním centrem některých enzymů<sup>21</sup>.

Chiralita, na rozdíl od krásy, je exaktně definována. Přesto tu existuje jistá podobnost. Míra obou je totiž převážně „in the eyes of the beholder“, v úhlu a způsobu vnímání, interakce

a interpretace. Lidé však nezanechali úsilí krásu pochopit a hodnotit, což může dobře sloužit jako motivace i nám, chemikům. V „rozmazaném“ světě jsou rozmazané i směrníky. To však neznamená, že nikam nevedou.

## LITERATURA

1. Crum Brown A.: Proc. R. Soc. Edinburgh 17, 181 (1890).
2. Guye P.-A.: C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 110, 714 (1890).
3. Gilat G.: J. Math. Chem. 15, 197 (1994).
4. Buda A. B., Auf der Heyde T., Mislow K.: Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31, 989 (1992).
5. Weinberg N., Mislow K.: J. Math. Chem. 17, 35 (1995).
6. Zabrodsky H., Avnir D.: J. Am. Chem. Soc. 117, 462 (1995).
7. Mislow K.: Top. Stereochem. 22, 68 (1999).
8. Hausdorff F.: *Set Theory*, str. 166. Chelsea, New York 1957.
9. Rassat A.: C. R. Acad. Sci. (Paris) B299, 53 (1984).
10. Buda A. S. B., Mislow K.: J. Am. Chem. Soc. 114, 6006 (1992).
11. Mezey P.G.: J. Math. Chem. 11, 27 (1992).
12. Harris A. B., Kamien R. D., Lubensky T. C.: Rev. Mod. Phys. 71, 1745 (1999).
13. Mauksch M., von Ragué Schleyer P.: Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36, 1856 (1997).
14. Zabrodsky H., Peleg S., Avnir D.: J. Am. Chem. Soc. 114, 7843 (1992).
15. Dunitz J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 14260 (1996).
16. Zabrodsky H., Peleg S., Avnir D.: J. Am. Chem. Soc. 115, 8278 (1993) (erratum str. 11656).
17. Zabrodsky H., Avnir D.: Adv. Mol. Struct. Res. 1, 1 (1995).
18. Katzenelson O., Edelstein J., Avnir D.: Tetrahedron: Asymmetry 11, 2695 (2000).
19. Pinto Y., Fowler P.W., Mitchell D., Avnir D.: J. Phys. Chem., B 102, 5776 (1998).
20. Lipkowitz K. B., Gao D., Katzenelson O.: J. Am. Chem. Soc. 121, 5559 (1999).
21. Keinan S., Avnir D.: J. Am. Chem. Soc. 120, 6152 (1998).
22. Weinberg N., Mislow K.: Can. J. Chem. 78, 41 (2000).

**J. Jonas** (Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno): **Quantification of Chirality**

It is pointed out in this brief survey that although there are innumerable chiral functions possible, the continuous chirality measures of Zabrodsky and Avnir, novel approach to the problem, appear to be also interesting from the pragmatical point of view.

# SOUČASNÉ UPLATNĚNÍ (CHRONO)POTENCIOMETRICKÉ ROZPOUŠTĚČÍ ANALÝZY

JIŘÍ KONVALINA a KAREL VYTRÁS

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice, e-mail: Karel.Vytras@upce.cz*

Došlo dne 16.XI.2000

Klíčová slova: (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza, elektroanalýza, review

## Obsah

1. Úvod
2. Princip měření v (C)PSA
  - 2.1. Teoretický základ metody
  - 2.2. Varianty (chrono)potenciometrické rozpouštěcí analýzy
    - 2.2.1. Případy s nulovým proudem
      - 2.2.1.1. Klasická (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza
      - 2.2.1.2. Reduktivní (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza
      - 2.2.1.3. Kinetická (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza
    - 2.2.2. Případy s nenulovým konstantním proudem
      - 2.2.2.1. Rozpouštěcí analýza s konstantním proudem
      - 2.2.2.2. Adsorpční (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza
      - 2.2.2.3. Extrakční (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza
    - 2.2.3. Techniky měření
      - 2.2.3.1. „Multichannel recording“ (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza
      - 2.2.3.2. Diferenční (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza
      - 2.2.3.3. Vícezáznamová (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza
      - 2.2.3.4. (Chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza s aplikovaným konstantním proudem během chemického rozpouštění
      - 2.2.3.5. Měření v průtokových systémech
3. Pracovní elektrody
4. Použití metody (C)PSA v analýze reálných vzorků
5. Klady a zápory související s použitím (C)PSA
6. Závěr

## 1. Úvod

Potenciometrická rozpouštěcí analýza (anglicky potentiometric stripping analysis, PSA) patří mezi elektrochemické metody a od svého počátku je hlavně používána pro zjišťování stopových koncentrací těžkých kovů (olovo, kadmium, měď, zinek apod.) v různých typech praktických vzorků. Pojmenování této metody pochází od autorů původní publikace popisující její princip a využití v analytické chemii<sup>1</sup>. Spíše výjimečně se objevují termíny jako inverzní chronopotenciometrie, coulometrická rozpouštěcí potenciometrie (potenciometrická rozpouštěcí coulometrie), galvanická (galvanostatická) rozpouštěcí (chrono)potenciometrie. Tento terminologický nesoulad souvisí především s technikou využívající k rozpouštění analytů konstantního proudu na rozdíl od tradičního chemického rozpouštění. V obecnější rovině pohledu lze metodu PSA více či méně chápat jako chronopotenciometrii ( $I = 0$  nebo  $I = \text{konst.}$ ). Tudíž termín chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza (CPSA), který se rovněž v literatuře objevuje, rázem představuje označení mnohem univerzálnějšího charakteru, neboť v sobě zahrnuje oba hlavní postupy měření. To vše platí ovšem za podmínky, že se tiše zanedbá akumulací fáze, která se v klasické chronopotenciometrii nevyskytuje. V česky psané literatuře je anglický výraz „stripping“ nahrazován zpravidla termínem „rozpouštěcí“ (i když to není nezbytně nutné, je tento úzus zachován i zde). Další rozvoj metody ovšem ukázal, že tato pojmenování jsou naprosto nevhodná v případech, kdy se na pracovní elektrodě kumuluje látka v oxidované formě a měřený signál se získává redukcí na kov, přičemž se nic „nesvléká“ ani nerozpouští (např.  $\text{Au}^{\text{III}} \rightarrow \text{Au}^0$ ).

Do současné doby bylo v mezinárodních časopisech uveřejněno několik stovek prací (nejméně 600), přičemž největší nárůst publikační aktivity je datován k přelomu 70. a 80. let. Přes četné nově zaváděné zkratky a pojmenování (např. CCSP nebo CCSCP z anglického constant current stripping potentiometry, resp. chronopotentiometry) pracuje převážná většina publikací s prvně zmíněným anglickým termínem a zkratkou PSA. Považujeme tedy za prospěšné, také vzhledem k možné další práci potenciálních čtenářů s literaturou, pro účely této přehledové práce zkratku PSA zachovat a provést jen její menší modifikaci na (C)PSA a zohlednit tak diskutovanou vazbu na chronopotenciometrii. Dnes se kromě prací zabývajících se klasickou tematikou, tj. stanovením těžkých kovů, objevují i práce netradiční, a to hlavně v souvislosti s použitím nových typů pracovních elektrod. Jako příklad mohou být uvedeny uhlíkové pastové elektrody, které byly využity jednak pro adsorpční nahromadění sloučenin typu nukleových kyselin<sup>2</sup> a jednak pro akumulaci aniontů tvořících iontové asociáty<sup>3</sup>.

V této práci jsou shrnuty dosavadní poznatky získané v oblasti (C)PSA, které také částečně navazují na česky psané práce uveřejněné v Chemických listech v polovině 80. let (viz např.<sup>4,5</sup>), a které se touto tematikou alespoň částečně zabývaly v rámci přehledů o elektrochemických rozpouštěcích metodách.

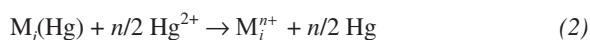


## 2. Princip měření v (C)PSA

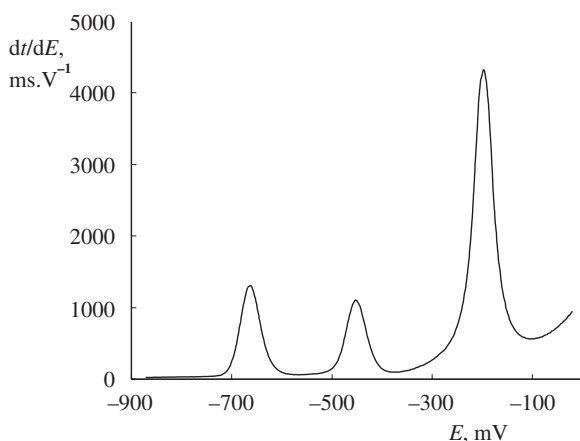
V podstatě se jedná o metodu, která využívá ve své klasické podobě elektrolytického nahromadění kovových iontů z míchaného okyseleného roztoku (jako takového nebo po předchozím odstranění kyslíku) na pracovní elektrodě při konstantním napětí ve formě rtuťových amalgámů<sup>1</sup>, čemuž odpovídá chemická rovnice (1)



kde  $M_i^{n+}$  označuje kov v určitém oxidačním stavu  $n$  a  $M_i(\text{Hg})$  kov ve formě amalgámu. Jako pracovní elektroda se tudíž osvědčila zpočátku visící rtuťová kapka, běžně používaná pro voltametrická měření. Po fázi nahromadění následuje zpětná oxidace, k níž dochází při rozpojeném elektrickém obvodu, respektive bez vloženého polarizačního napětí, působením chemických oxidovadel, což ve většině případů bývají rtuťnaté ionty přidávané předem do měřeného roztoku. Ději odpovídá následující chemická rovnice



Zaznamenaný časový průběh potenciálu (tzv. potenciogram) má tvar zón odpovídajících parciálním oxidacím jednotlivých kovů. Kvalitativním popisem potenciogramu je potenciál zóny, který zůstává po celou dobu oxidace téměř nezměněn a je charakteristický právě pro jeden kov přítomný v roztoku. Informace o kvantitě se získá z délky zóny, tzn. času, po který potenciál pracovní elektrody setrvává na dané hodnotě tak, aby došlo k úplnému přechodu kovu ze rtuťového filmu pracovní elektrody zpět do roztoku ve formě vlastních iontů (viz 2). Tato forma záznamu se v současnosti používá velmi zřídka. Důvodem je nahrazení dříve používané instrumentace spojené s mechanickým zapisovačem  $E-t$  křivek počítači řízenými analyzátoři poskytujícími záznamy v podobě



Obr. 1. Potenciogram zaznamenaný v roztoku obsahujícím směs kadmia, olova a mědi; experimentální podmínky: pracovní elektroda: skelný uhlík se rtuťovým filmem; základní elektrolyt: 0,1 M-HCl; potenciál akumulace: -900 mV; doba akumulace: 60 s; rychlost míchání roztokem: 1500 ot.min<sup>-1</sup>; oxidační činidlo: kyslík obsažený v roztoku. Hodnoty potenciálu jsou vztaženy proti potenciálu nasycené kalomelové elektrody. Jednotlivé píky (zleva doprava) odpovídají redukci Cd(II), 0,16 ppm; Pb(II), 0,16 ppm; Cu(II), 0,32 ppm

$dt/dE-E$  křivek (viz obr. 1). Tímto způsobem byla rovněž zkrácena doba analýzy z původních i několika desítek minut na minuty při současném zvýšení citlivosti metody. Získané potenciogramy obsahují zpravidla jeden i více píků v závislosti na počtu různých iontů přítomných v roztoku. Analogicky k již zmíněné interpretaci dat odpovídá kvalitativně každému píku potenciál  $E_p$ . Kvantitativním vyjádřením je zde plocha píku (nikoliv jeho výška), která však, v závislosti na způsobu záznamu dat, opět představuje čas, po který elektroda setrvala na daném potenciálu, nebo četnost, s jakou se daný potenciál během rozpouštění objevoval (viz dále varianty (C)PSA).

Právě princip chemické oxidace uplatňující se v rozpouštěcím kroku metody (C)PSA byl opomíjen v pracích uveřejněných na podobné téma již v 60. letech. Naopak byl považován za rušivý jev<sup>6,7</sup>, který nepříznivě ovlivňoval parametry stanovení a autoři doporučovali výhradně galvanostatické rozpouštění konstantním proudem (v této souvislosti označovali metodu jako chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzu).

### 2.1. Teoretický základ metody

V předcházejícím odstavci zmíněný měřicí princip metody (C)PSA je doprovázen matematickým popisem důležitých veličin, které jsou s touto tematikou spojeny. Jedná se především o vyjádření vztahu mezi potenciálem pracovní elektrody  $E$  a dobou rozpouštění  $t_R$  a dále pak o vzájemnou závislost mezi  $t_R$ , dobou nahromadění  $t_A$ , koncentrací sledovaného kovu v roztoku  $[M^{n+}]$  a v neposlední řadě také koncentrací chemického oxidovadla  $[A_j(\text{ox})]$ .

Matematické závislosti byly vztahovány především k elektrodě ze skelného uhlíku potažené rtuťovým filmem<sup>8,9</sup>. Předpokládá se, že jak proces nahromadění, tak rozpouštění je řízen difuzí, a to kovových iontů, respektive chemických oxidovadel k povrchu pracovní elektrody. Vyjádří-li se množství kovu (vyloučeného na pracovní elektrodě) a chemického oxidovadla (spotřebovaného během rozpouštění) pomocí Fickova zákona pro lineární difuzi<sup>8</sup>, vyplyne z jejich spojení vztah pro dobu rozpouštění analytu v podobě

$$t_R = \frac{[M^{n+}] t_A \delta_2 (\delta_1)^{-1}}{\sum \frac{n}{m_j} D(A_j(\text{ox})) [A_j(\text{ox})]} \quad (3)$$

kde  $[M^{n+}]$  a  $[A_j(\text{ox})]$  jsou již zmíněné koncentrace kovového iontu a možných chemických oxidovadel přítomných v roztoku,  $D(A_j(\text{ox}))$  difuzní koeficienty chemických oxidovadel,  $\delta_1$  a  $\delta_2$  tloušťky difuzních vrstev během nahromadění a rozpouštění. Podíl  $n/m_j$  vyjadřuje stechiometrický poměr reakce mezi kovovým iontem a možným oxidovadlem. Ze vztahu je patrné, jak lze prodloužit dobu rozpouštění, a tím zvyšovat citlivost měření. Jedná se především o vhodnou volbu doby nahromadění, koncentrace chemického oxidovadla a rychlostí míchání ve vztahu k tloušťkám obou difuzních vrstev.

Potenciál pracovní elektrody je dán Nernstovou rovnicí<sup>9</sup>

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[M^{n+}]}{[M(\text{Hg})]} \quad (4)$$

kde  $[M(\text{Hg})]$  je koncentrace kovu přítomného ve formě amalgámu ve rtuťovém filmu,  $E^\circ$  standardní oxidačně-redukční potenciál systému  $M^{n+}/M(\text{Hg})$ . Rovnice popisující  $E$ - $t$  křivku je uváděna ve tvaru<sup>9</sup>

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{2l}{\pi \sqrt{D_0}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\sqrt{t}}{t_R - t} \quad (5)$$

kde  $l$  představuje tloušťku rtuťového filmu,  $D_0$  difuzní koeficient rozpouštěných iontů a  $t$  je okamžitá hodnota času v průběhu rozpouštěcího kroku. Po derivaci rovnice (5) podle času se získá závislost  $dE/dt$  ve tvaru

$$\frac{dE}{dt} = \frac{RT(t_R + t)}{2t(t_R - t)} \quad (6)$$

kteřá může být rovněž využita jako jedna z forem vyjádření potenciogramu<sup>10</sup>. V tomto případě je kvalitativním údajem čas odpovídající maximu derivace, tzn. největší změně potenciálu v daném časovém intervalu, a kvantitu udává vzdálenost mezi jednotlivými derivačními maximy.

## 2.2. Varianty (chrono)potenciometrické rozpouštěcí analýzy

Kromě klasické metody využívající k oxidaci amalgámů kovů rtuťnatých iontů se lze v literatuře prakticky setkat nejen s použitím jiného chemického oxidovačla, ale i s odlišnými postupy nahromadění analytů, vyvolání a sledování analytického signálu za účelem zvýšení citlivosti apod. Těmto modifikacím budou věnovány následující odstavce.

### 2.2.1. Případy s nulovým proudem

#### 2.2.1.1. Klasická (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza

Na tomto místě je nezbytné k již zmíněnému principu PSA dodat několik skutečností. K chemické oxidaci nahromaděných kovů byl často využíván také kyslík rozpuštěný v měřených roztocích (7). Ten je vzhledem k hodnotě standardního redoxního potenciálu [ $E^\circ(\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e} = 2\text{H}_2\text{O}) = +1,229\text{ V}$ ] v porovnání s ionty  $\text{Hg}^{2+}$  [ $E^\circ(\text{Hg}^{2+} + 2\text{e} = \text{Hg}) = +0,854\text{ V}$ ] silnějším oxidovačlem<sup>11</sup>



a jeho maximální koncentrace v roztoku je dána rozpustností čistého kyslíku ve vodě v závislosti na hodnotách teploty a tlaku (tj. při laboratorní teplotě a normálním tlaku může být jeho koncentrace až  $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ). V roztocích pak je uváděna např. koncentrace  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (cit.<sup>12</sup>). Oxidační schopnost rozpuštěného kyslíku je ovlivněna především hodnotou pH. Tato závislost je popsána vztahem pro formální redoxní potenciál,  $E^{\text{of}} = E^\circ(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) - 0,0592 \text{ pH}$ . Na druhé straně oxidační schopnost  $\text{Hg}^{2+}$  iontů je silně potlačena v přítomnosti přebytku chloridových (ale i jiných halidových) ion-

tů, které tvoří stabilní chlorortuťnatan (resp. halortuťnatan). Tuto skutečnost lze také vyjádřit vztahem pro formální redoxní potenciál<sup>11</sup>,  $E^{\text{of}} = E^\circ(\text{Hg}^{2+}/\text{Hg}) - 0,0296 \log \alpha_{\text{Hg}(\text{Cl})}$ . Vypočteme-li koeficient vedlejší reakce  $\alpha_{\text{Hg}(\text{Cl})}$  za předpokladu, že rovnovážná koncentrace  $\text{Cl}^-$  v roztoku je 0,01 M a komplexní ionty mají podobu  $\text{HgCl}_i^{(2+)-i}$ , kde  $i = 1$  až 4, dostaneme hodnotu  $E^{\text{of}} = +0,556\text{ V}$ . Otázkou tedy zůstává, zda by měl být kyslík odstraňován z měřených roztoků v případě chemické oxidace pomocí  $\text{Hg}^{2+}$  iontů. V zásadě lze říci, že nemusí, pokud stanovené koncentrace kovů jsou v řádu jednotek až stovek ppb. V těchto případech lze dobře využít jak kyslík, tak směs obou oxidovačel. Oxidace exaktním množstvím rtuťnatých iontů, kdy odstranění kyslíku je nezbytné, se uvádí např. v případech, kdy je potřeba pracovat v koncentračních řádech  $\text{ng.l}^{-1}$  (cit.<sup>11,13</sup>). Zde je koncentrace kyslíku již příliš vysoká, rozpouštěcí krok velice krátký, a bylo by nutné provádět nahromadění po dobu několika desítek minut (uvádí se, že zpětná oxidace v případě stanovení kadmia a olova probíhá v roztoku nasyceném kyslíkem až 25× rychleji<sup>14</sup> než v případě jeho odstranění a přidání  $\text{Hg}^{2+}$  na koncentraci  $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ). Vzhledem ke zbytkům kyslíku v roztocích (i přes 10–15 minutové probublávání inertním plynem) a jeho přítomnosti nad měřeným roztokem se však nedoporučuje pracovat s koncentrací  $\text{Hg}^{2+}$  nižší než  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  z důvodu horší reprodukovatelnosti měření<sup>15</sup>. Za optimum se považují koncentrace  $\text{Hg}^{2+}$  do  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , a to jak vzhledem k reprodukovatelnosti měření, tak k množství použitého a z toxikologického hlediska nepopulárního elementu<sup>16</sup>. Dalším systémem, který může uplatnit své oxidační schopnosti (především v silně kyselých roztocích), je  $\text{H}^+/\text{H}_2$ , a to hlavně u kovů s negativnějším vylučovacím potenciálem.

Kovy jako arsen, rtuť, cín nebo antimon bývají stanovovány na elektrodě potažené zlatým filmem. Důvodem jsou příliš pozitivní hodnoty oxidačně-redukčních potenciálů. I když se ke zpětné oxidaci hlavně využívá konstantní proud, lze provádět i chemickou oxidaci např. při stanovení arsenu a rtuti zlatými ionty<sup>17,18</sup>. Z dalších oxidovačel lze uvést výčtem např. při stanovení rtuti manganistanové, dichromanové a ceričité ionty<sup>19</sup> nebo kationty železité<sup>20</sup> a z aniontů jodistan<sup>21</sup>.

#### 2.2.1.2. Reduktivní (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza

Tato varianta s chemickou redukcí analytu byla poprvé testována při stanovení manganu na platinové elektrodě, kdy manganaté ionty byly během fáze nahromadění oxidovány na oxid manganičitý, který byl poté redukován zpět pomocí hydrochinonu, popř. pyrogalolu<sup>22</sup>. Tím byla rozšířena možnost uplatnění této metody i na sledování redukce během rozpouštěcího kroku. V dalších pracích byly testovány jako chemická redukovadla např. amalgámy kovů<sup>23</sup> (sodík, zinek) při stanovení selenu, resp. halogenidy na rtuťové elektrodě nebo hexakvanoželeznatan<sup>24</sup> aplikovaný při stanovení manganu na elektrodě ze skelného uhlíku. Je nutné ale zdůraznit, že provedení těchto měření není zpravidla tak jednoduché jako při sledování oxidace. Se sodíkovým amalgámem bylo nutné např. pracovat při teplotě 50 °C bez přítomnosti kyslíku<sup>22</sup>. Tato varianta není příliš rozšířena hlavně z důvodu obtížného hledání vhodných redukčních činidel. Jiný a mnohem jednodušší přístup k provádění redukci v PSA představuje využití konstantního proudu.

### 2.2.1.3. Kinetická (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza

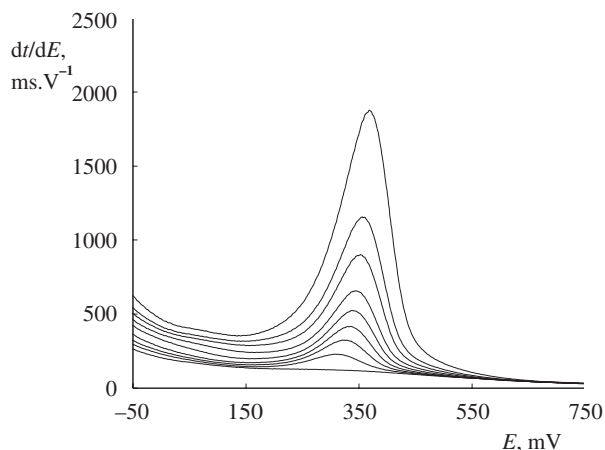
Tato varianta zmiňovaná v literatuře popisuje využití kinetického signálu k analytickým účelům<sup>21</sup> při stanovení rtuti na zlaté elektrodě za přítomnosti jodistanu jako chemického oxidovačla. Jodistanové ionty jsou více či méně schopny reoxidovat rtuť vyloučenou a zachycenou na pracovní elektrodě. V přítomnosti jodidových iontů navíc dochází v kyselém prostředí ke vzniku jodu, který převádí rtuť na tetrajodortuťatan. Předpokladem je, aby množství vyloučené rtuti bylo dostatečně malé a mohlo být zcela absorbováno zlatem (neměl by vznikat quazirtuťový film na povrchu zlaté elektrody). Za těchto podmínek způsobí podle autorů kinetika přechodu rtuti ze zlata na rozhraní roztok/povrch elektrody vznik kinetického signálu. V závislosti na množství vyloučené rtuti se signál objeví buď od samého začátku záznamu křivky, nebo se objeví po signálu odpovídajícímu oxidaci rtuti, která není absorbována zlatem. Praktická využitelnost pro stanovení rtuti je s ohledem na vypracované postupy stanovení na elektrodě se zlatým filmem, kde je k oxidaci používán konstantní proud, spíše teoretická.

### 2.2.2. Případy s nenulovým konstantním proudem

#### 2.2.2.1. Rozpouštěcí analýza s konstantním proudem

Pojmenování této varianty jako rozpouštěcí analýza s konstantním proudem pochází z doslovného překladu anglického termínu constant current stripping analysis (CCSA). Tento termín je velice hojně používán v literatuře. Princip těchto měření byl znám mnohem dříve, než byla popsána klasická metoda (C)PSA (viz konec odstavce 2).

Konstantní proud může být použit jak k oxidaci (kladná



Obr. 2. Kalibrační záznamy získané při stanovení zlata na uhlíkové pastové elektrodě; experimentální podmínky: pracovní elektroda: uhlíková pasta s trikresylfosfátem jako pastovou kapalinou; základní elektrolyt: 0,1 M-HCl; potenciál akumulace: +700 mV; doba akumulace: 45 s; rychlost míchání roztokem: 1500 ot.min<sup>-1</sup>; redukční činidlo: konstantní proud -3 μA. Hodnoty potenciálu jsou vztahy proti potenciálu nasycené kalomelové elektrody. Koncentrace zlata odpovídá (zdola nahoru) přídávky 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 a 400 μl 1,00.10<sup>-4</sup> M standardního roztoku AuCl<sub>4</sub> do 20 ml základního elektrolytu (tj. rozsahu do 2,00.10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup> Au)

hodnota), tak k redukci (záporná hodnota) analytu v závislosti na způsobu nahromadění. Jako příklad oxidace lze uvést stanovení mědi, rtuti, selenu<sup>25</sup>, kterým předchází jejich redukce při konstantním potenciálu pracovní elektrody pokryté zlatým filmem (podobně jako při použití rtuťového filmu bývá elektrodovým materiálem skelný uhlík). Opačným případem je stanovení niklu a kobaltu po adsorpčním nahromadění jejich iontů ve formě komplexů s dimethylglyoximem<sup>26</sup> na elektrodě se rtuťovým filmem nebo stanovení jodu a zlata na uhlíkové pastové elektrodě<sup>3</sup> (viz obr. 2). Použití konstantního proudu tak reprezentuje velmi jednoduchý a univerzální přístup k analýzám založeným na sledování redukce během rozpouštění. V obou případech se hodnoty proudu pohybují v desetinách až desítkách μA. I v tomto případě platí obecný princip, že čím vyšší je hodnota proudu, tím rychlejší je průběh děje v rozpouštěcím kroku, což vede k celkově nižší citlivosti měření. Proto se hodnoty proudu volí co nejnižší a zpravidla se pracuje v režimu s korekcí pozadí měření, kdy se odečítá záznam pořízený v roztoku základního elektrolytu od záznamu vzorku se stanovovaným iontem (popř. korekci provede analyzátor na základě matematického výpočtu). Otázka odstranění kyslíku je stále otevřená a lze konstatovat, že jeho odstranění není nutné.

#### 2.2.2.2. Adsorpční (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza

Adsorpční technika nahromadění byla studována v souvislosti se stanovením nukleových kyselin<sup>2,27</sup>. Tyto organické makromolekuly jsou velice důležitými indikátory zdraví lidského organismu a jejich poznání je tudíž věnována velká pozornost. Kratší řetězce čítající několik nukleotidů (zpravidla do 20 jednotek) byly adsorbovány na povrchu pastových elektrod a následnou oxidací konstantním proudem byl získán analytický signál odpovídající oxidaci guaninu. Adsorpční postup nahromadění byl rovněž aplikován při již zmíněném stanovení niklu a kobaltu<sup>26,28</sup>, kde byly ionty obou prvků zachycovány jako dimethylglyoximáty na povrchu pracovní elektrody (skelný uhlík) potažené rtuťovým filmem.

Lze tedy konstatovat, že adsorpce jako prekoncentrační technika našla své uplatnění i v PSA. Důležitým faktem je zde možnost transformace řady aplikací známých z adsorpční rozpouštěcí voltametrie (viz např. cit.<sup>29</sup>) na podmínky této metody a snaha docílit tímto způsobem zkvalitnění jejich analytických parametrů.

#### 2.2.2.3. Extrakční (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza

Tato technika jako další možná varianta (C)PSA byla poprvé použita při stanovení jodu na uhlíkové pastové elektrodě<sup>3</sup>. Svoji úlohu zde sehrála zejména kompozice tohoto typu elektrod, pevná (vodivá) část zastoupená uhlíkovým práškem a organická kapalina (izolant) schopná extrakce. Trikresylfosfát jako pastová kapalina pak umožnil účinně a selektivně extrahovat jod vzniklý elektrochemickou oxidací jodidů. Akumulace analytu byla dále podpořena tvorbou iontových párů mezi protonizovanou pastovou kapalinou a jodidovými (resp. trijodidovými, jodchloridovými apod.) ionty. K redukci byl použit konstantní proud a odstranění kyslíku

nebylo nutné. Podobným způsobem lze akumulovat i další anionty jako tetrachlorozlatitany (viz obr. 2) nebo chlorothal-litany<sup>3,30</sup>.

I když tento způsob nahromadění analytu byl doposud použit ojediněle<sup>3,30</sup>, lze zejména v souvislosti s využíváním uhlíkových pastových elektrod předpokládat jeho další rozšíření při analýzách vzorků, v nichž jsou hledané částice vázány ve formě komplexních aniontů, při analýzách organických látek iontového charakteru apod.

### 2.2.3. Techniky měření

Následující čtyři modifikace souvisejí především se zdokonalováním technik pro záznam měřených dat. Počítačové řízení analýz bylo využito několika principiálně podobnými způsoby ke zvyšování citlivosti stanovení, tj. k dosažení lepšího poměru mezi analytickým signálem a pozadím měření, na již známých aplikacích. Zvláštní skupinu tvoří měření v průtokových systémech.

#### 2.2.3.1. „Multichannel recording“ (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza

Jestliže se v (C)PSA původně sledoval rozpouštěcí krok jako závislost  $E-t$  mechanickým zapisovačem, počítač umožnil nahradit měření času četností výskytu daného potenciálu pracovní elektrody, se kterou se objevoval během rozpouštění<sup>31</sup>. Pro praktický záznam potenciogramu to znamená, že sledované potenciálové okno je hypoteticky rozděleno na potenciálové intervaly, kterým odpovídá v paměti počítače určitá adresa. V průběhu rozpouštěcího kroku je v určité frekvenci (řádově kHz) odečítán potenciál, jehož hodnoty tak odpovídají v každém okamžiku některému z daných intervalů. V důsledku toho každá paměťová adresa v konečném důsledku obsahuje informaci o počtu záznamů v jednotlivých intervalech (křivka je zobrazena jako závislost počtu záznamů vs  $E$ ). Tato data se dají rovněž vyjádřit i jako doba, po kterou setrval potenciál pracovní elektrody na dané hodnotě (závislost  $dt/dE$  vs  $E$ ). Tento způsob záznamu dat je používán i v současných analyzátoch. Jako příklad lze uvést přístroj firmy Radiometer Analytical S. A. (TraceLab PSU22), kde se odečítá potenciál pracovní elektrody s frekvencí 90 kHz při potenciálovém intervalu 2 mV.

Výsledkem a zároveň hlavním přínosem bylo jednak získání záznamů přímo v podobě píků (viz obr. 1) a dále celkové zvýšení citlivosti stanovení, jelikož bylo možné sledovat děje s velmi krátkou dobou rozpouštění. Zároveň se předpokládá, že tento způsob záznamu je i odolnější vůči šumu měření a také je paměťově méně náročný ve srovnání se situací, kdy by se paměťově zaznamenával potenciál v pravidelném časovém intervalu.

#### 2.2.3.2. Diferenční (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza

Zvýšit citlivost měření je možné několikanásobným opakováním sekvence nahromadění–rozpouštění. V tomto případě se tak děje v průběhu jediného záznamu<sup>32</sup> (budeme-li za záznam pokládat přechod potenciálu pracovní elektrody z počáteční hodnoty na konečnou). Nahromaděné analyty jsou rozpouštěny speciálním způsobem. Vždy, jakmile se potenciál

pracovní elektrody změní např. o hodnotu 50 mV, je na elektrody vloženo na velice krátkou dobu konstantní napětí zvětšené o např. 30 mV. Tím se částečně vykompenzuje posun potenciálu pracovní elektrody a během této doby může opětovně probíhat nahromadění analytu. Tento postup je opakován tak dlouho, dokud se nedocílí přechodu z počátečního potenciálu měření ke konečnému (tzn. např. z hodnoty  $-1,0$  V k  $-0,1$  V). Důležitou podmínkou této varianty je, aby rychlost, s jakou se analyty rozpouštějí, byla dostatečně vysoká, protože jedině tak se vytvoří v blízkosti pracovní elektrody dostatečně zkoncentrovaná zóna iontů pro následující parciální nahromadění.

#### 2.2.3.3. Víceznamová (chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza

Hlavní myšlenka této varianty je velice podobná předchozí modifikaci. Rozdíl v praktickém provedení je v tom, že po nahromadění analytu následuje jeho úplné rozpuštění<sup>31</sup>. Tento cyklus je opakován tak dlouho, dokud se nezíská požadovaný počet potenciogramů. Ty jsou průběžně sčítány v paměti počítače. Výsledek získaný z opakovaných měření povede ke zvýšení citlivosti stanovení pouze za předpokladu, který je uveden v předchozím odstavci, tzn. při dostatečně rychlém průběhu rozpouštění. Určitou nevýhodou této varianty je případ, kdy v roztoku jsou přítomny dva kovy, přičemž elektro-pozitivnější z nich je ve větším přebytku. To způsobí, že po dokončení jednoho cyklu, vlivem delší doby rozpouštění právě elektro-pozitivnějšího kovu, není koncentrace negativnějšího kovu u povrchu elektrody díky difuzi směrem do roztoku tak vysoká jako při rychlejší průběhu děje. Zamýšlené zvýšení citlivosti se v tomto případě míjí účinkem, což však neplatí o předchozí variantě (odstavec 2.2.3.2.), která je k tomuto účelu vhodnější.

#### 2.2.3.4. (Chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza s aplikovaným konstantním proudem během chemického rozpouštění

Tato technika si všímá možnosti zvýšení citlivosti měření na základě aplikace konstantního proudu během chemického rozpouštění. Jako příklad je v literatuře uvedeno stanovení kadmia na elektrodě se rtuťovým filmem a kyslíkem jako chemickým oxidovadlem<sup>33</sup>. Podstata měření spočívá v opětovném nahromadění rozpouštěného kovu redukujícím konstantním proudem v řádu jednotek  $\mu\text{A}$  ze zkoncentrované zóny u povrchu pracovní elektrody, což opět principiálně odpovídá variantám uvedeným v odstavcích 2.2.3.2. a 2.2.3.3. Autoři prováděli testovací měření na úrovni jednotek a desítek  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , což představuje optimální pracovní oblast metody PSA jako takové. Přesnost stanovení byla v tomto případě značně závislá na hodnotě redukujícího proudu a také na použitém základním elektrolytu.

#### 2.2.3.5. Měření v průtokových systémech

Závěrem této kapitoly by bylo vhodné uvést alespoň zmínku o měřeních v průtokových systémech, kde byla metoda (C)PSA díky své jednoduchosti často testována. Různé varianty navržených průtokových analyzátorů společně s praktickým využitím jsou uvedeny např. v přehledu<sup>10</sup>, kde je této



problematice věnována speciální kapitola. Na českém trhu je dostupný např. přístroj EcaFlow Model 120 firmy Istran Bratislava<sup>34</sup>. Základní výhodou práce s průtokovými systémy je bezesporu možnost měření s výměnou elektrolytů, kdy hromadící a rozpouštěcí krok může probíhat v různých prostředích<sup>35</sup>.

### 3. Pracovní elektrody

Jak již bylo jednou uvedeno, prvním typem pracovní elektrody použité v (C)PSA byla visící rtuťová kapka<sup>1</sup>. S ní provedli Jagner a Graneli vůbec první měření, když sledovali chování zinku, kadmia, olova a mědi při chemickém rozpouštění pomocí rtuťnatých iontů. Tato elektroda však byla záhy nahrazena skelným uhlíkem potaženým rtuťovým filmem<sup>36</sup> a používána ve dvou variantách, buď jako rotující nebo stacionární. Za těchto podmínek mohou být stanovovány pouze kovy s negativnějšími potenciály oxidace než odpovídá samotné rtuťi. Elementy jako arsen, selen, antimon i zmiňovaná rtuť musí být stanovovány na zlatých elektrodách. Ty jsou používány buď ve formě zlatého filmu vyloučeného na vhodných podkladech, jako jsou skelný uhlík<sup>37</sup> a vlákna na bázi uhlíku a platiny<sup>38</sup> nebo přímo jako zlaté mikroelektrody<sup>38,39</sup>. Z dalších mohou být jmenovány sitotiskové („screen-printed“, SPE) elektrody<sup>40</sup> a uhlíkové pasty<sup>41</sup> použité při stanovení rtuťi. Elektrody na bázi zlata (zlatého filmu) zároveň umožňují i stanovení kovů typických pro elektrody se rtuťovým filmem (např. olova, mědi<sup>39</sup>). Zvláštním případem je „měděný film“ vylučovaný na elektrodě ze skelného uhlíku, který je používán pro elektrolytické nahromadění rtuťi<sup>19</sup>. I když je měď zpětně oxidována dříve než rtuť, a neplní tudíž roli řádného filmu jako v případě rtuťi nebo zlata, spolehnutí obou kovů v podstatě usnadňuje (resp. umožňuje) stanovení nízkých obsahů rtuťi na prosté elektrodě ze skelného uhlíku (chemická oxidace se provádí manganistanem draselným). Dále byly jako podklad pro rtuťový film využity stříbrné elektrody při stanovení olova a kadmia klasickou metodou<sup>42</sup>, „screen-printed“ elektrody<sup>43</sup> při stanovení olova a konečně uhlíkové pastové elektrody při stanovení olova a mědi v sazí<sup>44</sup>.

Z dalších aplikací, které nesouvisí se stanovením na filmových elektrodách, lze uvést použití platiny jako pracovní elektrody pro stanovení manganu pomocí redukční (C)PSA<sup>22</sup>. Výčet materiálů může být uzavřen uhlíkovými pastovými elektrodami, jejichž aplikace v této oblasti (C)PSA lze nalézt v předchozím textu (odstavce 2.2.2.2. a 2.2.2.3.).

Otázka měření v průtokových systémech, popř. měření v malých objemech, byla řešena používáním různých mikroelektrod na bázi výše zmíněných materiálů. Nejčastěji se uplatnila uhlíková vlákna potažená jak rtuťovým<sup>39</sup>, tak zlatým filmem<sup>38</sup>. Dále pak byla testována vlákna z platiny a ze zlata<sup>38</sup>. Byla vyvinuta řada speciálních průtokových cel, o jejichž konstrukci lze najít více jinde<sup>10,34</sup>.

Řada prací se zabývala také srovnáním filmových a ryzých kovových elektrod<sup>38</sup>. Z nich vyplynul závěr, který potvrzuje, že mezi oběma typy neexistuje výraznější rozdíl. Ve většině případů jsou však používány filmové elektrody. V neprospěch kovových elektrod svědčí nejspíše známé těžkosti spojené s jejich používáním ve voltametriích měřeních, jako je pasivace povrchu spojená se ztrátou citlivosti měření apod.

### 4. Použití metody (C)PSA v analýze reálných vzorků

Doposud byla v textu uvedena celá řada aplikací v souvislosti s popisem jednotlivých experimentálních technik. Z nich vyplývá, že hlavní použití metody je spojeno s anorganickou analýzou převážně těžkých kovů (zinek, olovo, kadmium, měď, thallium, bismut, nikl, kobalt, rtuť, arsen nebo cín, viz tabulka I). Kromě toho se lze setkat i s menší skupinou aplikací z oblasti organické analýzy (viz tabulka II). Analyzované materiály je pak možné rozdělit podle původu do několika skupin.

První skupinu lze označit jako vzorky průmyslové, kde se vyžaduje zjištění stopových obsahů kovů v jiných kovech (např. olova v kadmii<sup>45</sup> a thalliu<sup>46</sup> aj.), oceli<sup>47</sup>, oxidu křemičitém<sup>48</sup>, benzínu<sup>49</sup> nebo v chemikáliích typu minerálních (HCl, HNO<sub>3</sub>)<sup>50</sup> a organických kyselin (sulfanilová, thioglykolová)<sup>42,31</sup>.

Další skupinu lze označit jako vzorky životního prostředí. Sem lze zařadit především analýzy různých typů vod, a to pitné, říční, mořské, odpadní<sup>25,43,52-56</sup>. Kromě již zmíněných prvků se zde lze setkat i se stanovením chromu<sup>52</sup>, molybdenu<sup>54</sup>, jodu<sup>3</sup> nebo kyslíku<sup>56</sup>. Z dalších vzorků je možno jmenovat různé sedimenty, kaly, horniny nebo půdy<sup>57-59</sup>. Metoda nalezla uplatnění i při analýze ovzduší. Jako příklad mohou být uvedena stanovení thallia (v popílku pronikajícím do ovzduší ze spalovacích procesů)<sup>60</sup> nebo rtuťi<sup>61</sup>.

Třetí skupinou jsou vzorky biologického původu, zastupují ji ve většině případů analýzy tělních tekutin na obsah kadmia, olova a popř. zinku. Známé jsou analýzy moči a krve<sup>62-64</sup>, případně lidských vlasů (stanovení arsenu)<sup>65</sup>.

Poslední a poměrně velkou skupinu představují analýzy potravin nejrůznějšího druhu. Oblíbené byly zpočátku analýzy nápojů, a to jak nealkoholických, tak alkoholických. Mezi nimi byly analyzovány např. džusy<sup>66</sup> a mléko<sup>67</sup>, nejrůznější destiláty, piva a vína<sup>68</sup>. Z dalších analyzovaných tekutin lze pro zajímavost uvést ještě např. sójovou omáčku<sup>69</sup> nebo ocet<sup>70,71</sup>. Pokud se týče pevných vzorků, lze v literatuře nalézt odkazy na analýzy mouky<sup>72</sup>, sušeného mléka<sup>73</sup>, kuchyňské soli<sup>3</sup>, obilovin<sup>74</sup>, rybiho masa<sup>75,76</sup> i zeleniny (stanovení germania v česneku)<sup>77</sup>.

Organická analýza je reprezentována zatím velmi úzkou skupinou praktických aplikací. Mezi ně se řadí například nepřímé stanovení redukcí sacharidů v nápojích, jejichž obsah se určuje na základě měření úbytku měďnatých iontů z roztoku<sup>78</sup>, nebo nepřímá stanovení nitrilotriocetové kyseliny<sup>79</sup> a EDTA ve vodách přes komplex s bismutem<sup>80</sup>. Vezme-li se v úvahu publikační aktivita autorů, pak se největší pozornosti těší v této oblasti studium nukleových kyselin DNA a RNA pomocí adsorpční (C)PSA<sup>2,81,82</sup>.

Další přehledové tabulky praktických i modelových stanovení je možné objevit v celé řadě prací<sup>8,10,83,84</sup>.

### 5. Klady a zápory související s použitím (C)PSA

(Chrono)potenciometrická rozpouštěcí analýza bývá nejčastěji parametrově srovnávána s rozpouštěcí voltametrií (SV), neboť obě metody jsou používány ke stejným účelům, což mimo jiné znamená, že pro stanovení prvků nebo iontů

Tabulka I  
Přehled praktických stanovení z oblasti anorganické analýzy pomocí PSA

| Prvek          | Typ vzorku, matrice          | Elektroda     | Roztok  | Ref.   |
|----------------|------------------------------|---------------|---|--------|
| Cu, Pb         | průmyslový, Cd               | HMDE          | 0,1 M-KNO <sub>3</sub>                              | 45     |
| Pb             | průmyslový, Tl               | GCE           | 0,1 M-NaClO <sub>4</sub>                            | 46     |
| As             | průmyslový, ocel             | GCE-Au        | 7 M-HCl   | 47     |
| Pb             | průmyslový, SiO <sub>2</sub> | GCE           | 1 M-HCl   | 48     |
| Org. Pb        | benzin                       | GCE           |   | 49     |
| Cd, In         | HCl, HNO <sub>3</sub>        | GCE-Hg        |   | 50     |
| As, Cd, Hg, Pb | kys. sulfanilová             | Ag-Hg, GCE-Hg |   | 42     |
| Cd, Cu, Pb     | kys. thioglykolová           | Ag-Hg         | 0,1 M-KCl   | 51     |
| Pb             | pitná voda                   | SPE-Hg        | 0,02 M octanový pufr                                | 53     |
| Cr             | pitná voda                   | GCE           |   | 52     |
| Cu, Hg, Pb, Se | říční a mořská voda          | GCE-Au        | 0,05 M-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 0,002 M-KCl | 25     |
| Cd, Cu, Pb, Zn | mořská voda                  | GCE-Hg        | 0,015 M-HNO <sub>3</sub> , 20 ppm Hg <sup>2+</sup>  | 53     |
| Mo             | mořská voda                  | GCE-Hg        |   | 54     |
| Ni, Co         | odpadní a mořská voda        | GCE-Hg        |   | 55     |
| I <sub>2</sub> | minerální vody               | CPE           | 0,1 M-HCl   | 3      |
| O <sub>2</sub> | vody                         | GCE-Hg        |   | 56     |
| Cd, Pb         | půdy                         | GCE-Hg        |   | 57     |
| Cu, Pb         | sedimenty                    | GCE-Hg        |   | 58     |
| Sn             | horniny                      | GCE-Au        |   | 59     |
| Tl             | popílek                      | GCE-Hg        |   | 60     |
| Hg             | ovzduší                      | GCE           |   | 61     |
| Cd, Pb         | krev, krevní sérum, moč      | GCE-Hg        | 0,5 M-HCl   | 62–64  |
| As             | vlasý                        | FIA           |   | 65     |
| Pb             | džusy, mléko                 | GCE-Hg        | HCl na pH 1   | 66, 67 |
| Cd, Cu, Pb     | alkoholické nápoje           | GCE-Hg        | HCl na pH 1   | 68     |
| Pb             | sójová omáčka, ocet          | GCE-Hg        |   | 69–71  |
| Pb             | mouka                        |               |   | 72     |
| Cd, Cu, Pb     | mléko v prášku               | FIA           |   | 73     |
| I <sub>2</sub> | kuchyňská sůl                | CPE           | 0,1 M-HCl   | 3      |
| Cd, Cu, Pb, Zn | obiloviny                    |               |   | 74     |
| As, Hg         | rybí maso                    |               |   | 75, 76 |
| Ge             | česnek                       | GCE-Hg        |   | 77     |

Tabulka II  
Přehled praktických stanovení z oblasti organické analýzy pomocí PSA

| Sloučenina                    | Matrice                 | Elektroda | Roztok                          | Ref.      |
|-------------------------------|-------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|
| Redukující cukry              | nápoje, med, marmelády  | GCE-Hg    | obsahuje ionty Cu <sup>2+</sup> | 78        |
| NTA                           | odpadní a přírodní vody | GCE-Hg    | obsahuje ionty Bi <sup>3+</sup> | 79        |
| EDTA                          | voda                    | GCE-Hg    | obsahuje ionty Bi <sup>3+</sup> | 80        |
| DNA, RNA                      | modelový roztok         | CPE       | 0,2 M octanový pufr             | 2, 81, 82 |
| Daunomycin, PCB, aflatoxin B1 | říční voda              | DNA-SPE   |                                 | 89        |

využívají podobné pracovní elektrody a principy nahromadění.

Nejdůležitější rozdíl a zároveň výhoda je v tom, že v (C)PSA během rozpouštěcí fáze neprochází pracovní elektrodou žádný proud. To znamená, že tato technika není zatěžována interferencemi elektroaktivních částic přítomných v měřených roztocích. V praxi tudíž není nutné odstraňovat z roztoků kyslík (naopak může být využit jako chemické oxidovadlo) a je

možné měřit i ve vzorcích po jejich mineralizaci (např. koncentrovanou HNO<sub>3</sub>), po níž obsahují celou řadu nitrosloučenin<sup>8</sup>.

Další výhodou je automatická optimalizace rozpouštěcího kroku<sup>8</sup>, tzn. že potenciál pracovní elektrody se nemění lineárně, nýbrž během oxidace jednotlivých kovů zůstává téměř neměnný, dokud nedojde k jejich úplnému rozpuštění. To vše se děje při velice krátkých rozpouštěcích časech (řádově od

desítek a stovek milisekund až po několik sekund v závislosti na množství látky vyloučené během nahromadění, popř. na koncentraci chemického oxidovadla nebo hodnotě konstantního proudu), zatímco u SV je nutné pro zvýšení citlivosti měření volit velice nízké hodnoty nárůstu napětí spojené s prodloužením doby rozpouštění.

Nespornou výhodou pro instrumentaci je měření času namísto proudu. Čas může být měřen nejen s vyšší přesností a správností, ale i s vyšším rozlišením<sup>8</sup>. Potenciometrické analyzátory oproti polarografům zároveň nemusí obsahovat prvky umožňující různé průběhy napětí (lineární, pulsní, a.c. apod.) vkládaného na elektrody během rozpouštění.

Hlavní úskalí (C)PSA jsou spojeny se samotným principem této metody, což představuje práce se rtuťovými elektrodami (ať už visící kapkou nebo rtuťovým filmem). Při stanovení kovů na těchto elektrodách dochází ke vzniku řady intermetalických sloučenin<sup>85</sup>, které mohou způsobovat snižování, ale i zvyšování analytických signálů sledovaných kovů (pozitivní nebo negativní chybu). K nejznámějším popisovaným příkladům těchto sloučenin patří směs kovů zinek–měď, která se však dá upravit přidávkou galia<sup>86</sup>.

Jelikož se pracuje hlavně s filmovými elektrodami, je nutné dbát i na to, aby vyloučený film měl dostatečnou tloušťku a nebyl příliš ovlivňován dodatečným vylučováním další rtuti během fáze nahromadění, kdy roztok obsahuje určitou koncentraci iontů  $Hg^{2+}$  pro následnou oxidaci. Podobně nesmí kolísat ani koncentrace zmíněného oxidovadla, takže povrch elektrody by měl být dostatečně malý ve srovnání s objemem roztoku.

Konečně lze polemizovat i o tom, zda (C)PSA (a stejně tak i rozpouštěcí voltametrie) je nebo není vhodná pouze ke stanovení malého počtu kovových prvků<sup>21</sup>. Faktem však zůstává, že většina prací se zabývala a zabývá stanovením olova a kadmia, méně pak zinku, mědi, thallia nebo arsenu. Celkem bylo doposud popsáno stanovení asi 30 prvků, z nichž více než polovina je prakticky využitelná včetně několika nekovových prvků jako jsou např. jod nebo kyslík.

## 6. Závěr

Vzhledem k publikační aktivitě autorů, která vzrostla do poloviny 90. let na ustálený počet přibližně 40 prací ročně, se dá konstatovat, že i nadále přetrvává zájem a aktivita v oblasti výzkumu popisované techniky. Jedním ze směrů vývoje v posledních letech jsou např. přenosné analyzátory pro podmínky „polní“ analýzy<sup>87,88</sup> nebo experimenty s různými typy senzorů pro stanovení nukleových kyselin<sup>2,27,89</sup>, popř. senzorů vyrobených na bázi těchto sloučenin, které pak slouží ke stanovení jiných látek s afinitou k DNA<sup>89</sup>. I když bylo obecně shledáno využití (C)PSA jako nepřilíší široké, a z tohoto pohledu bývá metoda někdy kritizována, lze z této skutečnosti vyvodit jeden velice důležitý pozitivní fakt. Pro nejčastěji diskutované prvky, olovo a kadmium (částečně i zinek, měď, arsen), bylo do současnosti vypracováno mnoho postupů pro jejich stanovení v nejrozličnějších matricích, a to od nejjednodušších vzorků přírodních vod až po složité biologické materiály jako jsou krev a moč (lze se zde setkat i se stanoveními na úrovni 0,02 ppb (cit.<sup>90</sup>)). I díky tomu je metoda (C)PSA v těchto případech plně srovnatelná např. s AAS-ETA (cit.<sup>83</sup>), a to jak poskytovanou správností, tak přesností. Autoři jsou přesvěd-

čení, že metoda (C)PSA ještě stále nevyčerpala své možnosti, zejména pokud jde o aplikace nových typů elektrodoých materiálů (např. uhlíkových past) či výroba miniaturních „kapsních“ analyzátorů vybavených mikrosenzory připravenými sítotiskovou technikou. Příkladem může být komerčně nabízený „hand-held“ analyzátor kovů<sup>91</sup> nebo přístroj na způsob „osobního dozimetru“ pro stanovení olova v krvi<sup>92</sup>, pracující zřejmě také na principu (C)PSA.

*Tato práce byla podporována projektem 203/99/0044 Grantové agentury České republiky.*

## LITERATURA

- Jagner D., Graneli A.: *Anal. Chim. Acta* 83, 19 (1976).
- Cai X., Rivas G., Farias P. A. M., Shiraiishi H., Wang J., Paleček E.: *Electroanalysis* 8, 753 (1996).
- Vytřas K., Konvalina J.: *Electroanalysis* 10, 787 (1998).
- Lexa J., Štulík K.: *Chem. Listy* 79, 58 (1985).
- Hátle M.: *Chem. Listy* 80, 808 (1986).
- Bruckenstein S., Bixler J.: *Anal. Chem.* 37, 786 (1965).
- Kemula W., Strojek J. W.: *J. Electroanal. Chem.* 12, 1 (1966).
- Jagner D.: *Analyst* 107, 593 (1982).
- Chau T. C., Li D., Wu Y. L.: *Talanta* 29, 1083 (1982).
- Estella J. M., Tomás C., Cladera A., Cerda V.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 25, 91 (1995).
- Švancara I., Ostapczuk P., Arunachalam J., Emons H., Vytřas K.: *Electroanalysis* 9, 26 (1997).
- Zakharova Z. A., Volkova V. H.: *Zh. Anal. Khim.* 42, 445 (1987).
- Jagner D., Sahlin E., Renman L.: *Talanta* 41, 515 (1994).
- Jagner D.: *Anal. Chem.* 51, 342 (1979).
- Jagner D.: *Anal. Chem.* 50, 1924 (1978).
- Ostapczuk P.: *Clin. Chem.* 38, 1995 (1992).
- Jagner D., Josefson M., Westerlund S.: *Anal. Chem.* 53, 2144 (1981).
- Huiliang H., Jagner D., Renman L.: *Anal. Chim. Acta* 207, 37 (1988).
- Jagner D.: *Anal. Chim. Acta* 105, 33 (1979).
- Teng J., Feng D., Zhou D.: *Jinan Liyi Xuebao* 3, 41 (1988); *Chem. Abstr.* 110, 241734 (1989).
- Cladera A., Estela J. M., Cerda V. J.: *J. Electroanal. Chem.* 288, 99 (1990).
- Christensen J. K., Kryger L.: *Anal. Chim. Acta* 118, 53 (1980).
- Christensen J. K., Kryger L., Mortensen J., Rasmussen J.: *Anal. Chim. Acta* 121, 71 (1980).
- Zhang Y., Jiao K., Liu C., Liu X.: *Anal. Chim. Acta* 282(1), 125 (1993).
- Gil E. P., Ostapczuk P.: *Anal. Chim. Acta* 293, 55 (1994).
- Gil E. P., Ostapczuk P.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 346, 952 (1993).
- Wang J., Cai X., Jonsson C., Balakrishnan M.: *Electroanalysis* 8, 20 (1996).
- Nan C. G., Cardwell T. J., Vincente-Beckett V. A., Hamilton I. C., Scollary G. R.: *Electroanalysis* 7, 1068 (1995).
- Zuhri A. Z. A., Voelter W.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 360, 1 (1998).
- Konvalina J., Vytřas K., v knize: *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí* (Vytřas K., Kellner J., Fischer J., ed.), str. 99. Univerzita Pardubice, Pardubice 1999.

31. Mortensen J., Ouziel E., Skov H. J., Kryger L.: *Anal. Chim. Acta* 112, 297 (1979).
32. Kryger L.: *Anal. Chim. Acta* 120, 10 (1980).
33. Zie Y., Huber C. O.: *Anal. Chim. Acta* 263, 63 (1992).
34. Beinrohr E., Čakrt M., Dzurow J., Jurica L., Broekaert J. A. C.: *Electroanalysis* 11, 1137 (1999).
35. Hu A., Dessy R. E., Graneli A.: *Anal. Chem.* 55, 320 (1983).
36. Jagner D.: *Anal. Chem.* 50, 1924 (1978).
37. Jagner D., Josefson M., Westerlund S.: *Anal. Chem.* 53, 2144 (1981).
38. Huiliang H., Jagner D., Renman L.: *Anal. Chim. Acta* 201, 1 (1987).
39. Baranski A. S., Quong H.: *Anal. Chem.* 58, 407 (1986).
40. Wang J., Tian B.: *Anal. Chim. Acta* 274, 1 (1993).
41. Khaled E., Konvalina J., Vytřas K., Hassan H. N. A.: *v tisku*.
42. Zhang Q., Huang Z.: *Qingdao Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* 10(3), 37 (1997); *Chem. Abstr.* 128, 21982 (1998).
43. Wang J., Tian B.: *Anal. Chem.* 64, 1706 (1992).
44. Konvalina J., Khaled E., Vytřas K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 1047 (2000).
45. Duyckaerts G., de Graeve J., Massaux J.: *Chim. Analyt. (Paris)* 17, 647 (1972).
46. Doronin A. N., Goncharov J. A.: *Zh. Anal. Khim.* 31, 309 (1976).
47. Lexa J., Štulík K.: *Talanta* 30, 845 (1983).
48. Goncharov J. A., Doronin A. N.: *Zh. Anal. Khim.* 31, 897 (1976).
49. Jagner D., Renman L., Wang Y.: *Anal. Chim. Acta* 267, 165 (1992).
50. Kim J. C., Kim H. B., Ryang Y. M.: *Choson Minjujuui Inmin Konghwaguk Kwahagwon Tongbo* 3, 35 (1996); *Chem. Abstr.* 127, 59934 (1997).
51. Maksimkina L. M., Martynovskaya L. N., Khitova N. V.: *Zavod. Lab.* 62(5), 17 (1996).
52. Jaya S., Rao T. P., Rao G. P.: *Bull. Electrochem.* 2, 131 (1986).
53. Jagner D., Josefson M., Westerlund S.: *Anal. Chim. Acta* 129, 153 (1981).
54. Hua C., Jagner D., Renman L.: *Anal. Chim. Acta* 192, 103 (1987).
55. Nan C. G., Cardwell T. J., Vincente-Beckett V. A., Hamilton I. C., Scollary G. R.: *Electroanalysis* 7, 1068 (1995).
56. Fayyad M., Tutunji M., Ramakrishna R. S., Taha Z.: *Anal. Lett.* 20, 529 (1987).
57. Pyle S. M., Nocerino J. M., Deming S. N., Palasota J. A., Palasota J. M., Miller E. R., Hillman D. C., Kuharic C. A., Cole W. H., et al., Watson M. A., Nichols K. D.: *Environ. Sci. Technol.* 30, 204 (1995).
58. Madsen P. P., Drabaek I., Sørensen J.: *Anal. Chim. Acta* 151, 479 (1983).
59. Wang E., Sun W.: *Anal. Chim. Acta* 172, 365 (1985).
60. Hoyer B., Skov H. J., Kryger L.: *Anal. Chim. Acta* 188, 205 (1986).
61. Zhang Y., Han J.: *Zhonghua Laodong Weisheng Zhiye-bing Zazhi.* 8, 350 (1990); *Chem. Abstr.* 115, 63565 (1991).
62. Jagner D., Josefson M., Westerlund S.: *Anal. Chim. Acta* 128, 155 (1981).
63. Jagner D., Josefson M., Westerlund S., Aaren K.: *Anal. Chem.* 53, 1406 (1981).
64. Ostapczuk P.: *Clin. Chem. (Winston-Salem, N. C.)* 38, 1995 (1992).
65. Cai Z., Qi D.: *Fenxi Huaxue.* 20, 862 (1992); *Chem. Abstr.* 117, 246648 (1992).
66. Mannino S.: *Analyst* 107, 1466 (1982).
67. Mannino S., Bianco M.: *J. Micronutr. Anal.* 1, 47 (1985).
68. Jagner D., Westerlund S.: *Anal. Chim. Acta* 117, 159 (1980).
69. Xiang Y.: *Zhongguo Tiaowepin.* 4, 28 (1988); *Chem. Abstr.* 110, 6469 (1989).
70. Dai Y., Zhao X.: *Lihua Jianyan, Huaxue Fence* 32, 235 (1996); *Chem. Abstr.* 126, 271495 (1997).
71. Mannino S.: *Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.* 15, 11 (1986).
72. Suturovic Z., Marjanovic N.: *Zito Hleb.* 19, 215 (1992).
73. Almestrand L., Jagner D., Renman L.: *Talanta* 33, 991 (1986).
74. Wang Y.: *Shanghai Huanjing Kexue.* 9, 31 (1990); *Chem. Abstr.* 113, 189871 (1990).
75. Adeloju S. B., Young T. M.: *Anal. Lett.* 30, 147 (1997).
76. Wang S., Lin Q., Zhou J., Feng D., Li D.: *Jinan Daxue Xuebao* 1, 80 (1989).
77. Dexiong F., Peihui Y., Zhaoliang Y.: *Talanta* 38, 1493 (1991).
78. Nanos C. G., Karayannis M. I.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 340, 253 (1991).
79. Fayyad M.: *Anal. Chem.* 59, 209 (1987).
80. Fayyad M., Tutunji M., Taha Z.: *Anal. Lett.* 21, 1425 (1988).
81. Cai X., Rivas G., Farias P. A. M., Shiraishi H., Wang J., Fojta M., Paleček E.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40, 41 (1996).
82. Wang J., Rivas G., Cai X., Chicharro M., Dontha N., Luo D., Paleček E., Nielsen P. E.: *Electroanalysis* 9, 120 (1997).
83. Ostapczuk P.: *Anal. Chim. Acta* 273, 35 (1993).
84. Henze G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 315, 438 (1983).
85. Psaroudakis S. V., Efstathiou C. E.: *Analyst* 112, 1587 (1987).
86. Scollary G. R., Cardwell T. J., Cattral R. W., Nan C. G.: *Electroanalysis* 5, 685 (1993).
87. Schmidt J. C.: *Adv. Instrum. Control* 50, 47 (1995).
88. Yarnitzky C., Wang J., Tian B.: *Talanta* 51, 333 (2000).
89. Marrazza G., Chianella I., Mascini M.: *Anal. Chim. Acta* 387, 297 (1999).
90. Jagner D., Sahlin E., Renman L.: *Talanta* 41, 515 (1994).
91. <http://www.chemistry.nmsu.edu/~research/sensors/srg/research.html> (Nov 6, 2000).
92. [http://www.easinc.com/products/blood\\_lead/esa\\_leadcare.html](http://www.easinc.com/products/blood_lead/esa_leadcare.html) (Nov 6, 2000).

**J. Konvalina and K. Vytřas** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice*): **The Present Use of (Chrono)potentiometric Stripping Analysis**

A review with 92 references summarises available information on potentiometric stripping analysis and its modifications developed and described in the period of last 25 years. Examples of its practical use are given mainly for inorganic analysis but some applications in organic analysis are also mentioned.



# SUBSTITÚCIE V POLOHÁCH 2 A 2' C<sub>2</sub>-SYMETRICKÝCH 1,1'-BINAFTYLOVÝCH DERIVÁTOV – SUBSTITUČNÉ REAKCIE AROMATICKÝCH ZLÚČENÍN SO STEREOCHEMICKÝM ASPEKTOM

MARTIN PUTALA

Katedra organickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: putala@fns.uniba.sk

Došlo dne 16.X.2000

Kľúčové slová: binaftyl, *cross-coupling*, chiralita, racemizácia, stereoselektivita, substitúcia, C<sub>2</sub>-symetria

## Obsah

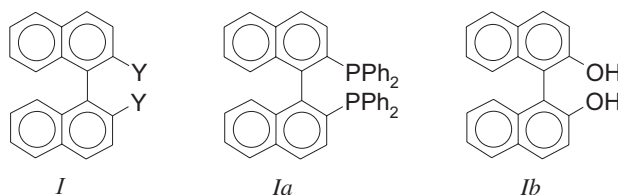
1. Úvod
2. Konfiguračná stabilita 1,1'-binaftylových derivátov
3. Syntéza vhodných substrátov
4. Stereokonzervatívny substitučný reakcií v polohách 2 a 2' neracemických C<sub>2</sub>-symetrických 2,2'-substituovaných 1,1'-binaftylových derivátov
  - 4.1. Súvisiace stereochemické otázky
  - 4.2. Substitučné reakcie bisdiazóniových solí
  - 4.3. Substitúcie cez organokovové intermediáty
  - 4.4. Substitúcie katalyzované komplexami prechodných kovov
  - 4.5. Iné typy substitúcií
5. Záver

## 1. Úvod

Mimoriadny záujem o stereoselektívnu syntézu v posledných dvoch desaťročiach obrátil pozornosť aj na neprírodné chirálne zlúčeniny (artificial chiral-pool). Jednou z ich najvýznamnejších skupín sa stali bezpochyby 2,2'-substituované 1,1'-binaftylové deriváty<sup>1-3</sup>, a to pre ich stereochemickú osobitosť (axiálna chiralita), konfiguračnú stabilitu a pomerne ľahkú dostupnosť. V súčasnosti počet publikácií venovaných štúdiu syntézy, vlastností a využitia týchto derivátov ročne presahuje počet 200. 2,2'-Substituované 1,1'-binaftylové deriváty našli využitie v stereoselektívnej syntéze (chirálny ligandy a pomocné látky), pri separácii chirálnych zlúčenín (chirálny hostiteľské zlúčeniny, modifikátory stacionárnych fáz pre kvapalinovú chromatografiu) a pri príprave nových materiálov (chirálny materiály s nelineárnymi optickými vlastnosťami, polyméry).

Uplatnenie sa týka predovšetkým C<sub>2</sub>-symetrických 2,2'-substituovaných 1,1'-binaftylových derivátov *I*, teda rovnako substituovaných na oboch naftalénových jednotkách. Prítomnosť C<sub>2</sub>-symetrickej stereogénnej osi totiž zjednodušuje niektoré stereochemické problémy súvisiace s využitím takýchto zlúčenín, napr. znižuje počet možných stereoizomérnych komplexov pri koordinácii takéhoto ligandu k prochirálnemu kovovému katalytickému centru. Z ligandov uvedeného typu

so širokým uplatnením v stereoselektívnej katalýze je chemickej verejnosti veľmi dobre známy BINAP (*Ia*) a BINOL (*Ib*).



C<sub>2</sub>-Symetrické 2,2'-substituované 1,1'-binaftylové deriváty je možné pripraviť v neracemickej forme tromi základnými metódami<sup>1</sup>:

- 1) stereoselektívnym *couplingom* dvoch naftalénových jednotiek v polohách 1 (substituovaných v polohe 2),
- 2) štiepením príslušných racemických binaftylových derivátov na stereoizoméry (získaných najmä nestereoselektívnym *couplingom* dvoch naftalénových jednotiek; tento prístup je vhodný pre deriváty obsahujúce polárne skupiny ako OH, SH, NH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>H, PR<sub>2</sub>, POR<sub>2</sub>),
- 3) stereokonzervatívnymi substitučnými reakciami (reakciami so zachovaním konfigurácie binaftylového fragmentu) v polohách 2 a 2' iných ľahko dostupných neracemických 2,2'-substituovaných 1,1'-binaftylových derivátov.

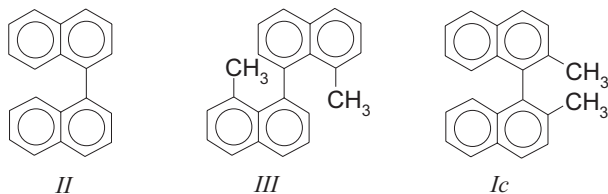
Posledná uvedená metóda je významná najmä pre syntézu takých derivátov, ktoré nie sú priamo dostupné prvými dvoma metódami. Rovnako môže predstavovať vhodnejšiu, alternatívnu cestu k niektorým iným neracemickým 2,2'-substituovaným 1,1'-binaftylovým derivátom. Kým substitúcie v ostatných polohách ako 2 a 2' sú štandardné operácie, substitúcia v polohách 2 a 2' vyžaduje osobitnú pozornosť, aby nedošlo k racemizácii, keďže zaniká a vzniká väzba v polohách, kde sterickej odpudzovanie týchto substituentov je rozhodujúce pre konfiguračnú stabilitu. Z hľadiska reaktivity sú tieto reakcie sťažené sterickej faktorom – prítomnosťou objemného naftalénového substituenta v susednej polohe 1, resp. 1'. Jedná sa o veľmi zaujímavý systém, ktorý so sebou prináša stereochemický aspekt – otázku zachovania priestorového usporiadania na aromatickom systéme pri substitučných reakciách – jedinečný pre tieto binaftylové deriváty.

## 2. Konfiguračná stabilita 1,1'-binaftylových derivátov

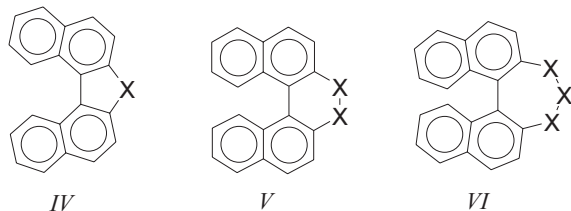
Pre pochopenie problematiky zachovania konfigurácie pri substitúciách v polohách 2 a 2' 1,1'-binaftylových derivátov je potrebné poznať základné trendy konfiguračnej stability tohto typu zlúčenín<sup>1</sup>.

Samotný nesubstituovaný 1,1'-binaftalén (*II*) má racemizáciu bariéru 95 kJ.mol<sup>-1</sup>, ktorej zodpovedá pomalá racemizácia (atropoizomerizácia) pri laboratórnej teplote. Konfiguračná stabilita sa čiastočne zvýši zavedením substituentov do polôh 8 a 8', napr. racemizácia bariéra 8,8'-dimetyl-1,1'-binaftalénu (*III*) je 120 kJ.mol<sup>-1</sup> (*t*<sub>1/2</sub> = 11 h pri 100 °C).

Neväzbová interakcia (sterické odpudzovanie) substituentov v polohách 2 a 2' má oveľa významnejší účinok na zvýšenie konfiguračnej stability 1,1'-binaftylových derivátov. Pre porovnanie, racemizácia 2,2'-dimetyl-1,1'-binaftalénu (*Ic*) sa nepozoruje ani pri zahrievaní na 240 °C.

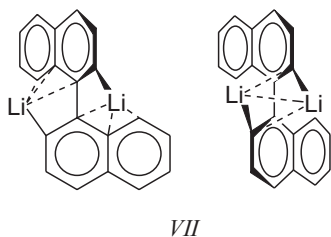


Konfiguračná stabilita 2,2'-substituovaných 1,1'-binaftylových derivátov však môže byť významne ovplyvnená väzbovou interakciou substituentov v polohách 2 a 2'. V derivátoch s navzájom premostenými polohami 2 a 2' je racemizácia bariéra z poloh 2 a 2' ovplyvňovaná len aktivačnou energiou konformačných premien vzniknutého prikondenzovaného kruhu a rozhodujúci vplyv na konfiguračnú stabilitu ostane na neväzbovej interakcii substituentov v polohách 8 a 8'. Ak sú polohy 2 a 2' premostené len jedným atómom (*IV*) (prikondenzovaný päťčlánkový kruh), naftalénové jednotky sa navzájom oddialia a racemizácia bariéra klesne až na 45–65 kJ.mol<sup>-1</sup> (rýchla racemizácia už pri záporných teplotách). U derivátov premostených dvoma atómami (*V*) (prikondenzovaný šesťčlánkový kruh) boli nájdené racemizácia bariéry v rozmedzí 100–120 kJ.mol<sup>-1</sup> (racemizácia pri teplotách okolo 100 °C). Deriváty premostené v polohách 2 a 2' aspoň tromi atómami (*VI*), kde sú geometriou prikondenzovaného sedem- a viacčlánkového kruhu naftalénové jednotky viac natočené k sebe (nad seba), stúpne vplyv neväzbovej interakcie v polohách 8 a 8' natoľko, že tieto sú dostatočne konfiguračne stále aj pri vyšších teplotách.



X = CR<sub>2</sub>, CO, NR, PR, P(O)R, O, S, atď

So špecifických prípadov možno spomenúť 2,2'-dilítiový derivát *VII*, v ktorom sa predpokladá viaccentrová väzba medzi binaftylom a lítium, vrátane väzbovej interakcie medzi atómami lítia. V dôsledku toho je racemizácia bariéra odhadovaná na 70–80 kJ.mol<sup>-1</sup>, t.j. určitá konfiguračná stabilita bola pozorovaná pri reakciách pri teplotách do -45 °C (cit.<sup>4</sup>).



### 3. Syntéza vhodných substrátov

Substitučné reakcie C<sub>2</sub>-symetrických 1,1'-binaftylových derivátov v polohách 2 a 2' boli študované na týchto 2,2'-disubstituovaných substrátoch: bisdiazóniová soľ *Id* (Y = N<sub>2</sub><sup>+</sup>), bistriflát *Ie* (X = OTf), dibromid *If* (X = Br) a diiodid *Ig* (X = I). Všetky sú pomerne ľahko dostupné v enantioméne čistej forme. Ich laboratórna syntéza vychádza z 2-naftolu<sup>3,5</sup>, ako je znázornené v schéme 1. Dibromid *If* a diiodid *Ig* sa pripravujú z bisdiazóniovej soli *Id*, ako je podrobnejšie opísané v kapitole 4.2. Pre obe intermediátne zlúčeniny, BINOL (*Ib*) a DABN (*Ih*) sú opísané efektívne postupy na štiepenie na enantioméry<sup>1,5,6</sup>, kde už prvá kryštalizácia je postačujúca pre získk oboch enantiomérov v >96 % e.e. (schéma 1).

### 4. Stereokonzervatívnosť substitučných reakcií v polohách 2 a 2' neracemických C<sub>2</sub>-symetrických 2,2'-substituovaných 1,1'-binaftylových derivátov

#### 4.1. Súvisiace stereochemické otázky

V literatúre sa možno stretnúť s dvoma spôsobmi vyjadrenia konfigurácie binaftylových derivátov – pomocou deskriptorov (*R*) a (*S*) alebo (*M*) a (*P*)<sup>7</sup>. Pre všetky 2,2'-substituované 1,1'-binaftylové deriváty (*M*) zodpovedá (*R*) a (*P*) zodpovedá (*S*). V tomto článku sa používa exaktnejšie priradenie absolútnej konfigurácie pomocou deskriptorov (*R*) a (*S*).

Treba upozorniť na skutočnosť, že u C<sub>1</sub>-symetrických (nerovnako) 2,2'-substituovaných 1,1'-binaftylových derivátov pri oboch spôsoboch vyjadrenia konfigurácie treba vyšetriť

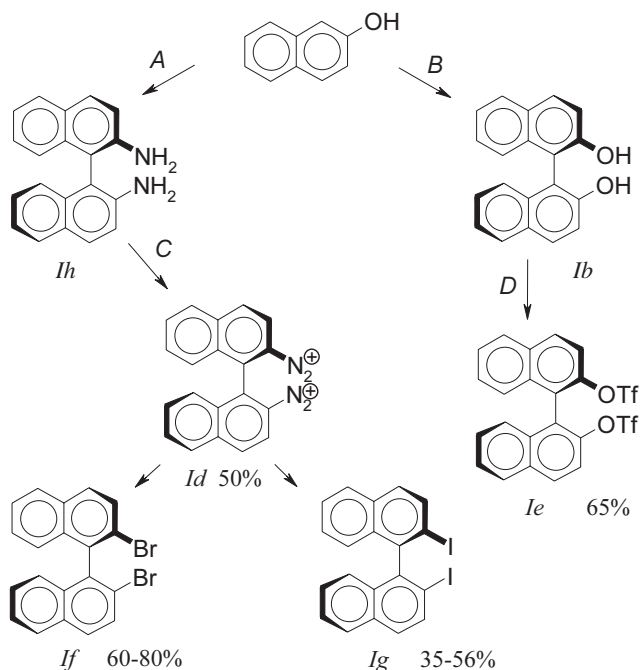
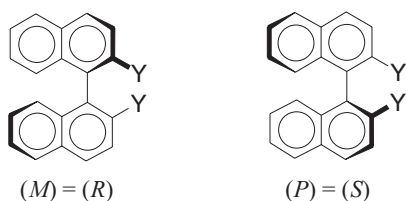


Schéma 1. A: 1) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 200 °C, 72 h; 2) štiepenie. B: 1) FeCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 60 °C, 2 h; 2) štiepenie. C: 1) NaNO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, py, -5 °C, 30 min. D: Tf<sub>2</sub>O, py, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 30 min; py: pyridín, Tf: trifluórmetánsulfonyl



prioritu substituentov (podľa Cahna-Ingolda-Preloga), konkrétne uhlík C(2) vers. C(8a) a C(2') vers. C(8a'), tj. zjednodušene substituent v polohe 2 oproti C(8) a v polohe 2' oproti C(8'). Tak napr. pri postupnej stereokonzervatívnej premene diiodidu *Ig* na dimetylový derivát *Ic* sa absolútna konfigurácia dvakrát zmení (schéma 2).

Pri rovnakej substitúcii v oboch polohách 2 a 2' 1,1'-binaftylových derivátov sa teda absolútna konfigurácia nemení. Ďalšia možnosť v našom prípade je len strata stereogénnej informácie v priebehu reakcie v dôsledku racemizácie. Zmena priestorového usporiadania na opačné (zmena konfigurácie) pri rovnakej substitúcii v polohách 2 a 2' nebola opísaná a z hľadiska mechanizmu reakcie je ťažko predstaviteľná.

V súvislosti s uvedeným je vhodnejšie pri substitučných reakciách v polohách 2 a 2' hovoriť o zachovaní priestorového usporiadania binaftylového fragmentu, či stereogénnej informácie zo substrátu na produkt; zatiaľ čo retencia či zachovanie konfigurácie je menej presné vyjadrenie. To vlastne platí aj pri substitučných reakciách na C(sp<sup>3</sup>), kde pri zachovaní priestorového usporiadania sa konfigurácia nemení v prípade, že sa nemení priorita substituentov. I tak je pojem retencia konfigurácie skôr asociovaný so zachovaním priestorového uspo-

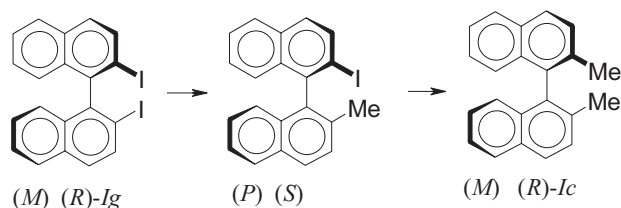


Schéma 2

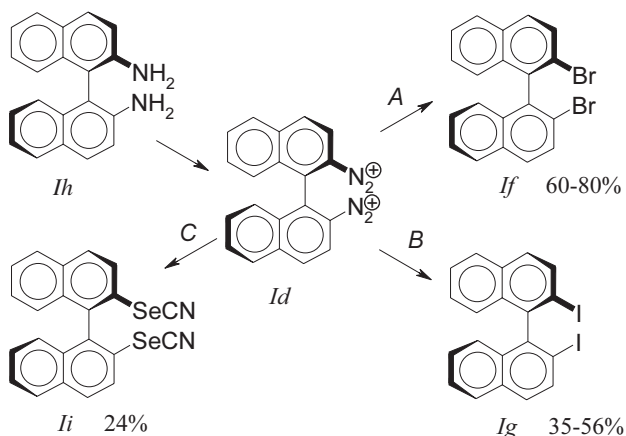


Schéma 3. A: 1) MBr<sub>3</sub><sup>-</sup>; 2) KBr, 95 °C. B: 1) MI<sub>3</sub><sup>-</sup>; 2) KI, 90 °C. C: KSeCN. M = Hg, Cd, Zn

riadania na reakčnom centre, ktoré je zároveň centrom chirality (stereogénnym centrom). Na rozdiel od toho sa v našom prípade jedná o substitúciu v dvoch polohách a zachovanie priestorového usporiadania (stereogénnej informácie) štruktúry obsahujúcej stereogénnu os (axiálna chiralita), tj. reakčné centrum nie je priamo totožné s prvkom chirality. V tomto článku je preto na zjednodušené synonymické označenie skutočnosti, že je zachované priestorové usporiadanie v priebehu reakcie, používaný k označeniu reakcie pojem stereokonzervatívny.

#### 4.2. Substitučné reakcie bisdiazóniových solí

V literatúre sú opísané stereokonzervatívne premeny enantioméne čistých bisdiazóniových solí *Ie* na iné enantioméne čisté (≥98 % e.e.) 2,2'-disubstituované 1,1'-binaftylové deriváty – dibromid *If* (cit.<sup>5</sup>), diiodid *Ig* (cit.<sup>5</sup>) a diselenokyanát *Ih* (cit.<sup>8,9</sup>). Bisdiazóniové soli *Ie*, pripravené diazotáciou DABN (*Ii*), boli použité *in situ* (v prípade nekatalyzovanej substitúcie vedúcej k diselenokyanátu) alebo boli izolované s MY<sup>3-</sup> kontraaniómom (v prípade substitúcie sprostredkovaných prechodnými kovmi 10. skupiny – M, Y = Br a I) a následne pyrolyzované na dibromid *If*, resp. diiodid *Ig*. Keďže izolácia bisdiazóniových solí *Ie* s inertným kontraaniómom je pomerne problematická, ich využitie pre ďalšie substitučné reakcie vrátane *cross-couplingových* reakcií je obtiažne (schéma 3).

#### 4.3. Substitúcie cez organokovové intermediáty

Rôzne C<sub>2</sub>-symetrické 2,2'-disubstituované 1,1'-binaftylové deriváty boli pripravené z dibromidu *If* (alebo diiodidu *Ig*) cez 2,2'-dilítiový alebo bis(halogenomagnéziový) derivát následnou reakciou s príslušným elektrofilom<sup>1</sup>. Avšak spravidla ako racemické zmesi alebo ako produkty len s malou hodnotou e.e. Pravdepodobnou príčinou bude izomerizácia 1,1'-binaftalén-2,2'-diyldimetalového intermediátu v podmienkach reakcie (schéma 4).

Napr. pokusy o prípravu neracemického BINAP-u (*Ia*) týmto prístupom boli neúspešné<sup>10</sup>, i keď boli uskutočnené pri veľmi nízkych teplotách. Postup bol úspešný<sup>4</sup>, len ak sa použilo pomerne nepraktické rozpúšťadlo – dimetyléter (schéma 5).

Enantioméne čistý alebo významne obohatený produkt využívajúc tento syntetický prístup sa podarilo získať ale len v nízkom výťažku v prípadoch, keď produkt tvorí diastereoizoméne asociáty, napr. racemickú zmlúčeninu. Takým spôsobom boli pripravené disilylové deriváty *Ik* a *Im* (cit.<sup>11</sup>), pravdepodo-

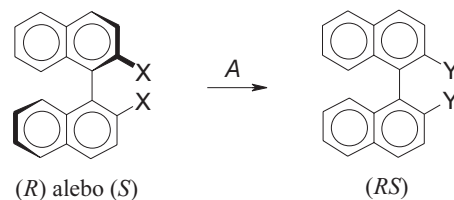


Schéma 4. A: 1) BuLi alebo Mg; 2) Y<sup>+</sup>; *Ig*: X = Br; *Ih*: X = I, Y = B(OR)<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>R, SiR<sub>3</sub>, GeR<sub>3</sub>, SnR<sub>3</sub>, PR<sub>2</sub>, P(O)R<sub>2</sub>, HgCl, atď.

dobne enantiomérne obohatené v priebehu separácie produktu kvapalinovou chromatografiou alebo kryštalizáciou. Autori však neuvádzajú zvyšnú materiálovú bilanciu (schéma 6).

Oxidatívny *coupling* dilítia VII poskytol D<sub>2</sub>-symetrický dimér binaftyly VIII (cit.<sup>12</sup>) v nízkom výťažku. *o*-Tetrafenylénový derivát VIII pravdepodobne tiež tvorí racemickú zlúčeninu, čo môže byť príčinou zvýšenia e.e. izolovaného produktu oproti substrátu. Navyše produkt s (*R,S*)-konfiguráciou (na 1,1'-binaftylových prepojeniach) nie je stabilný (nevytvára sa druhý diastereoizomér) (schéma 7).

Skutočne úspešný bol tento prístup len v prípade, že sa v reakcii použije málo reaktívny elektrofil, ktorý nereaguje s butyllítom. V takom prípade je možné elektrofil IX pridať skôr, než sa generuje dilítium VII (na kvantitatívnu generáciu dilítia VII je pri -78 °C potrebné asi osem hodín) a metalácia a následná reakcia s elektrofilom prebiehajú postupne najskôr v jednej a potom v druhej polohe. Tento originálny prístup bol využitý pre syntézu binaftylom premostených biscyklopropantienylových ligandov *In* (cit.<sup>13,14</sup>), slúžiacich pre prípravu chirálnych *ansa*-metalocénov. Bolo pozorovaná len čiastočná racemizácia (schéma 8).

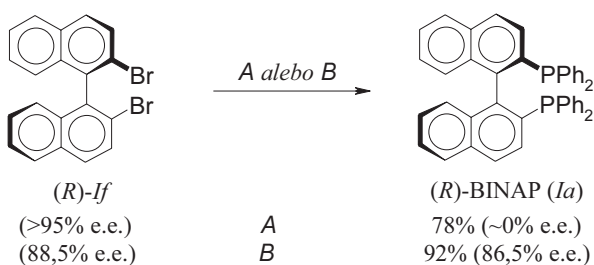


Schéma 5. A: 1) 4,5 *t*-BuLi, THF, -90 °C; 2) 4,5 ClPPh<sub>2</sub>, -90 °C. B: 1) 2,2 *t*-BuLi, Me<sub>2</sub>O, -44 °C, 90 s; 2) 10 ClPPh<sub>2</sub>, -131 °C → -78 °C, 12 h

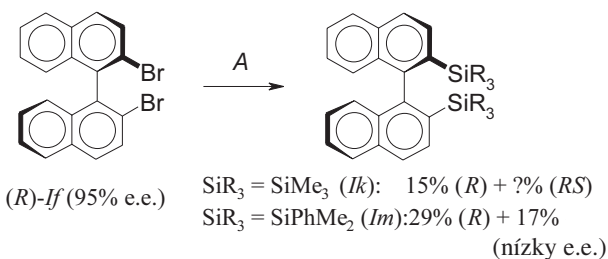


Schéma 6. A: 1) 2,2 BuLi, THF, -60 °C, 30 min.; 2) 4 Me<sub>3</sub>SiCl alebo PhMe<sub>2</sub>SiF, -90 °C → -60 °C, 4 h

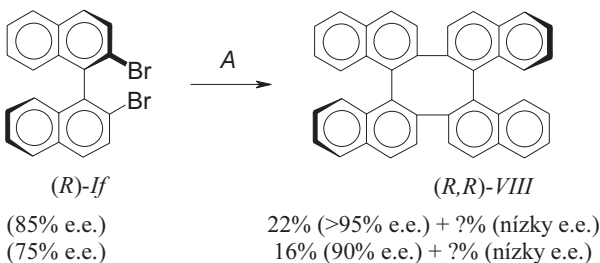


Schéma 7. A: 1) 2,5 BuLi, Et<sub>2</sub>O, -35 °C, 2 h; 2) 6 CuBr<sub>2</sub>, -78 °C → 25 °C, 12 h

#### 4.4. Substitúcie katalyzované komplexami prechodných kovov

Najlepšie výsledky z hľadiska stereokonzervatívnosti pri substitúciach v polohách 2 a 2' 1,1'-binaftylových derivátov poskytujú *cross-couplingové* reakcie a ich heteroanalógy katalyzované komplexami prechodných kovov. Z C<sub>2</sub>-symetrických derivátov boli študované na bistrifláte *Ie* a diiodide *Ig*. Bistriflát *Ie* je o niečo ľahšie dostupný, výhodou diiodidu *Ig* je vyššia reaktivita pri tomto type reakcií.

Najefektívnejšia príprava enantiomérne čistého BINAP-u (*Ia*) bola vyvinutá firmou Merck<sup>15</sup> práve využívajúc tento typ reakcie – komplexom niklu katalyzovanou reakciou bistriflátu *Ie* s difenylfosfánom, prebiehajúcou s úplným zachovaním stereogénnej informácie. Enantiomérne čistý BINAP (arzénový analóg BINAP-u, *Io*) bol pripravený<sup>16</sup> s využitím tej istej metódy (schéma 9).

Opísaná bola tiež efektívna metóda syntézy enantiomérne čistého dikarboxylátu *Ip* z bistriflátu *Ie* komplexom paládia katalyzovanou metoxykarboxyláciou<sup>17</sup> (schéma 10).

Kyanácia bistriflátu *Ie* nebola dostatočne efektívna<sup>18,19</sup> (v prípade A pre otravu niklového katalyzátora produktom monokyanácie<sup>16</sup>), i keď prebiehala stereokonzervatívne (schéma 11).

Lepší výťažok dinitrilu *Ir* poskytla kyanácia diiodidu *Ig* (cit.<sup>19</sup>). Stereokonzervatívnosť reakcie tu závisí od použitého kyanáčného činidla (schéma 12).

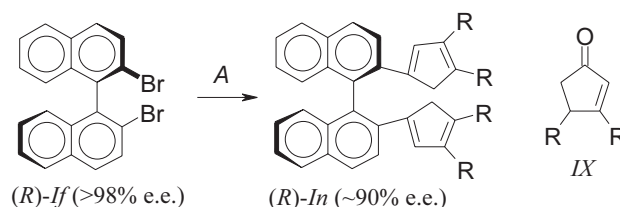


Schéma 8. A: 1) 2,1 BuLi, THF, -78 °C, 1 h; 2) 2,4 IX, -78 °C, 12 h; 3) H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>; R, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CM<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, (CH)<sub>4</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>

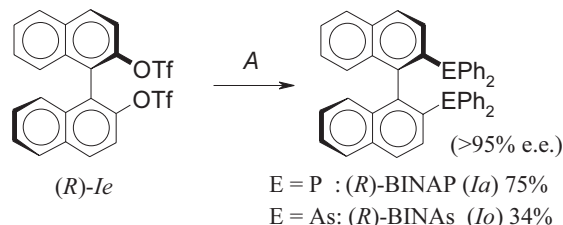


Schéma 9. A: 2,3 HEPPh<sub>2</sub>, 10 mol.% NiCl<sub>2</sub>dpppe, DABCO, DMF, 100 °C, 3 dni; dpppe: 1,2-bis(difenylofosfanyl)etán

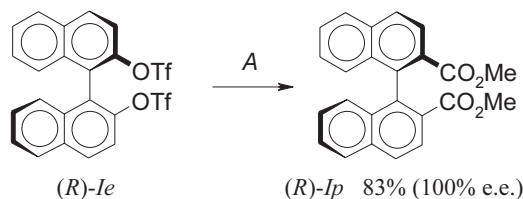


Schéma 10. A: CO (150 kPa), MeOH, 15 mol.% Pd(OAc)<sub>2</sub>dppp, (*i*-Pr)<sub>2</sub>NEt, DMSO, 80 °C, 72 h; dppp: 1,2-bis(difenylofosfanyl)propán



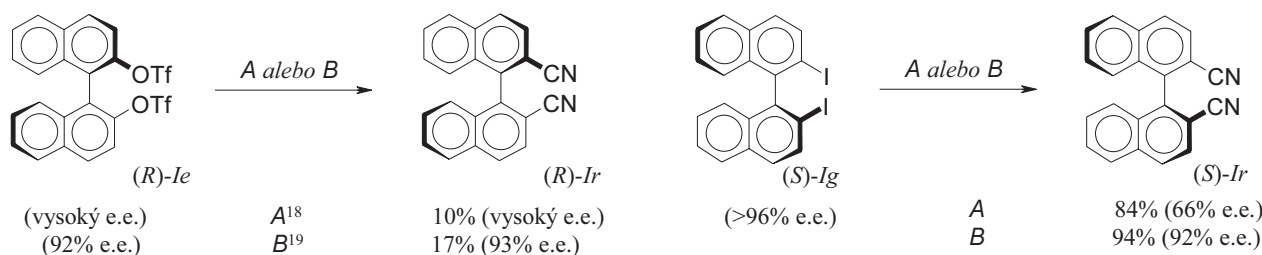


Schéma 11. A: 2,2 KCN, 10 mol.% NiBr<sub>2</sub>/4 PPh<sub>3</sub>/3 Zn, MeCN, reflux, 16 h. B: 1,2 Zn(CN)<sub>2</sub>, 10 mol.% Pd(dba)<sub>2</sub>/2 dppf, DMF, 90 °C, 16 h; dba: 1,5-difenylopenta-1,4-dién-3-ón (dibenzylidénacetón), dppf: 1,1'-bis(difenyldfosfanyl)ferocén

Schéma 12. A: 4 KCN, 20 mol.% CuI, 10 mol.% Pd(dba)<sub>2</sub>/4 PPh<sub>3</sub>, THF, reflux, 16 h. B: 4 Zn(CN)<sub>2</sub>, 10 mol.% Pd(dba)<sub>2</sub>/2 dppf, DMF, 90 °C, 16 h

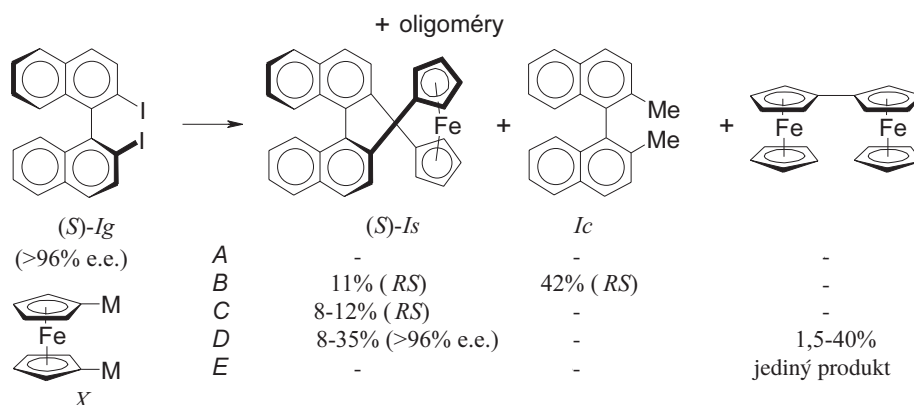


Schéma 13. A: 1,1 Xa, 5 mol.% Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>/L, LiCl, THF alebo NMP, reflux, 72 h. B: 1,1 Xb, 5 mol.% Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>/4 PPh<sub>3</sub>, LiCl, THF, reflux, 48 h. C: 1,1 Xc, 5 mol.% Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, THF, reflux, 24 h. D: 2 Xd, 10 mol.% PdCl<sub>2</sub>(dppf), THF, 25 °C, 72 h. E: 2 Xe, (katalyzátor), THF, reflux, 72 h; Xa: M = SnBu<sub>3</sub>; Xb: M = SnMe<sub>3</sub>; Xc: M = B(OH)<sub>2</sub>; Xd: M = ZnCl; Xe: M = Cu.SMe<sub>2</sub>

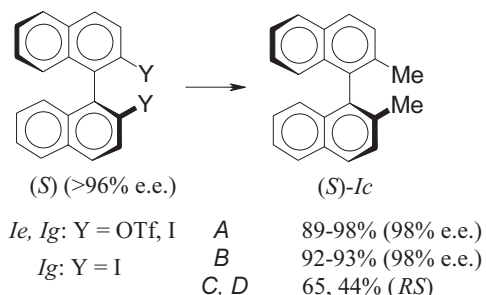


Schéma 14. A: 3 MeMgI alebo MeMgBr, 10 mol.% NiCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> alebo NiCl<sub>2</sub>dppp alebo NiCl<sub>2</sub>dppe, Et<sub>2</sub>O, reflux, 24 h. B: 3 Me<sub>2</sub>Zn, 10 mol.% Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> alebo NiCl<sub>2</sub>dppe, THF, reflux, 24 h. C: 3 Me<sub>4</sub>Sn, 10 mol.% Pd[P(o-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]<sub>4</sub>, THF, reflux, 24 h. D: 3 MeSnBu<sub>3</sub>, 10 mol.% Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, THF, reflux, 24 h

Pri štúdiu syntézy binaftylom premosteného ferocénu *Is* z diiodidu *Ig* a príslušného dimetaloderivátu ferocénu *X* sa zistilo<sup>20</sup>, že chemoselektivita a stereokonzervatívnosť významne závisia od použitej organokovovej zlúčeniny. Zatiaľ čo Suzukiho a Stilleho *couplingová* reakcia viedla k takmer úplnej racemizácii binaftylového fragmentu, pri Negishiho *couplingovej* reakcii sa získal enantioméne čistý produkt (schéma 13).

Pravdepodobnou príčinou rozdielneho stereochemického výsledku reakcie je rozdiel v reaktivite použitých organokovových zlúčenín. Kým pri použití reaktívnejšej organozinocnatej zlúčeniny *Xd* reakcia prebehne postupne najskôr v jednej a potom v druhej polohe, pri reakcii s menej reaktívnymi organokovmi *Xb*, *Xc* prebehne najskôr oxidatívna adícia paládia v oboch polohách a až potom reakcia s organokovom. V takomto intermediáte je pravdepodobná väzbová interakcia substituentov v polohách 2 a 2', či pohyblivá viaccentrová

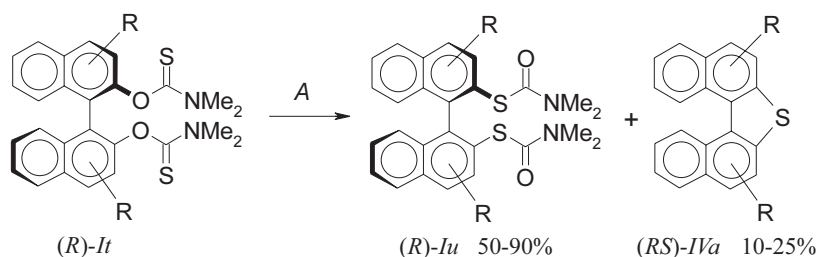


Schéma 15. A: 265–285 °C, 20–22 min; R = H, 3-Me, 3,4 benzo

väzba atómu paládia i so susednou naftalénovou jednotkou (pozorovaná v binaftylových komplexoch paládia<sup>21</sup>), vedúca k racemizácii.

Podobný stereochemický priebeh reakcií bol pozorovaný aj pri metylácii 1,1'-binaftylových 2,2'-elektrofilov<sup>22</sup>. Vychádzajúc z bistriflátu *Ie* prebieha metylácia len s Grignardovým činidlom, a to stereokonzervatívne<sup>22-25</sup>. Táto reakcia je v súčasnosti využívaná ako najefektívnejšia metóda prípravy dimetylového derivátu. Z diiodidu *Ig* bola uskutočnená metylácia<sup>22</sup> Grignardovou, Negishiho a Stilleho *cross-couplingovou* reakciou, pričom prvé dve poskytli enantioméne čistý produkt, zatiaľ čo pri reakcii s tetrametylstánanom došlo k úplnej racemizácii binaftylového fragmentu (schéma 14).

#### 4.5. Iné typy substitúcií

Enantioméne čisté ditioly boli získané z derivátov BINOL-u (*Ib*) (cit.<sup>26,27</sup>). Kľúčovým stupňom bol Newmanov-Kwartov tepelný prešmyk bistiokarbamátov *It*, ktorý za kontrolovaných podmienok prebieha bez racemizácie (schéma 15).

### 5. Záver

Substitúcie v polohách 2 a 2' neracemických C<sub>2</sub>-symetrických 2,2'-substituovaných 1,1'-binaftylových derivátov predstavujú dôležitú syntetickú cestu k niektorým derivátom takéhoto typu.

Dôležitým je pri týchto reakciách stereochemický aspekt – aby prebiehali stereokonzervatívne, tj. so zachovaním priestorového usporiadania (konfigurácie) na binaftylovom fragmente. Rozhodujúce je preto, aby v priebehu reakcie nedošlo k vzájomnej väzbovej interakcii v polohách 2 a 2', nakoľko sterické odpudzovanie substituentov v týchto polohách (kde zároveň dochádza k vzniku a zániku väzby) je rozhodujúce pre konfiguračnú stabilitu 1,1'-binaftylových derivátov. K väzbovej interakcii nedochádza najmä vtedy, ak reakcie prebiehajú v týchto polohách izolovane (postupne). Stereokonzervatívne prebiehajú opísané substitúcie bisdiazóniových solí *Id* a väčšina reakcií dielektrofilov *Ie* (ditriflát) a *Ig* (diiodid) katalyzovaných prechodnými kovmi. Pri *cross-couplingových* reakciách sa dá racemizácii predísť výberom reaktívnejšieho organokovu. Substitúcia cez konfiguračne málo stále dilítium VII a následnú reakciu s elektrofilom vedie spravidla (okrem niektorých špecifických prípadov) k tvorbe racemických alebo len málo enantioméne obohatených produktov.

Uvedený stereochemický aspekt je jedinečný pri doteraz opísaných substitučných reakciách aromatických zlúčenín.

*Táto práca bola podporovaná grantami 1/7013/20 VEGA SR a UK/1528/97, /3904/98, /3724/99, /79/2000, /80/2000.*

#### LITERATÚRA

- Putala M.: Enantiomer *4*, 243 (1999).
- Pu L.: Chem. Rev. *98*, 2405 (1998).
- Rosini C., Franzini L., Raffaelli A., Salvadori P.: Synthesis *1992*, 503.
- Brown K. J., Berry M. S., Lingenfelter D., Murdoch J. R., Waterman K. C.: J. Am. Chem. Soc. *106*, 4717 (1984).
- Brown K. J., Berry M. S., Murdoch J. R.: J. Org. Chem. *50*, 4345 (1985).
- Wang Y., Sun J., Ding K.: Tetrahedron *56*, 4447 (2000).
- Eliel E. L., Wilen S. H.: *Stereochemistry of Organic Compounds*, kap. 14. Wiley, New York 1994.
- Tomoda S., Iwaoka M.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. *1988*, 1283.
- Tomoda S., Iwaoka M., Yakushi K., Kawamoto A., Tanaka J.: J. Phys. Org. Chem. *1*, 179 (1988).
- Myashita A., Takaya H., Souchi T., Noyori R.: Tetrahedron *40*, 1245 (1984).
- Hoshi T., Shionori H., Suzuki T., Ando M., Hagiwara H.: Chem. Lett. *1999*, 1245.
- Rajca A., Safronov A., Rajca S., Wongsritatanakul J.: J. Am. Chem. Soc. *122*, 3351 (2000).
- Halterman R. L., Ramsey T. M.: Organometallics *12*, 2879 (1993).
- Halterman R. L., Ramsey T. M.: J. Organomet. Chem. *530*, 225 (1997).
- Cai D. W., Payack J. F., Hughes D. L., Verhoeven T. R., Reider P. J.: J. Org. Chem. *59*, 7180 (1994).
- Kojima A., Boden C. D. J., Shibasaki M.: Tetrahedron Lett. *38*, 3459 (1997).
- Ohta T., Ito M., Inagaki K., Takaya H.: Tetrahedron Lett. *34*, 1615 (1993).
- Kurz L., Lee G., Morgans D., Waldyke M. J., Ward T.: Tetrahedron Lett. *31*, 6321 (1990).
- Kasák P., Putala M.: Collect. Czech. Chem. Commun. *65*, 729 (2000).
- Kasák P., Mikláš R., Putala M.: J. Organomet. Chem., v tlači.
- Kočovský P., Malkov A. V., Vyskočil Š., Lloyd-Jones G. C.: Pure Appl. Chem. *71*, 1425 (1999).
- Kasák P., Putala M.: nepublikované výsledky.
- Takahashi O., Kameda M., Maruoka K.: J. Am. Chem. Soc. *121*, 6519 (1999).
- Xiao D., Zhang Z., Zhang X.: Org. Lett. *1*, 1679 (1999).
- Gingras M., Dubois F.: Tetrahedron Lett. *40*, 1309 (1999).
- Fabbri D., Delogu G., De Lucchi O.: J. Org. Chem. *58*, 1748 (1993).
- Cossu S., De Lucchi O., Fabbri D., Valle G., Painter G. F., Smith R. A. J.: Tetrahedron *53*, 6073 (1997).

**M. Putala** (*Department of Organic Chemistry, Faculty of Natural Science, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Substitutions in Positions 2 and 2' of C<sub>2</sub>-Symmetric Binaphthyl Derivatives. Substitution Reactions of Aromatic Compounds with Stereochemical Aspects**

The review deals with a unique type of substitution reactions of aromatic compounds in which retention of configuration is questionable, namely with substitutions in positions 2 and 2' of C<sub>2</sub>-symmetric 2,2'-disubstituted 1,1'-binaphthyl derivatives. The stereochemical aspect results from the fact that the nonbonding interaction of substituents in positions 2 and 2' (where bond formation and breaking occur in the course of substitution) is decisive for configuration stability of these axial chiral compounds. As a rule, the mentioned reactions proceed stereoconservatively (with retention of spatial arrangement of the binaphthyl moiety) if there is no mutual bonding interaction in positions 2 and 2' in the course of the reaction.

# FOTOAFINITNÍ ZNAČENÍ – METODA STUDIA PROTEINŮ

BOŽENA KUBÍČKOVÁ a PETR HODEK

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2, e-mail: kubickov@natur.cuni.cz, hodek@natur.cuni.cz*

Došlo dne 31.VIII.2000

Klíčová slova: fotoafinitní značení, fotolýza, fotolabilní sondy, karben, nitren, radikál, kovalentní modifikace, cytochrom P450

## Obsah

1. Úvod
2. Princip fotoafinitního značení a kritéria pro výběr fotoafinitní sondy
3. Fotolyticky vzniklé intermediáty a jejich prekursory
  - 3.1. Nitreny a jejich prekursory
  - 3.2. Karbeny a jejich prekursory
  - 3.3. Další prekursory aktivních intermediátů
4. Použití fotoafinitních sond
5. Závěr

## 1. Úvod

Naše poznání v oblasti biologických procesů, které probíhají v organismech, je do značné míry vázáno na odhalení struktury biomakromolekul a podstaty interakcí jednotlivých komponent biologických systémů – makromolekul s nízkomolekulárními sloučeninami a makromolekul vzájemně. Vedle celé škály spektroskopických metod, které reprezentují přístupy využívající interakci hmoty a záření, byly pro studium biologických makromolekul navrženy i metody založené na podstatně odlišných, často speciálních principech. Významné místo mezi těmito metodami zauímají chemické modifikační metody, které využívají vzniku kovalentní vazby mezi zkoumanou biomakromolekulou a chemicky reaktivním činidlem. Nejčastěji jsou do této skupiny řazeny klasické modifikační postupy (využívající reaktivních nízkomolekulárních sloučenin), afinitní značení (viz dále) a použití tzv. sebevražedných substrátů (u nichž je chemicky reaktivní forma substrátu tvořena během enzymové reakce). Před necelými čtyřiceti lety přibyla velmi slibná metoda fotoafinitního značení<sup>1-6</sup>.

Vzhledem k tomu, že se metoda fotoafinitního značení vyvinula jako reakce na nedostatky metody afinitního značení, bude nejprve pojednáno o základních principech afinitního značení. Tato metoda vychází z přirozené afinity mezi ligandem (např. hormonem, protilátkou, substrátem, inhibítorem) a receptorem (např. enzymem, transportním proteinem). Molekula jednoho z těchto vazebných partnerů (nejčastěji ligan-

du) je substituována chemicky reaktivní skupinou – vzniká tak afinitní sonda (značka), která by měla po přidání do reakční směsi vytvořit kovalentní vazbu s druhým vazebným partnerem; v ideálním případě tímto způsobem vzniká kovalentní komplex ligand–receptor. Aplikací této metody lze např. nalézt receptor ve složité směsi proteinů, nebo identifikovat vazebné místo popř. aktivní centrum na molekule receptoru<sup>7,8</sup>.

Metoda afinitního značení má však nejméně dva podstatné nedostatky: prvním je poměrně nízká chemická reaktivita afinitní sondy, která je vynucena tím, že téměř všechny experimenty jsou prováděny ve vodném prostředí, což by v případě sondy s příliš reaktivní skupinou vedlo k vysokému stupni hydrolytické deaktivace ještě dříve, než dojde k vytvoření kovalentní vazby mezi sondou a receptorem.

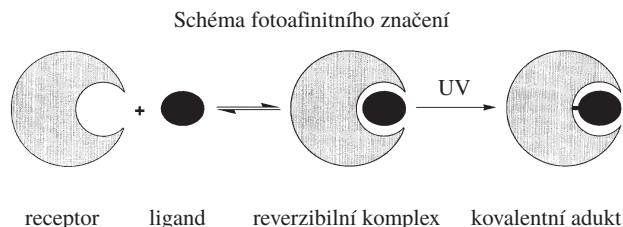
Druhá nevýhoda spočívá v tom, že téměř nelze zamaskovat reaktivní skupiny afinitních sond tak, aby bylo možno za požadovaných podmínek sondu reaktivovat. S tím souvisí i možnost tzv. nespecifického značení, tedy interakce sondy v místech jiných, než je specifické vazebné místo pro přirozený ligand (popř. receptor).

## 2. Princip fotoafinitního značení a kritéria pro výběr fotoafinitní sondy

Oba zmíněné nedostatky afinitního značení překonává metoda fotoafinitního značení tím, že je chemicky reaktivní skupina sondy fotolyticky generována v požadovaném čase z původně chemicky inertní skupiny. Tento experimentální přístup vychází z principů afinitního značení s využitím fotolabilního derivátu sondy. Podstatnou výhodou fotolyticky generovaných intermediátů je jednak extrémně krátký poločas života, jednak značná reaktivita s poměrně nízkou selektivitou aktivované sondy, která umožňuje kovalentně modifikovat všechny aminokyselinové zbytky v těsné blízkosti příslušného reaktivního intermediátu. Tím je podstatně snížena úroveň nespecifického značení a umožněno široké použití této sondy. Schéma prezentující princip metody fotoafinitního značení je znázorněno na obrázku 1.

Analoga ligandu (popř. receptoru) používaná při fotoafinitním značení by měla splňovat co možná nejvíce kritérií definovaných pro ideální fotoafinitní sondu:

- 1) Fotolabilní skupina sondy by měla vykazovat vhodné fotochemické vlastnosti, tj. měla by být aktivovatelná svět-



Obr. 1. Schéma fotoafinitního značení receptorové molekuly (proteinu) fotolabilním ligandem

lem vlnové délky, které závažně nepoškozuje biomakromolekuly. Celkem bezpečné je světlo vlnových délek vyšších než 300 nm. Fotolabilní skupiny by v této oblasti měly mít výrazná absorpční maxima garantující dostatečnou účinnost fotolýzy při relativně nízkých výkonech světelných zdrojů. Dále by fotolýza neměla vést k poškození biologického systému fotooxidací nebo jiným způsobem, než je kovalentní modifikace sondou.

- 2) Sonda by se měla co možná nejvíce podobat původní sloučenině (např. ligandu). Zavedení fotolabilní skupiny do skeletu ligandu by tedy nemělo podstatně ovlivnit strukturální a funkční charakteristiky nezbytné pro zachování afinity pro daný receptor, což má klíčový význam pro specifické interakce v biologických systémech. Disociační konstanta charakterizující míru afinity ligandu pro receptor by neměla být vyšší než je  $10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>.
- 3) Intermediáty vznikající fotolýzou sondy by měly být vysoce reaktivní (tedy s krátkou dobou života) s minimální selektivitou, tj. reaktivitou vůči různým funkčním skupinám. Důležitým požadavkem je i to, aby tyto intermediáty nepodléhaly přesmykům na méně reaktivní deriváty, které by mohly snižovat výtěžek, popř. vést k reakcím mimo vazebné centrum.
- 4) Důležitou vlastností sondy je i její stabilita a chemická inertnost za experimentálních podmínek a při skladování. Zvláště důležitá je stabilita za různých pH (okolo fyziologických hodnot), teplot a v redukčním či oxidačním prostředí.
- 5) Sonda by měla být jednoduše synteticky dostupná spolu s možností přípravy radioaktivně značeného derivátu vysoké specifické radioaktivity.
- 6) Kovalentní vazby komplexů ligand–receptor vznikající po fotolyticky aktivované inkorporaci by měly být stabilní vůči běžným separačním a charakterizačním metodám včetně např. štěpení proteinů chemickými činidly.

Téměř žádná z používaných fotoafinitních sond tato přísná kritéria nespĺňuje zcela. Vždy se jedná o určité kompromisní řešení, které v dostatečné míře vyhovuje zamýšlenému použití.

### 3. Fotolyticky vzniklé intermediáty a jejich prekursorů

Fotolabilní sloučeniny (skupiny) lze v zásadě rozdělit podle způsobu vzniku reaktivních intermediátů do dvou skupin<sup>2,3</sup>: A) Homolytickým štěpením dvojných vazeb nebo dvou sousedních vazeb jednoduchých vznikají nitreny a karbeny. B) Homolytickým rozštěpením jednoduché vazby vznikají volné radikály (příkladem takového prekursoru jsou  $\alpha$ ,  $\beta$ -nenasycené ketony).

#### 3.1. Nitreny a jejich prekursorů

První použití je spojeno s rokem 1969, kdy Fleet a spol.<sup>9</sup> připravil sondu s azido-skupinou pro studium protilátek. V následujících letech byla připravena celá řada azidoderivátů, které po fotolytickém odštěpení molekuly dusíku poskytují nitreny. Nejběžnějšími prekursorů nitrenů jsou acylazidy, alkylazidy, arylazidy. Ovšem použití acylazidů a alkylazidů je podstatně omezeno jejich nestabilitou a náchylností nitrenů

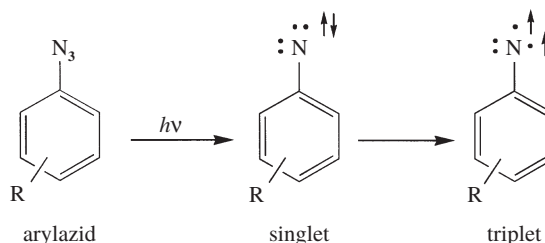
k přesmykům za tvorby isokyanátů, jak je tomu v případě acylnitrenů (Curtiusův nebo Schmidtův přesmyk), a iminů z alkylnitrenů (vznikajících interakcí nitrenu s atomem vodíku sousedního uhlíku)<sup>6</sup>. Nevýhodou je také poloha absorpčních maxim azido-skupiny těchto sloučenin, díky níž je nutno fotoaktivaci provádět světlem vlnových délek podstatně nižších než je 300 nm. Takové ozařování působí silně destruktivně na biologický materiál<sup>3,8</sup>. Nevýhodnou vlastností azidů je také jejich nestabilita v redukujícím prostředí. Dithioly okamžitě redukují azidy na odpovídající aminy. Pokud jsou v reakční směsi přítomny monothioly, např. 2-merkaptoethanol nebo glutathion, je reakce pomalejší, ale přesto je třeba brát v úvahu tento proces, který snižuje obsah fotoaktivovatelné sondy<sup>2</sup>.

Z praktického hlediska jsou použitelné pouze arylazidy, které jsou méně náchylné k přesmykům. Jejich poločas života, jehož hodnota závisí na způsobu substituce aromatického jádra, je přibližně o řád vyšší než u karbenů. Po derivatizaci arylazidu vhodným substituentem (např.  $-\text{NO}_2$ ) vykazuje vzniklý arylazid posun absorpčního maxima k vlnovým délkám vyšším než 300 nm.

Fotochemie arylazidů zahrnuje dvě hlavní formy reaktivního intermediátu. Fotolýzou arylazidu většinou prvotně vzniká nitren v singletovém stavu, který se konverzí mění na tripletový nitren (viz obr. 2). Nitreny v singletovém stavu mají dusíkový atom obklopen sextetem elektronů, přičemž nepárové elektrony mají antiparalelní spin. Typickou reakcí pro singletové nitreny je elektrofilní atak elektronového páru.

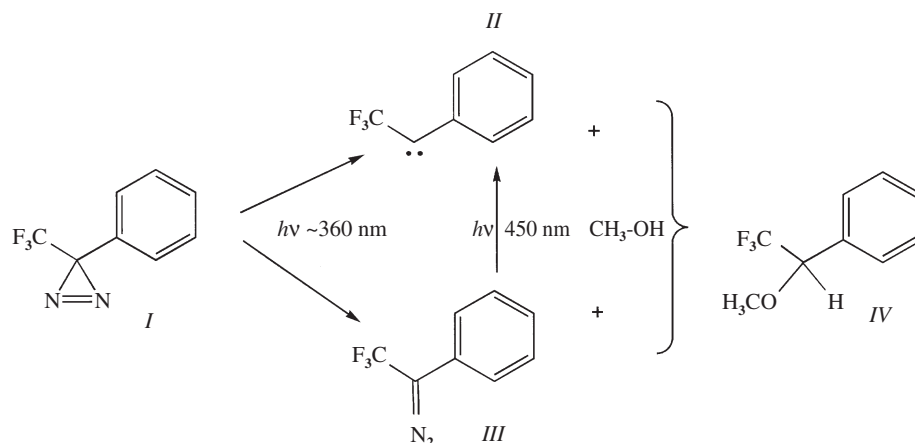
Naproti tomu arylnitreny v tripletovém stavu se chovají jako biradikál (jejich nepárové elektrony mají paralelní spin). Tripletový stav je méně náchylný k přesmykům a vykazuje nižší selektivitu při výběru místa ataku, což je vhodné v případě, kdy ve vazném místě receptoru převažují skupiny s C–H vazbami. Charakteristickou reakcí této formy nitrenů je vytržení atomu H z atakované sloučeniny. Tripletový stav nitrenu je však méně reaktivní než singletový stav. Tomu odpovídá i poločas života tripletového stavu (okolo 100 ns), který je přibližně o řád vyšší než u singletového stavu.

Široké použití sond na bázi azidů dokumentují následující příklady. Struktura lidské 40S ribosomální podjednotky byla studována pomocí azidoderivátu fragmentu DNA, který byl komplementární k sekvenci rRNA 40S podjednotky. Tato fotolabilní sonda označila proteiny S3 a S5 (cit.<sup>10</sup>). Vazné centrum cytochromu P450 1A1 pro kumenhydroperoxid bylo identifikováno radioaktivně značeným derivátem *p*-azido-isopropylbenzenem, [<sup>3</sup>H]-azidokumenem<sup>11</sup>. Dalším příkladem využití tohoto typu sond je arylazid 2'-deoxyuridin-5'-trifosfátu, který byl použit pro označení vazného místa pro substrát HIV reverzní transkriptasy<sup>12</sup>.



Obr. 2. Fotolýza arylazidu. Šipky naznačují spin elektronů singletového a tripletového nitrenu po rozpadu azido-skupiny





Obr. 3. **Příklad reakce sondy karbenového typu s methanolem.** Trifluoromethylfenyldiazirin (*I*) po ozáření poskytuje karbenový intermediát (*II*) jak přímo, tak cestou fotoizomerizace na fotolabilní diazoderivát (*III*) a jeho následné fotolýzy. Oba intermediáty jsou schopny reakce s methanolem (MeOH) za vzniku odpovídajícího methoxyderivátu sondy (*IV*)

### 3.2. Karbeny a jejich prekursorů

Prekursor tohoto typu intermediátu byl poprvé použit roku 1962 Singhem a spol.<sup>1</sup> pro studium proteolýzy – jednalo se o diazoacetylchymotrypsin. Existují dvě skupiny karbenových precursorů: diazosloučeniny a diaziriny. Oba typy sloučenin poskytují po fotolytickém odštěpení molekuly dusíku vysoce reaktivní karben. Nejběžnějšími zástupci první skupiny sloučenin jsou estery diazokarboxylových kyselin, u nichž karboxylová skupina přispívá ke stabilizaci a snížení náchylnosti k přesmykům karbenů, které jsou velmi běžné v případě diazokarboxylových sloučenin. Určitou nevýhodou jsou poměrně nízké hodnoty molárních absorpčních koeficientů v oblasti okolo 340 nm, neumožňující efektivní fotolýzu, a dále i příliš elektrofilní charakter 2-oxo-karbenů, které preferují interakce např. s kyslíkem –OH skupiny v přítomnosti C–H vazby. Nadějná skupina diazosloučenin je reprezentována např. 9-diazofluorenem<sup>15</sup> nebo diazocyklopentadienem<sup>14</sup>, který poskytuje jeden z nejreaktivnějších karbenů. Oba tyto prekursorů lze efektivně aktivovat světlem vlnových délek vyšších než 300 nm díky silným absorpčním maximům v této oblasti. Výhodou je i poměrně vysoká účinnost inkorporace karbenů těchto sloučenin při ataku neaktivované C–H vazby.

Zcela jedinečnou skupinu karbenových precursorů představují diaziriny, spirocyklické izomery lineárních diazosloučenin<sup>15</sup>. Jsou překvapivě stabilní jak vůči působení tepla a světla viditelné oblasti, tak chemicky např. vůči silným kyselinám, zásadám nebo redučním i oxidačním činidlům<sup>16</sup>. Většina diazirinů silně absorbují v oblasti okolo 360 nm, čehož se využívá k jejich fotoaktivaci bez vážnějšího poškození biomakromolekul. Jednou z nepříliš vhodných vlastností diazirinů je však možná fotoizomerizace na lineární diazosloučeniny, které jsou sice též fotolabilní, ale zároveň často vykazují elektrofilní charakter. Pro účely fotoafinitního značení byla připravena celá řada sloučenin obsahujících diazirinový kruh, ovšem požadovaná kritéria splňují jen některé: jedná se např. o alkyl-diaziriny, u nichž není v blízkosti karbenu dostupný atom vodíku, který by způsobil intramolekulární deaktivaci karbenu za vzniku dvojné vazby<sup>4</sup>, nebo aryldiaziriny obsahující jako substituent diazirinového cyklu trifluoromethylovou skupinu, která potlačuje elektrofilní charakter fotoizomerizačního pro-

duktu<sup>17</sup>. Příklad typické reakce karbenu vznikajícího fotolýzou trifluoromethylfenyldiazirinu v methanolu je znázorněn na obr. 3 (cit.<sup>18</sup>).

Karbeny jsou vysoce reaktivní divalentní intermadiáty, které se podobně jako nitreny snaží doplnit oktet valenčních elektronů (z původního sextetu). Vyskytují se též ve dvou stavech, singletovém stavu jako elektrofil a tripletovém jako biradikál. Mezi oběma stavy je předpokládán určitý typ rychlé tepelné rovnováhy<sup>19</sup>. Karbeny vykazují stejné typy reakcí jako odpovídající formy nitrenů. Podstatný rozdíl je však v reaktivitě obou typů intermediátů. Karbeny jsou o několik řádů reaktivnější než odpovídající nitreny a vykazují i nižší selektivitu při výběru místa ataku<sup>4,17,20,21</sup>. S tím souvisí i podstatně kratší poločasy života singletového či tripletového stavu karbenu. Přesné hodnoty jsou pochopitelně závislé na typu karbenového precursoru a reakčních podmínkách, ale přibližně odpovídají  $\mu\text{s}$  pro tripletový stav a  $\text{ns}$  pro singletový stav, což jsou ve srovnání s nitreny hodnoty o 3–4 řády nižší<sup>4</sup>.

V současné době několik prací popisuje využití a efektivitu značení různě substituovanými diaziriny. Například sonda vzniklá derivatizací thiminového dimeru 4-(1-azi-2,2,2-trifluorethyl)-benzoátem byla použita k určení aminokyseliny zbytků účastnících se interakce T4 endonukleasy V s DNA (cit.<sup>22</sup>). Dalším příkladem tohoto typu sond je 3-trifluoro-3-(*m*-[<sup>125</sup>I]iodofenyl)diazirin, pomocí něhož byla označena membránová doména prostaglandin endoperoxid H synthasy a dále její aktivní místo pro cyklooxygenasu<sup>23</sup>.

### 3.3. Další prekursorů aktivních intermediátů

Tato skupina tzv. přímých fotoafinitních sond obsahuje heterogenní směs organických sloučenin, jejichž fotolýzou vznikají volné radikály. Tyto sloučeniny reagují většinou cestou tripletu, který je téměř inertní vůči molekulám vody a zároveň vykazuje vysokou schopnost inkorporace do neaktivovaných C–H vazeb. Díky převažujícímu podílu tripletového reakčního mechanismu nejsou většinou tyto prekursorů náchylné k inaktivaci přesmyky. Z pohledu fotoafinitního značení se tedy jedná o sloučeniny vhodných vlastností.

Poměrně široké použití zaznamenaly  $\alpha$ ,  $\beta$ -nenasyčené ke-

tony např. benzofenony a acetofenony<sup>24</sup>. Především sondy benzofenonového typu nabízejí řadu výhodných vlastností, jsou chemicky stabilnější než např. diazoestery, arylazidy nebo diaziriny, lze s nimi manipulovat při běžném osvětlení a jsou aktivovány světlem vlnových délek okolo 350–360 nm. Fotoaktivací benzofenonu vzniká tripletový excitovaný stav schopný vytrhnout atom vodíku z donoru za vzniku dvou radikálů, které následně rekombinují. Reakční schéma je znázorněno na obrázku 4. Substituenty benzofenonu mohou významně ovlivnit fotochemické vlastnosti připravené sondy. Zatímco skupiny poskytující elektrony a systémy s delokalizací elektronů na aromatických a konjugovaných strukturách snižují reaktivitu tripletového stavu, skupiny s nedostatkem elektronů usnadňují odtržení atomu vodíku<sup>25</sup>.

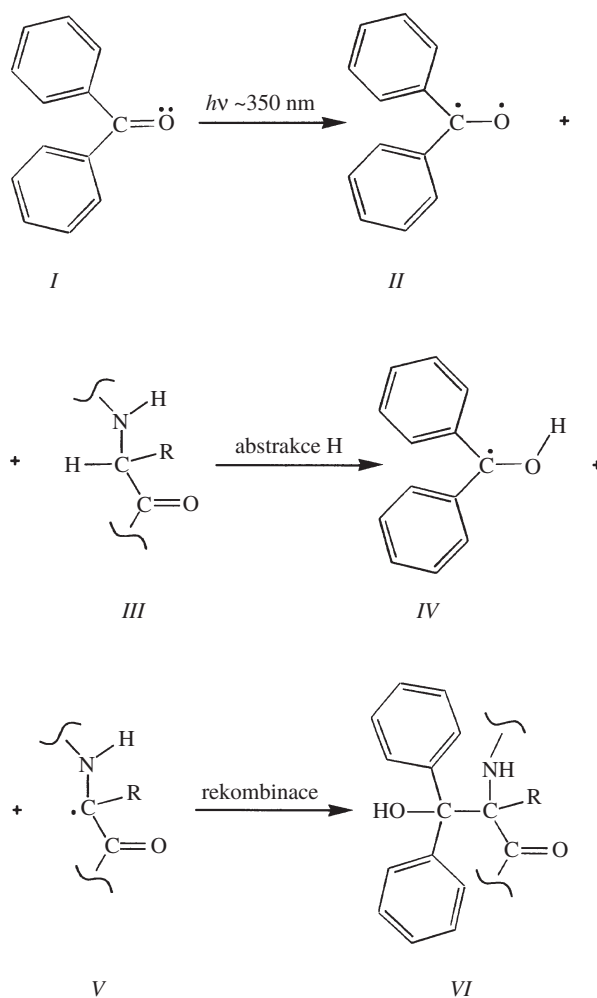
Jako fotoafinitní sondy jsou často využívány fotolabilní polypeptidy obsahující benzofenonem modifikovaný fenylalanin, popřípadě příbuzné aminokyseliny. Příslušné modifikované polypeptidy byly použity k mapování např. lidského insulinového receptoru<sup>26</sup> nebo k identifikaci kontaktních míst podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$  lidského luteinizačního hormonu<sup>27</sup>.

Do této skupiny sond patří dále  $\alpha$ ,  $\beta$ -nenasycené steroidy, které se chovají podobně jako benzofenony, náleží sem též nitroareny např. chloramfenikol<sup>28</sup> a flunitrazepam<sup>29</sup>, dále puriny, pyrimidiny, psoraleny a další sloučeniny jako např.  $\alpha$ -amanitin nebo bilirubin<sup>4</sup>. Tyto sondy jsou však poměrně řídké používané, pravděpodobně pro nízkou univerzálnost jejich aplikací.

#### 4. Použití fotoafinitních sond

Aplikace fotoafinitního značení je značně široká, od topologických studií proteinů přes sledování kinetiky molekulárních interakcí až k provádění funkčních enzymologických měření. Tato problematika je podrobně zpracována v přehledných člancích a monografiích<sup>2–4,6,18,25,30–32</sup>, proto následující partie bude spíše utříděním a zobecněním možností, které fotoafinitní značení poskytuje.

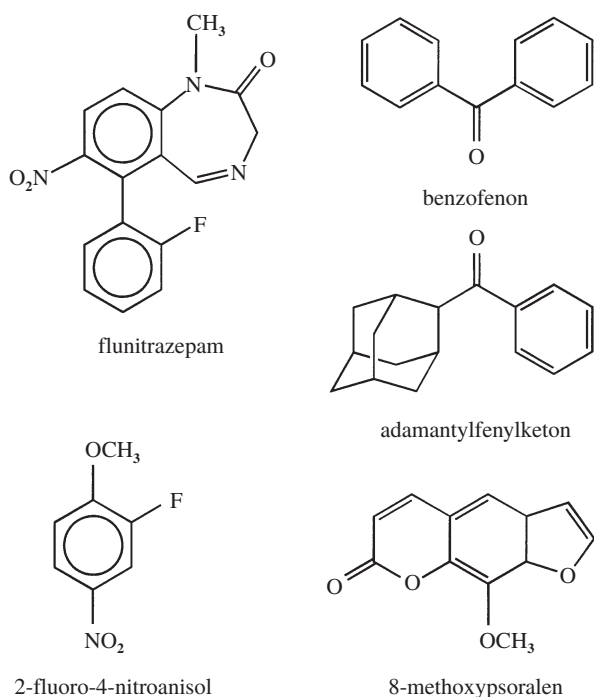
- 1) Pomocí specificky reagující fotolabilní sondy je možno označit určitý receptor nebo méně často ligand v částečně přifunkcionovaném preparátu nebo přímo ve vzorku tkáně. Navázaná sonda (vhodně značená) pak umožňuje např. monitorování dané makromolekuly během separačních postupů a při její charakterizaci, což je zejména výhodné pro receptorové molekuly, které nelze snadno stanovit, a dále pro identifikaci neznámých receptorů<sup>33</sup>. Speciálním případem aplikace je vyhledávání funkční podjednotky u podjednotkových enzymů.
- 2) Topologii membránových proteinů lze studovat v podstatě dvěma způsoby. Prvý je založen na použití fotolabilních derivátů lipidů nebo jiných silně hydrofobních fotolabilních sloučenin, které jsou dobře rozpustné v membránách. Fotolýzou vzniklé intermediáty zmíněných sloučenin jsou schopny označit části proteinů, které jsou ve styku s membránou<sup>34,35</sup>. Tento experimentální přístup umožňuje určit i hloubku zanoření proteinové makromolekuly do membrány. Tyto sondy musí být schopné efektivně inkorporace do neaktivovaných C–H vazeb postranních alifatických řetězců hydrofobních aminokyselin, které lze předpokládat právě v těchto částech proteinů. Druhý způsob použití fotoafinitního značení pro topologické účely je zaměřen



Obr. 4. Fotolýzou benzofenonu (I) vzniká biradikál (II), který vytrhuje atom vodíku z C–H vazby aminokyseliny peptidu (III) za vzniku ketyl (IV) a alkyl (V) radikálů, které nakonec rekombinují na sloučeninu benzpinakolového typu (VI)

na identifikaci částí proteinu, které jsou ve styku s vodným prostředím. Pro tyto záměry se hodí téměř jakákoli silně hydrofilní fotolabilní sloučenina nevstupující do membrány.

- 3) Pomocí fotoafinitního značení lze v biologických systémech určovat vzdálenosti ve dvou úrovních, buď intra- nebo intermolekulárně, s čímž souvisí i možnost detekce komponent multienzymových či subjednotkových systémů nebo určení jejich nejbližšího okolí<sup>36</sup>. Sondy používané pro tyto účely musí být bifunkční, tzn. musí obsahovat na protilehlých koncích co možná rigidního řetězce fotolabilní skupiny – pak se jedná o homobifunkční síťovací činidla, nebo jednu fotolabilní a druhou chemicky reaktivní skupinu u heterobifunkčních síťovacích činidel. Vhodné je do spojovacího řetězce vložit snadno degradabilní vazbu, např. S–S-můstek, kterou lze v redukčním prostředí rozštěpit, a pak izolovat obě označené složky systému. Heterobifunkční činidla jsou zpravidla nejprve navázaná prostřednictvím chemicky reaktivní skupiny na danou molekulu, a pak je teprve aktivována fotolabilní skupina, značící např. postranní řetězce aminokyselin ve své blízkosti.



Obr. 5. Příklady přirozeně fotolabilních sloučenin, prekursorů volných radikálů, které se používají jako fotoafinitní sondy

U homobifunkčních činidel je třeba, aby alespoň jeden konec činidla obsahoval strukturu umožňující specifickou interakci činidla se studovanou makromolekulou; druhý konec pak může být zakončen pouze fotolabilní skupinou.

- 4) Speciálním způsobem aplikace metody fotoafinitního značení je ireverzibilní zablokování aktivního centra enzymů nebo u alosterických enzymů fixování jejich aktivní nebo naopak inaktivní konformace, které lze pak použít pro studium vztahu struktury a funkce těchto enzymů<sup>37</sup>. Zajímavé možnosti nabízí i fotolyticky připravené komplexy receptorů s nízkomolekulárními sloučeninami.
- 5) Současné světelné zdroje o vysokém výkonu (lasery, intenzivní záblesková zařízení) umožňují provádět fotoaktivaci sond během velmi krátkého časového úseku ( $\mu\text{s}$ – $\text{ms}$ ). Ve spojení s přístroji pro rychlé mísení reakčních komponent slouží tato metodika ke sledování časového sledu dějů, např. průběhu enzymových reakcí, vazby hormonu na receptor nebo interakci složek multienzymového systému<sup>38</sup> v definovaných časových okamžicích. Používané sondy nesmí podléhat přesmykům a izomerizacím na reaktivní intermediáty s dlouhou dobou života, které by interferovaly při zaznamenání časově rozlišených interakcí.
- 6) Další aplikací fotoafinitního značení je mapování vazebných míst receptorů, přenašečů nebo aktivních center enzymů<sup>39,40</sup>. V těchto případech metoda fotoafinitního značení, jako jeden z mála experimentálních přístupů, umožňuje pohled např. i do hydrofobního vazebného místa proteinů, jejichž trojrozměrnou strukturu nelze zatím určit. Většina ostatních chemicko-modifikačních metod by v případě vazebných míst se značným obsahem hydrofobních aminokyselin byla neúčinná. Proto je tato metoda výhodná pro výzkum struktury aktivního centra cytochromu P450,

enzymu hrajícího klíčovou úlohu při metabolismu hydrofobních léčiv a kancerogenů.

Tato oblast aplikace metody fotoafinitního značení ke studiu aktivního centra savčích cytochromů P450 je v centru našeho zájmu. Pro značení aktivního centra byly postupně použity diamantandiazirin<sup>41</sup>, sonda karbenového typu a dále *N*-(*p*-azidobenzyl)-*N*-methyl-*p*-aminofenethylamin, zástupce nitrenových sloučenin, kterým se podařilo identifikovat Arg197 aktivního centra cytochromu P450 2B4 (cit.<sup>42</sup>). Tento typ heterobifunkční azidové sondy vykazuje značnou selektivitu vůči místu ataku – modifikuje převážně polární aminokyseliny. Proto byly v dalších studiích jako výhodnější fotoafinitní sondy testovány prekursory volných radikálů, jejichž intermediáty mají vysokou schopnost inkorporace do neaktivovaných C–H vazeb, a nejsou náchylné k interakcím s molekulami vody, což je pro fotoafinitní značení cytochromů P450 velmi důležité, neboť v aktivním centru savčích cytochromů P450 se předpokládá přítomnost vody. Jedná se o přirozeně fotolabilní sloučeniny: flunitrazepam, 8-methoxypsoralen, 2-fluoro-4-nitroanisol včetně polohového izomeru 2-nitro-4-fluoroanisolu, benzofenon a jeho analog adamantylfenylketon (viz obr. 5). Všechny sloučeniny prokázaly značnou fotolabilitu při expozici krátkovlnným UV zářením a jeví se jako velmi perspektivní sondy pro mapování aktivního centra cytochromu P450.

Právě detailní poznání struktury a aminokyselinového složení aktivních center cytochromů P450 umožní vedle pochopení mechanismu aktivace kancerogenů též cílenou konstrukci léčiv rezistentních vůči inaktivaci cytochromy P450 a přípravu inhibitorů s preventivně ochranným efektem proti chemickým kancerogenům.

## 5. Závěr

Technika fotoafinitního značení je progresivní metodou s širokou možností aplikace pro studium biomakromolekul. Fotoafinitní značení vychází z principu afinitního značení s tím zásadním rozdílem, že analog substrátu není chemicky reaktivní až do okamžiku fotoaktivace. Fotolýzou dojde k rozpadu fotolabilní skupiny sondy za vzniku reaktivních intermediátů, které umožní tvorbu kovalentní vazby mezi sondou a studovaným receptorem. Výhoda použití fotoafinitních sond spočívá především ve značné reaktivitě intermediátů, umožňující značit na proteinech místa s nízkou chemickou reaktivitou, a dále ve velmi krátké době života těchto intermediátů, což vede k minimalizaci vazby sondy mimo studované místo.

Při konstrukci fotoafinitních sond velmi široké použití zaznamenaly arylazidy substituované na aromatickém kruhu nitroskupinou. Zavedení této skupiny jednak způsobuje posun absorpčních maxim derivátu do oblasti vlnových délek vyšších než 300 nm, jednak zvyšuje reaktivitu arylnitrenů<sup>43</sup>, která se pak blíží nejreaktivnějším nitrenům vznikajícím z acylazidů.

V řadě ohledů jsou však prekursory karbenů, zejména diaziriny, lepšími kandidáty pro přípravu fotoafinitních sond než azidosloučeniny. Karbeny jsou podstatně reaktivnější při nižší selektivitě pro místo ataku. Na snížení nespecifické vazby má značný vliv i o několik řádů nižší poločas života karbenů, který nedovoluje reaktivním intermediátům, aby atakovaly místa vzdálená od místa jejich vzniku. Výhodně jsou položena i absorpční maxima všech diazirinů (350–380 nm).

Navíc diazirinová skupina je poměrně menší než některé prekursorů nitrenů, např. objemná nitroarylazidová skupina, takže jen minimálně ovlivňuje vazebné vlastnosti sondy. Zároveň karben vzniklý z diazirinu je přímo součástí skeletu ligandu, což zajišťuje označení právě vazného místa receptoru. Nicméně, i přes řadu předností, nejsou diaziriny zcela ideálními prekursorů reaktivních intermediátů pro svou náchylnost k fotoizomerizacím na lineární diazosloučeniny, které snižují výtěžek značení díky kompetici obou izomerů o vazbu na receptor.

Slibnými kandidáty pro fotoafinitní značení jsou již zmíněné přímé fotoafinitní sondy. U těchto sond, díky jejich přímé fotolabilitě, nedochází k poklesu afinity ligandu pro receptor způsobené zavedením fotoaktivovatelné skupiny do jeho molekuly. Tyto fotoafinitní sondy tím, že většinou reagují tripleto-  
tovým mechanismem, v sobě spojují přednosti tripletových karbenů a nitrenů.

*Autoři děkují za finanční podporu grantům GAUK 246/1999 a MŠMT ČR VS96141.*

#### LITERATURA

- Singh A., Thornton E. R., Westheimer F. H.: *J. Biol. Chem.* **237**, 3006 (1962).
- Guillory R. J.: *Pharmacol. Ther.* **41**, 1 (1989).
- Schäfer H.-J., v knize: *Chemical Modification of Enzymes: Active Site Studies* (Eyzaguirre J., ed.), str. 45. Wiley, New York 1987.
- Bayley H.: *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, Amsterdam 1983.
- Chowdhry V., Westheimer F. H.: *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 293 (1979).
- Bayley H., Knowles J. R.: *Methods Enzymol.* **46**, 69 (1977).
- Singer S. J.: *Adv. Prot. Chem.* **22**, 1 (1967).
- Glazer A. N., DeLange R. J., Sigman D.S., v knize: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Work T. S., Work E., ed.), sv. 4, část I. North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1976.
- Fleet G. W. J., Porter R. R., Knowles J. R.: *Nature* **224**, 511 (1969).
- Malygin A. A., Vaseneva O. G., Ven'yaminova A. G., Repkova M. N., Karpova G. G.: *Mol. Biol.* **32**, 367 (1998).
- Cvrk T., Strobel H. W.: *Arch. Biochem. Biophys.* **349**, 95 (1998).
- Shcherbik N. V., Khodyreva S. A., Vlasov V. A., Dobrikov M. I., Dymshits G. M., Lavrik O. I.: *Mol. Biol.* **31**, 290 (1997).
- Anjaneyulu P. S. R., Lala A. K.: *FEBS Lett.* **146**, 165 (1982).
- Moss R. A.: *J. Org. Chem.* **31**, 3296 (1966).
- Smith R. A. G., Knowles J. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 5072 (1973).
- Bradley G. F., Evans W. B. L., Stevens I. D. R.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1214 (1977).
- Brunner J., Richards F. M.: *J. Biol. Chem.* **255**, 3319 (1980).
- Fleming S. A.: *Tetrahedron* **51**, 12479 (1995).
- Griller D., Montgomery C. R., Scaiano J. C., Platz M. S., Hadel L.: *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6813 (1982).
- Bayley H., Knowles J. R.: *Biochemistry* **17**, 2414 (1978).
- Bayley H., Knowles J. R.: *Biochemistry* **17**, 2420 (1978).
- Hori N., Iwai S., Inoue H., Ohtsuka E.: *J. Biol. Chem.* **267**, 15591 (1992).
- James C. O., Smith W. L.: *J. Biol. Chem.* **271**, 9906 (1996).
- Galary R. E., Craig L. C., Printz M. P.: *Nature* **242**, 127 (1973).
- Dormán G., Prestwich G. D.: *Biochemistry* **33**, 5661 (1994).
- Shoelson S. E., Lee J., Lynch C. S., Backer J. M., Pilch P. F.: *J. Biol. Chem.* **268**, 4085 (1993).
- Keutman H. T., Rubin D. A.: *Endocrinology* **132**, 1305 (1993).
- Sonenberg N., Zamir A., Wilchek M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**, 693 (1974).
- Mohler H., Battersby M. K., Richards J. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 1666 (1980).
- Schuster D. I., Probst W. C., Ehrlich G. K., Singh G.: *Photochem. Photobiol.* **49**, 785 (1989).
- Brunner J.: *Methods Enzymol.* **172**, 628 (1989).
- Moore G. J.: *Pharmacol. Ther.* **33**, 349 (1987).
- Usui H., Takahashi Y., Maeda N., Mitui H., Isobe T., Okuyama T., Nishizawa Y., Hayashi S.: *J. Chromatogr.* **515**, 375 (1990).
- Lala A. K., Bhat S.: *Biotechnol. App. Biochem.* **12**, 586 (1990).
- Schiavo G., Demel R., Montecucco C.: *Eur. J. Biochem.* **199**, 705 (1991).
- Mogre R. M., Batliwala H. F., Anjaneyulu P. S. R., Lala A. K.: *FEBS Lett.* **221**, 408 (1987).
- Eberle A. N., DeGraan P. N. E., Scimonelli T., Solca F.: *Pharmacol. Ther.* **44**, 63 (1989).
- McCray J. A., Trentham D. R.: *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 239 (1989).
- Wadzinski B. E., Shanahan M. F., Seamon K. B., Ruoho A. E.: *Biochem. J.* **272**, 151 (1990).
- Donnelly-Roberts D. L., Lentz T. L.: *Biochemistry* **30**, 7484 (1991).
- Hodek P., Smrček S.: *Gen. Physiol. Biophys.* **18**, 181 (1999).
- Antonovič L., Hodek P., Smrček S., Novák P., Šulc M., Strobel H. W.: *Arch. Biochem. Biophys.* **370**, 208 (1999).
- Schuster G. B.: *NATO ASI Ser., Ser. C; Photochem. Probes Biochem.* **272**, 31 (1989).

#### **B. Kubíčková and P. Hodek (Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague): Photoaffinity Labelling – A Method of Protein Study**

Photoaffinity labelling is one of the most powerful chemical modification techniques employed in the study of protein architecture and interactions. This approach utilises photolabile derivatives of ligands (substrates), termed photoaffinity probes, for a covalent labelling of target proteins (enzymes). Upon UV-light photolysis, photoaffinity probes are converted to highly reactive intermediates which are able to modify amino acid residues of a target protein. The goal of this technique is the identification of the probe binding site(s) in a probe-protein covalent complex. In this review, major concepts of photoaffinity labelling are described with respect to selection criteria of appropriate photoaffinity probes and assessment of advantages and disadvantages of currently used photolabile probes. In addition, several examples of photoaffinity probe application in protein research focused on the cytochrome P450 active centre are presented.



## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### VYUŽITÍ MIKROVLNNÉ TECHNIKY PŘI ODŠTĚPOVÁNÍ ACIDOLABILNÍCH SKUPIN V CHEMII PEPTIDŮ

JAROSLAV ŠEBESTÍK<sup>a,b</sup>, JAN HLAVÁČEK<sup>a</sup>  
a IVAN STIBOR<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 10 Praha 6

Došlo dne 29.II.2000

Klíčová slova: chránící skupiny, štěpení, mikrovlnná technika

### Úvod

Acidolabilní chránící skupiny *terc*-butylového typu se využívají převážně při chránění aminokyselin v chemii peptidů, kdy se nejčastěji odštěpují působením trifluoroctové kyseliny. Do 30 min je tak možné provést deprotekcí *N-terc*-butyloxykarbonylové nebo *terc*-butylové chránící skupiny esterové funkce, zatímco odštěpení *terc*-butylové chránící skupiny hydroxylové funkce zpravidla vyžaduje delší reakční dobu<sup>1</sup>. Deprotekci aminoskupiny vznikají trifluoracetáty potlačující její nukleofilnost, kterou je nutno před případnou acylační reakcí obnovit neutralizací příslušnou bází. Bylo však již také popsáno, že u některých *N-terc*-butyloxykarbonylových derivátů dochází k odštěpování chránící skupiny za vzniku volné aminoskupiny pomocí mikrovlnného (MW) záření v přítomnosti silikagelu<sup>2</sup>.

Pokusili jsme se proto tuto metodu aplikovat na chráněné deriváty aminokyselin, případně peptidů, neboť v této oblasti je *terc*-butylová skupina jednou z nejpoužívanějších při přechodném i permanentním chránění reaktivních skupin.

Dále nás zajímalo, zda je možné působením mikrovlnného záření výrazněji ovlivnit poměrně malý rozdíl v odštěpování jednotlivých typů *terc*-butylového chránění, to znamená, zda tato metoda poskytuje možnost selektivního odštěpení *N*-Boc skupiny vedle *t*-Bu chránící skupiny esterové či hydroxylové funkce.

Vzhledem k tomu, že použité zařízení na generaci mikrovlnného záření mělo ve srovnání s publikovanými údaji (450 W) nižší výkon (300 W), bylo nutné metodiku odštěpení chránících skupin pomocí MW modifikovat dále uvedenými postupy.

Při našich experimentech jsme využili možnosti zvolit výkony 150 W, 180 W a 270 W a různé časové periody při ohřevu reakční směsi složené z příslušně chráněné aminokyseliny a silikagelu nebo oxidu hlinitého. Energie aplikovaného záření byla vyjadřována v kW.min.

### Experimentální údaje

Vzorky pro obě metody byly připravovány rozpuštěním 1 mmol příslušné látky ve 30 ml methanolu. Po přidání 10 g nosiče (silikagel nebo oxid hlinitý) bylo rozpouštědlo odpařeno a zbytek po vpravení do nádoby přístroje ozařován MW o různém výkonu po dobu stanovenou jednotlivými experimenty. Stupeň konverze reakce byl určen pomocí HPLC na koloně LiChroCART WP 300 RP-18 (5  $\mu$ m; Merck, SRN), za použití gradientu mobilní fáze 0–100 % ACN v 0,0 5% TFA za 1 hod, při průtoku 1 ml.min<sup>-1</sup>. Pro studii byl použit přístroj SyntheWave 402 Prolabo s výkonem na výstupu 300 W (spin +5), laskavě zapůjčený firmou Merck spol. s r.o., Praha.

### Metody P1, P2

Při pulsní metodě P1 se pracovalo v otevřené nádobě při teplotě vzorku do 100 °C, kdy docházelo ke kolísání vlhkosti silikagelu. Jedna 20 min dávka se skládala z 20 pulsů, z nichž každý trval 10 s při výkonu 150 W. Po něm pak následovala 50-ti sekundová prodleva bez aplikovaného záření. Jelikož při opakování metody P1 docházelo k poklesu maximální teploty až o 10 °C, byl při pulsní metodě P2 výkon pulsů zvýšen na 180 W.

### Metoda X

Tato metoda byla uplatněna po zjištění nízké efektivity pulsních metod při tvorbě primární aminoskupiny z prekursoru chráněného skupinou Boc. Vzorek látky byl vystaven působení MW o výkonu 270 W po dobu 6 min, kdy se vzorek začal rychle zahřívat. Jeho teplota, celkově závisející na způsobu úpravy silikagelu, nepřesáhla 146 °C.

### Výsledky a diskuse

Výsledky experimentů jsou souhrnně uvedeny v tabulce I. Z ní vyplývá, že odštěpování chránících skupin *terc*-butylového typu závisí na struktuře chráněné aminokyseliny nebo sekvenci příslušného peptidu.

Na silikagelu jako nosiči byl zaznamenán 65 % úbytek Boc-Trp-OH za vzniku pouze 29 % odchráněné aminokyseliny a 36 % produktů vedlejších reakcí patrně na postranním řetězci tryptofanu. Na druhé straně deprotekcí dipeptidu Boc-Pro-Ala-OMe za vzniku sekundární aminoskupiny proběhla čistě s výtěžkem 60 % a odštěpení *terc*-butyl esterové skupiny u Fmoc-Asp(O*t*-Bu)OH rovněž s výtěžkem 60 %. V ostatních případech proběhlo odštěpení N<sup>α</sup>-Boc chránící skupiny u Boc-Phe-OH, Boc-Trp(For)-OH a tetrapeptidu Boc-Tyr-Asp(OBzl)-Pro-Ala-OMe pouze s výtěžkem 34 %, 28 % a 27 %, přičemž i v případě tryptofanu s chráněným indolovým kruhem bylo zjištěno poměrně vysoké, 5 % zastoupení vedlejších produktů.

Zároveň byla zjištěna vysoká rezistence *terc*-butyl etherové skupiny u Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH, kde štěpení za standardních podmínek probíhalo jen z 3 %, zatímco odštěpení stejné

skupiny z fenolického postranního řetězce Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH proběhlo z 15 %. Poměr v odštěpování N<sup>α</sup>-Boc nebo *t*-Bu chránící skupiny esterové funkce a *t*-Bu chránící skupiny hydroxylové funkce dosahující maximálně jednoho řádu zhruba odpovídá poměru dosaženému při 100 % odštěpení Boc skupiny (30 min) pomocí TFA.

Experimenty se zvyšováním dodané MW energie a prodlužováním doby MW radiace u Boc-Phe-OH (tabulka II, obrázek 1) s cílem zjistit podmínky, při kterých je deprotektce nejvyšší, ukázaly na postupné snižování obsahu původního

Tabulka I

Složení reakční směsi po dávce mikrovlnného záření při metodě X, P1 a P2

| Látka                         | X <sup>a</sup> | P1 <sup>a</sup> | P2 <sup>a</sup> | b    | c   | d    |
|-------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|------|-----|------|
| Nosič silikagel               |                |                 |                 |      |     |      |
| Boc-Phe-OH                    | 1              | 2               | 0               | 66   | 30  | 4    |
| Boc-Pro-Ala-OMe               | 0              | 5               | 0               | 39,9 | 60  | 0,1  |
| Boc-Tyr-Asp(OBzl)-Pro-Ala-OMe | 0              | 5               | 0               | 73   | 25  | 2    |
| Boc-Trp-OH                    | 2              | 0               | 0               | 35   | 29  | 36   |
| Boc-Trp(For)-OH               | 2              | 0               | 0               | 72   | 23  | 4,6  |
| Fmoc-Gly-OH                   | 0              | 4               | 1               | 100  | 0   | 0    |
| Fmoc-Ser( <i>t</i> -Bu)-OH    | 0              | 5               | 0               | 96,9 | 3   | 0,1  |
| Fmoc-Tyr( <i>t</i> -Bu)-OH    | 0              | 5               | 0               | 84,7 | 15  | 0,3  |
| Fmoc-Asp(O <i>t</i> -Bu)-OH   | 0              | 5               | 0               | 37   | 60  | 3    |
| Z-D-Ala-OH                    | 0              | 5               | 0               | 100  | 0   | 0    |
| Nosič oxid hlinitý            |                |                 |                 |      |     |      |
| Boc-Phe-OH                    | 2              | 0               | 0               | 100  | 0   | 0    |
| Z-D-Ala-OH                    | 2              | 0               | 0               | 100  | 0   | 0    |
| Fmoc-Gly-OH                   | 2              | 0               | 0               | 55   | 2,8 | 42,2 |

<sup>a</sup> Počet ozáření vzorku, <sup>b</sup> % výchozí látky, <sup>c</sup> % ochráněného produktu reakce, <sup>d</sup> % vedlejších produktů

chráněného derivátu v reakční směsi až na 1,2 %. Současně však při tom docházelo k degradaci ozařovaného materiálu, takže při maximálním dosaženém výtěžku odblokovaného Phe ve výši 77 % bylo v reakční směsi přítomno i 23 % vedlejších produktů. Dále bylo potvrzeno, že N-Fmoc i N-Z chránící skupiny jsou rezistentní vůči MW záření za použitých experimentálních podmínek.

Když byl jako nosič použit místo silikagelu oxid hlinitý, nedocházelo k odštěpování ani N-Boc chránící skupiny. Fmoc-Gly-OH však byl ze 45 % modifikován převážně na vedlejší produkty (42 % v reakční směsi) neobsahující volnou primární aminoskupinu.

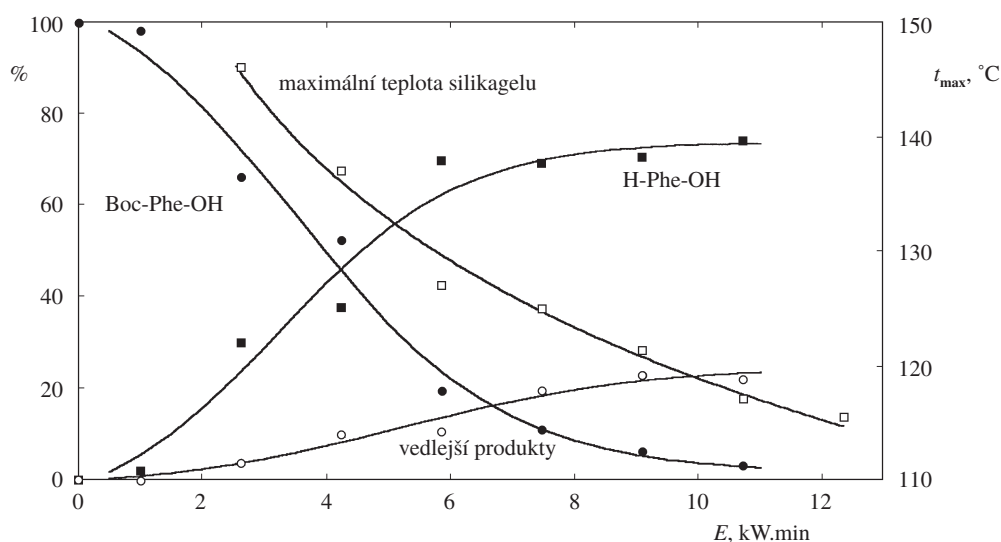
Jelikož bylo také popsáno, že Boc skupina je štěpena během 1 hod ve vodě za varu<sup>3</sup>, provedli jsme srovnávací experiment, při němž byl Boc-Phe-OH nanesen na silikagel a vystaven teplotě 100 °C po dobu 2 hod (doba 6 experimentů P1) bez přítomnosti MW záření. Po extrakci methanolem však vzorek obsahoval pouze původní Boc-Phe-OH.

Tabulka II

Deprotektce Boc-Phe -OH

| Metoda          | a     | b    | c    | d    | <i>t</i> <sub>max</sub> /°C |
|-----------------|-------|------|------|------|-----------------------------|
| P1 <sup>e</sup> | 1,00  | 98,0 | 1,9  | 0,1  | 100 <sup>f</sup>            |
| X               | 2,62  | 66,0 | 30,0 | 4,0  | 146,0                       |
| X               | 4,24  | 52,3 | 37,6 | 10,1 | 137,0                       |
| X               | 5,86  | 19,5 | 69,7 | 10,8 | 127,0                       |
| X               | 7,48  | 11,2 | 69,0 | 19,8 | 125,0                       |
| X               | 9,10  | 6,3  | 70,5 | 23,2 | 121,4                       |
| X               | 10,72 | 3,4  | 74,2 | 22,4 | 117,2                       |
| X               | 12,34 | 1,2  | 76,0 | 22,8 | 115,6                       |

<sup>a</sup> Energie záření v kW.min, <sup>b</sup> % výchozí látky, <sup>c</sup> % ochráněného produktu reakce, <sup>d</sup> % vedlejších produktů [100 % – (b + c)], <sup>e</sup> metoda byla aplikována dvakrát, <sup>f</sup> metoda P1 jen do teploty 100 °C



Obr. 1. Závislost složení reakční směsi a maximální reakční teploty na dávce mikrovlnného záření

**Závěr**

Závěrem lze konstatovat, že v oblasti aminokyselin a peptidů umožňuje MW záření za určitých experimentálních podmínek štěpení chránících acidolabilních skupin *tert*-butylového typu v závislosti na povaze aminokyseliny nebo peptidové sekvenci.

K dosažení maximálního odštěpení N-Boc nebo *t*-Bu skupiny je však zapotřebí několikanásobně prodloužit reakční dobu, resp. několikanásobně opakovat dávky MW záření, po nichž je v reakční směsi detegován vysoký obsah vedlejších produktů.

Selektivita mezi štěpením N<sup>α</sup>-Boc nebo *t*-Bu chránící skupiny esterové funkce a *t*-Bu chránící skupiny hydroxylové funkce v rámci jednoho řádu je srovnatelná se štěpením pomocí TFA. Proto praktický význam použití MW techniky při odštěpování chránících skupin *t*-Bu typu u peptidů bude patrně omezen jen na některé speciální případy deprotektce, při nichž nelze použít TFA, případně nelze provést následnou neutralizaci vzniklého trifluoracetátu působením terciární báze.

**Použité zkratky**

|               |   |
|---------------|---|
| ACN           | acetonitril                             |
| Boc           | <i>tert</i> -butyloxykarbonyl           |
| For           | formyl                                  |
| Fmoc          | fluorenylmethoxykarbonyl                |
| MW            | mikrovlny                               |
| HPLC          | vysoce účinná kapalinová chromatografie |
| OBzl          | benzylester                             |
| <i>Ot</i> -Bu | <i>tert</i> -butylester                 |
| OMe           | methylester                             |
| <i>t</i> -Bu  | <i>tert</i> -butyl                      |

|     |                         |
|-----|-------------------------|
| TFA | trifluoroctová kyselina |
| Z   | benzyloxykarbonyl       |

*Studie byla finančně podpořena granty Grantové agentury České republiky č. 203/98/1330 a 203/00/0955.*

**LITERATURA**

1. Wunsch E., v knize: *Synthese von Peptiden, Methoden der organischen Chemie* (Houben-Weyl), sv. I, str. 46. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
2. Siro J. G., Martín J., García-Navío J. L., Remuñan M. J., Vaquero J. J.: *Synlett* 1998, 147.
3. Bailey W. J., Griffith J. R.: *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 5(1), 279 (1964).

**J. Šebestík<sup>a,b</sup>, J. Hlaváček<sup>a</sup>, and I. Stibor<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic*, <sup>b</sup>*Department of Organic Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Utilization of Microwave Technique for Cleavage of Acid-Labile Groups in Peptide Chemistry**

We report on our findings concerning the microwave-assisted silica gel removal of Boc and *t*-Bu groups protecting  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> and COOH groups in amino acids and peptides, and also on selectivity of this deprotection to OH-protecting *t*-Bu groups. To obtain high conversions in deprotection, increased microwave doses and prolongation of the reaction time are required. As a consequence, relatively large amounts of side products were detected. The microwave radiation could possibly be utilized in deprotection of peptides when the trifluoroacetic acid cleavage and subsequent neutralization of the acid with a tertiary base have to be avoided.

**POTŘEBUJEME PSEUDOSLOŽKY?****EGON ECKERT**

Ústav chemického inženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: eckert@vscht.cz

Došlo dne 7.IX.2000

---

 Klíčová slova: ropa, ropné frakce, charakterizace
 

---

**Úvod**

Ropa a ropné frakce jsou velmi složité směsi mnoha různých uhlovodíků a dalších organických i anorganických látek. Počet uhlíkových atomů ve složce se může pohybovat od jednoho až po více než padesát, takže složky mohou vykazovat normální bod varu v rozsahu od  $-162\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $540\text{ }^{\circ}\text{C}$ , přičemž počet různých složek, které vykazují velmi malé rozdíly v bodech varu, se velmi zvyšuje s rostoucím bodem varu. Např. 16 z 18 oktanových izomerů vře v rozmezí pouze  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Destilační chování těchto směsí se nejčastěji charakterizuje laboratorními destilačními testy: ASTM D 86 (obdoba diferenciální destilace za atmosférického tlaku), ASTM D 1160 (vakuová obdoba diferenciální destilace), TBP (True Boiling Point – vakuová nebo atmosférická vsádková rektifikace s velkou hodnotou refluxního poměru v mnohapatrové koloně), EFV (Equilibrium Flash Vapour – rovnovážná jednostupňová destilace za různých tlaků). Vesměs se jedná o závislost teploty měřené v některém místě experimentálního zařízení na objemovém oddestilovaném podílu.

**Teoretická část**

Test ASTM D 86 je jako jediný standardizován a vzhledem k jednoduchosti svého provedení a reprodukovatelnosti je často používán, ačkoliv jím získaná data mají malý teoretický význam<sup>1</sup>. Tento názor by mohl ovšem doznat změny, pokud se ukáže, že matematický model tohoto komplexního procesu navržený Greenfieldem a spol.<sup>2</sup> je dostatečně věrohodný.

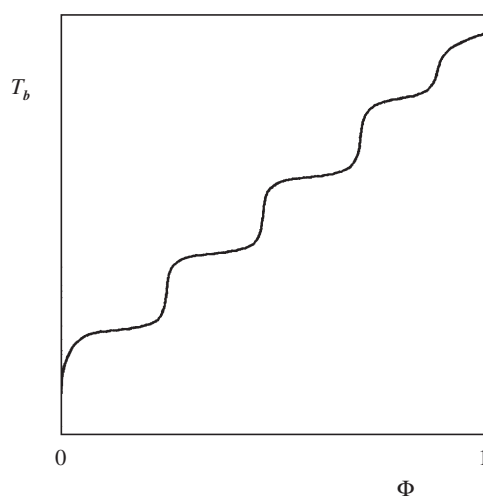
Data získaná pomocí TBP testu vytvářejí již daleko lepší teoretický základ k charakterizaci složité směsi. Skládá-li se směs ze složek s výraznými rozdíly v bodech varu, má TBP křivka „schodovitý“ tvar (obr. 1). Jestliže jsou ve směsi přítomny složky s blízkým bodem varu (např. izomery), „schodovitost“ se ovšem vytrácí (obr. 2). Tento tvar je typický právě pro ropné frakce.

Nejobtížněji proveditelný, a proto také nejméně používaný, je třetí základní charakterizační test EFV. K získání kompletní křivky je třeba provést celou sérii pokusů, protože jeden pokus poskytne pouze jeden bod.

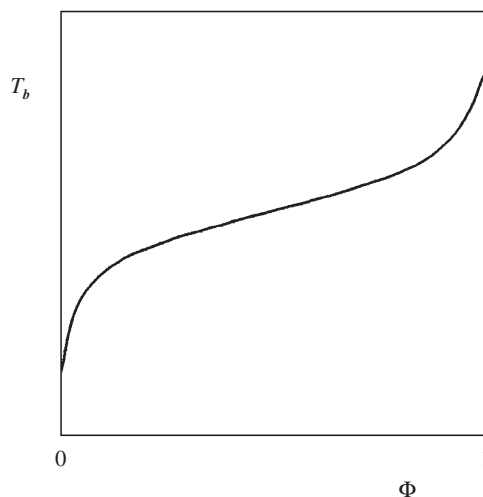
Protože jsou všechny charakterizační testy více či méně náročné, provádí se zpravidla pouze jeden z nich a zbývající se dopočítávají pomocí empirických regresních vztahů, kterých je v literatuře uvedena celá řada. Že je třeba přistupovat k takto získaným charakterizačním testům velmi obezřetně, je vzhle-

dem k pravděpodobným chybám používaných přepočtových vztahů zřejmé.

Pro návrhy destilačních kolon zpracovávajících ropu a ropné frakce byla v minulosti vyvinuta celá řada empirických metod, z nichž mnohé vyžadují velkou praktickou zkušenost. V poslední době se pro tento účel používá výhradně standardních simulačních programů (ASPEN PLUS, HYSYS, PRO II atd.), které při kvantitativním popisu destilačního chování ropné směsi na tzv. „lehkém konci“ vycházejí z aktuálních reálných složek (obvykle do  $\text{C}_5$ ) a pro výše vroucí podíly používají představu pseudosložek. Tato náhradní směs se obvykle skládá z několika reálných složek a maximálně čtyřiceti pseudosložek. Při zavedení pseudosložek se vychází z TBP křivky (naměřené nebo získané přepočtením z jiné charakterizační křivky), která se „rozřeže“ (obvykle ekvidistantně nebo ekvidistantně po částech, s krokem asi  $25\text{ K}$ ) ve směru teploty na požadovaný počet dílů – pseudosložek (obr. 3). Každý rozdíl  $\Phi_i^R - \Phi_i^L$  pak představuje objemový zlomek příslušné pseudosložky ve směsi. Pro příslušnou pseu-

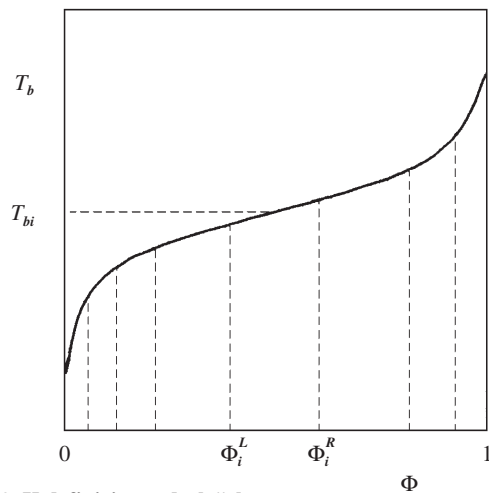


Obr. 1. Křivka TBP pro směs složek s výrazně odlišným bodem varu



Obr. 2. Křivka TBP pro mnohosložkovou směs (např. ropnou frakci) obsahující složky s blízkým bodem varu





Obr. 3. K definici pseudosložek

dosložku se pak stanoví střední normální bod varu buď jako aritmetický střed mezi krajními hodnotami „řezu“ nebo správněji podle věty o integrální střední hodnotě

$$T_{bi} = \frac{1}{\Phi_i^R - \Phi_i^L} \int_{\Phi_i^L}^{\Phi_i^R} T_b(\Phi) d\Phi \quad i = 1, \dots, I \quad (1)$$

Na základě středního normálního bodu varu  $T_{bi}$  a specifické hustoty  $S_i$ , což je hustota příslušné pseudosložky při 288,8 K dělená hustotou vody při téže teplotě

$$S_i = \rho_i / 999,024 \quad (2)$$

Lze pak podle různých empirických vztahů odhadnout molární hmotnost pseudosložky a veličiny potřebné k odhadu jejího rovnovážného chování jako jsou kritická teplota a tlak a acentrický faktor. Nejčastěji se používají vztahy navržené Keslerem a Leem

$$M = -12272,6 + 9486,4S + (4,6523 - 3,3287S)T_b^R + (1 - 0,77084S - 0,02058S^2)(1,3437 - 720,79 / T_b^R)10^7 / T_b^R + (1 - 0,80882S + 0,02226S^2)(1,8828 - 181,98 / T_b^R)(10^4 / T_b^R)^3 \quad (3)$$

$$T_c = (341,7 + 811S + (0,4244 + 0,1174S)T_b^R + (0,4669 - 3,2623S)10^5 / T_b^R) / 1,8 \quad (4)$$

$$P_c = (\exp(8,3634 - 0,0566 / S - (0,24244 + 2,2898 / S + 0,11857 / S^2)10^{-3} T_b^R + (1,4685 + 3,648 / S + 0,47227 / S^2)10^{-7} (T_b^R)^2 - (0,42019 + 1,6977 / S^2)10^{-10} T_b^R^3)).6894,8 \quad (5)$$

$$\omega = (-\ln(P_c / 101325) - 5,92714 + 6,09648 / T_{b,r} + 1,28862 \ln(T_{b,r}) - 0,169347 T_{b,r}^6) / (15,2518 - 15,6875 / T_{b,r} - 13,4721 \ln(T_{b,r}) + 0,43577 T_{b,r}^6) \quad (6)$$

nebo

$$\omega = -7,904 + (0,1352 - 0,007465 K_w) K_w + 8,359 T_{b,r} + (1,408 - 0,01063 K_w) / T_{b,r} \quad (7)$$

kde

$$T_{b,r} = T_b / T_c \quad (8)$$

$$K_w = 1,21644 (T_b)^{1/3} / S \quad (9)$$

Alternativou ke vztahům (6) a (7) je vztah navržený Edmisterem<sup>4</sup>

$$\omega = 3/7 \log(P_c / 101325) / (1/T_{b,r} - 1) - 1 \quad (10)$$

Další vztahy navrhl Riazi a Daubert<sup>5</sup>

$$M = 4,5673 \cdot 10^{-5} (T_b^R)^{2,1962} S^{-1,0164} \quad (11)$$

$$T_c = 24,2787 (T_b^R)^{0,58848} S^{0,3596} / 1,8 \quad (12)$$

$$P_c = 3,12281 \cdot 10^9 (T_b^R)^{-2,3125} S^{2,3201} \cdot 6894,8 \quad (13)$$

Oblíbeným je i Winnův nomogram, který do rovnicové podoby převedli Sim a Daubert<sup>6</sup>

$$M = 5,805 \cdot 10^{-5} (T_b)^{2,3776} S^{-0,9371} \quad (14)$$

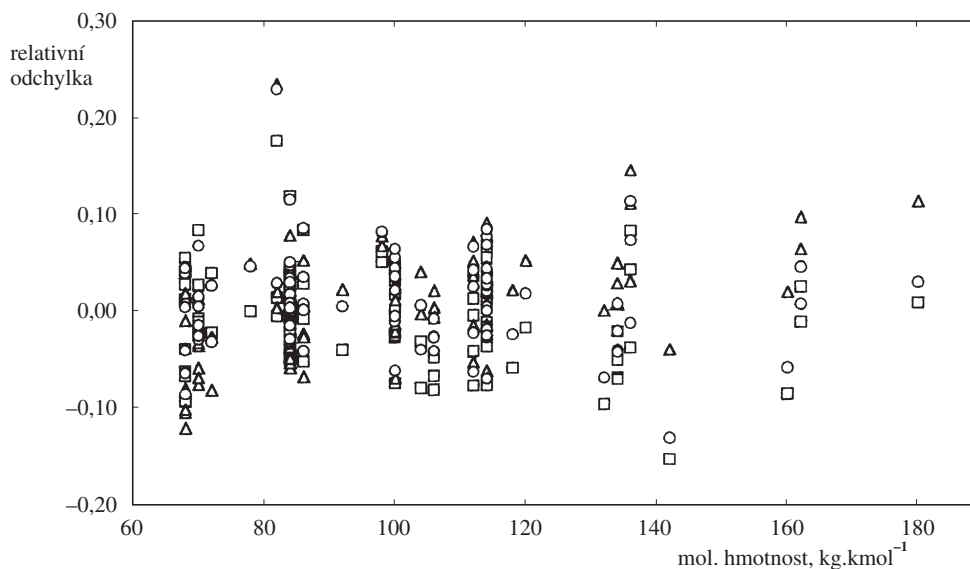
$$T_c = \exp(4,2009 (T_b)^{0,08615} S^{0,04614}) / 1,8 \quad (15)$$

$$P_c = 6,1483 \cdot 10^{12} (T_b)^{-2,3177} S^{2,4853} \quad (16)$$

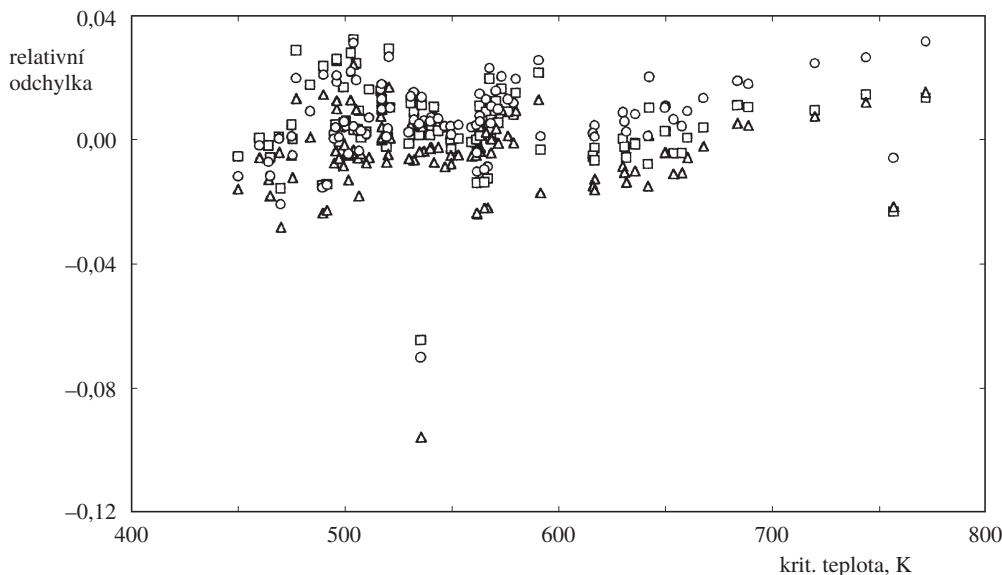
Všechny vztahy jsou uvedeny tak, aby je bylo možno snadno porovnat s původními literárními zdroji, a proto nebyly přepočítávací koeficienty do soustavy jednotek SI zahrnuty do násobných konstant.

## Výsledky a diskuse

Riazi a Daubert<sup>5</sup> testovali rovnice (11)–(13) na více než 100 složkách a uvádějí jejich průměrnou relativní odchylku 1,3–3,1 %. Maximální hodnota této odchylky činí dle autorů 11,8 %. Protože je toto otestování s použitím výpočetní techniky a databáze čistých složek poměrně snadné, bylo pro účely této práce provedeno znovu. Byla použita databáze čistých složek programu HYSYS (cit.<sup>7</sup>), ze které byly testovány všechny uhlovodíky s normálním bodem varu vyšším než 288,8 K. Jedinou další omezující podmínkou bylo, aby tato



Obr. 4. Porovnání skutečných a vypočtených molárních hmotností podle vztahů (3) – □, (11) – Δ a (14) – ○

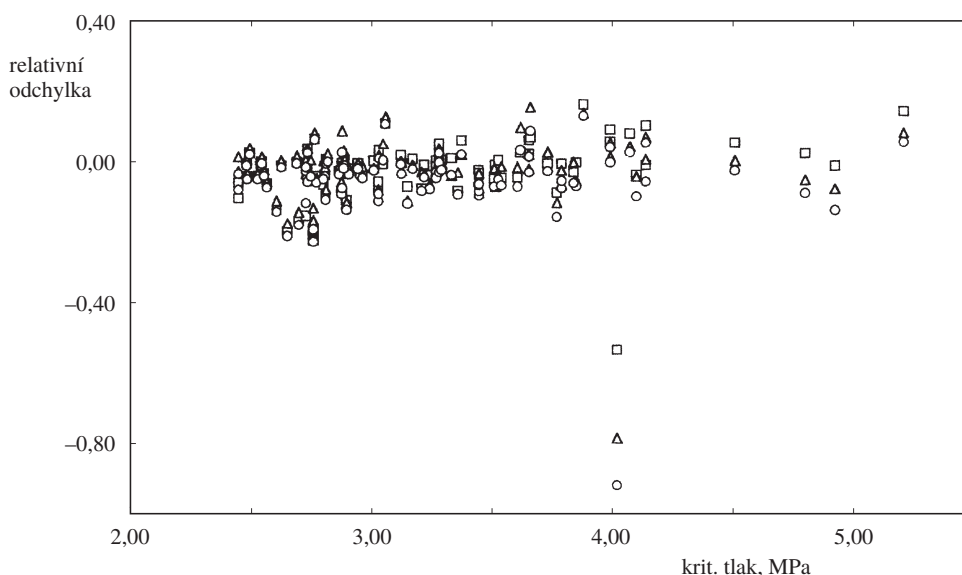


Obr. 5. Porovnání skutečných a vypočtených kritických teplot podle vztahů (4) – □, (12) – Δ a (15) – ○

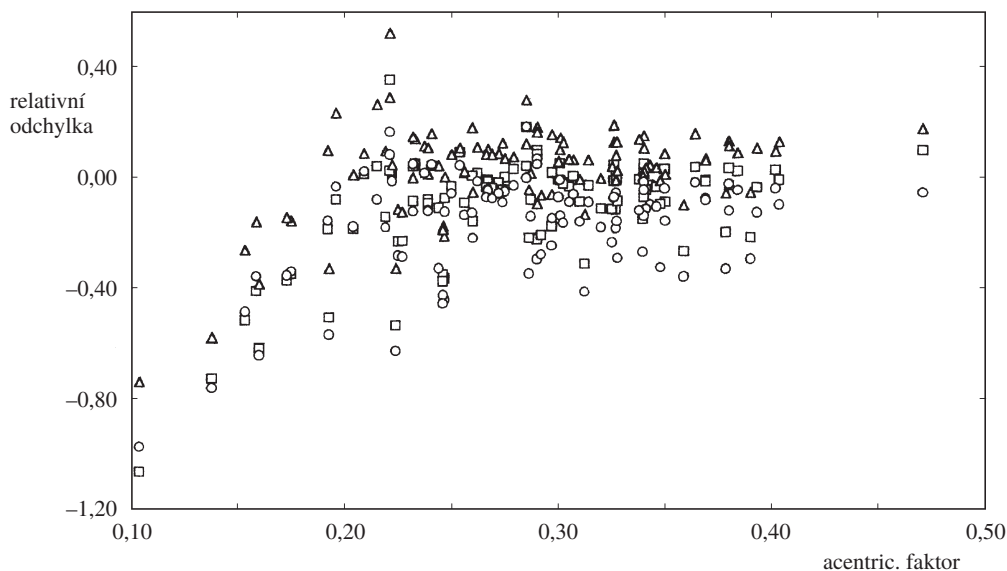
teplota byla v rozsahu teplot přípustných pro výpočet tenze čisté složky podle vztahu a z konstant, které jsou v databázi programu HYSYS. Tenze čisté složky je potřeba k výpočtu hustoty kapaliny  $\rho$  při 288,8 K, která byla počítána podle metody Hankinsona, Brobsta a Thompsona<sup>8</sup>. Uvedeným podmínkám vyhovovalo 98 složek. Získané výsledky jsou ukázány na obrázcích 4–8.

Na obr. 4–6 jsou znázorněny relativní odchylky vypočtených hodnot molárních hmotností, kritických teplot a kritických tlaků podle uvedených metod různých autorů od tabulovaných hodnot těchto veličin pro 98 složek. Je zřejmé, že v případě mnoha testovaných složek shoda vypočítaných parametrů se skutečností není zdaleka tak dobrá, jak uvádějí Riazi a Daubert<sup>5</sup>. Nejpřesnější hodnoty poskytují vztahy pro

výpočet kritické teploty, kde maximální relativní odchylka, odhlédneme-li od vypočtené hodnoty pro 3-methyl-cyklopenten, činí asi 3 %. U molárních hmotností je to již více než 10 % a u kritických tlaků asi 20 % (u již zmíněného 3-methyl-cyklopentenu je to ovšem ještě daleko více). Zajímavé výsledky ukazují obr. 7–8. Zde bylo při porovnání vypočtených hodnot acentrického faktoru podle vztahů (6), (7) resp. (10) použito i počítaných hodnot kritické teploty a kritického tlaku podle různých autorů a nikoliv správných hodnot pro příslušné složky. Je zřejmé, že chyby v odhadech těchto veličin se v konečné vypočtené hodnotě acentrického faktoru nekompensují, ale spíše násobí, takže běžná relativní odchylka je již 40 %, přičemž maximální pro 1,4-pentadien je asi 110 %! Vzhledem k těmto poměrně velkým chybám se naskytá otázka, proč



Obr. 6. Porovnání skutečných a vypočtených kritických tlaků podle vztahů (5) – □, (13) – Δ a (16) – ○



Obr. 7. Porovnání skutečných a vypočtených acentrických faktorů podle vztahů (6)–(7) s alternativním použitím vztahů (4)–(5) – □, (12)–(13) – Δ, (15)–(16) – ○

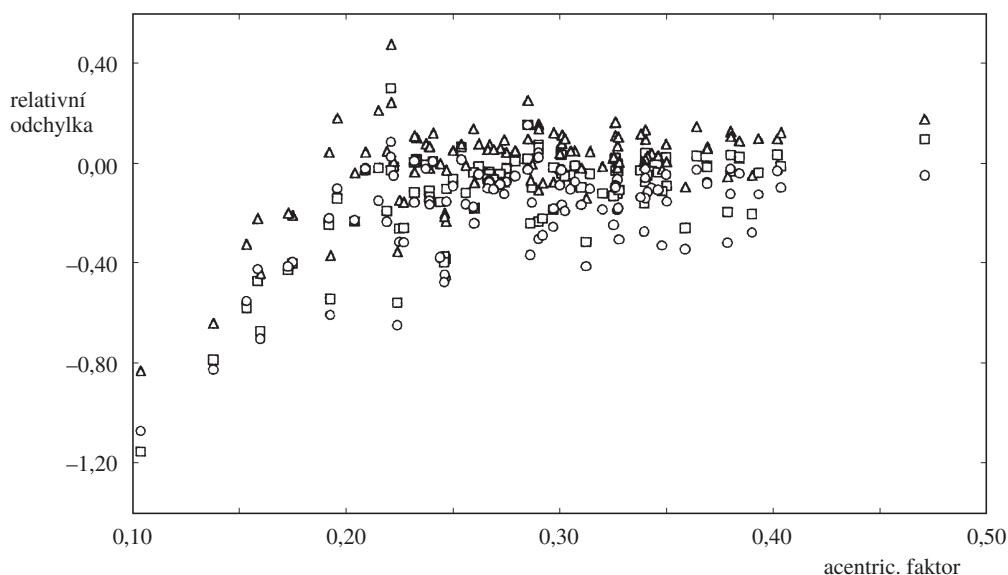
nepoužít při vytváření náhradní reprezentativní směsi místo pseudosložek reálné složky, pro něž jsou obvykle všechny termodynamické a transportní parametry již známy s velkou přesností, takže by bylo možno se obejít bez všech odhadovacích výše uvedených metod. Další výhodou tohoto přístupu by byla skutečnost, že uživatel by do seznamu složek mohl zahrnout složky, které jsou z hlediska jeho zájmu resp. z hlediska chování směsi významné (např. polární složky, převážně parafinické nebo naopak aromatické složky atd.). Úspěšné použití tohoto přístupu pro případ charakterizačního testu EFV bylo již ukázáno<sup>9,10</sup>. Analogického přístupu, který rovněž vychází z matematického modelování procesu provádění charakterizačního testu, by bylo možno použít i v případě testu ASTM D86, pokud se podaří nalézt jeho věrohodný

matematický model. Velkou nadějí v tomto směru je již zmíněná práce Greenfielda a spol.<sup>2</sup>

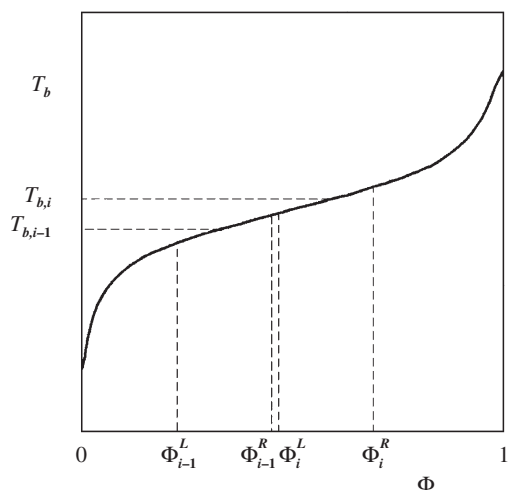
Matematický model procesu získávání charakterizační křivky nepotřebujeme v případě, rozhodneme-li se charakterizovat skutečnou směs, pro niž je známa TBP křivka, náhradní směsí reálných složek. V tomto případě jsou body varu zvolených reprezentativních složek buď zadány, nebo se dají snadno pro pracovní tlak vypočítat (obr. 9).

Objemové oddestilované podíly složek  $\Phi_i^R - \Phi_i^L$ ,  $i = 1, \dots, I$  pak můžeme hledat např. minimalizací vztahu

$$F(\Phi^L, \Phi^R) = \sum_{i=1}^{I+1} (\Phi_{i-1}^R - \Phi_i^L)^2 = \min \quad (17)$$



Obr. 8. Porovnání skutečných a vypočtených acentrických faktorů podle vztahu (10) s alternativním použitím vztahů (4)–(5) – □, (12)–(13) – Δ, (15)–(16) – ○



Obr. 9. K charakterizaci směsi vybranými reálnými složkami pomocí TBP křivky

přičemž musí být splněno (1) a platí  $\Phi_0^R = 0$ ,  $\Phi_{I+1}^L = 1$ . Je patrné, že minimalizace nemusí poskytnout tyto podíly tak, aby platilo

$$\sum_{i=1}^I (\Phi_i^R - \Phi_i^L) = 1 \quad (18)$$

což ale lze napravit normováním a objemové zlomky jednotlivých složek pak získat podle vztahu

$$x_{v,j} = (\Phi_j^R - \Phi_j^L) / \sum_{i=1}^I (\Phi_i^R - \Phi_i^L) \quad j = 1, \dots, I \quad (19)$$

Podrobné analýze tohoto přístupu bude věnováno další sdělení<sup>11</sup>.

Z výše uvedeného se zdá, že odpověď na otázku v nadpisu této práce je NE. Je samozřejmé, že navrhované netradiční přístupy byly umožněny až mocným rozvojem výpočetních prostředků a metod, které mohly nahradit dřívější, z dnešního hlediska velmi skromné nástroje inženýra – milimetrový papír, logaritmické pravítko případně kalkulačku. Současně lze ale očekávat, že vstup těchto netradičních přístupů do praxe nebude snadný, pokud se ho vůbec podaří prosadit.

#### Seznam symbolů

- $F$  funkce
- $I$  celkový počet složek
- $K_w$  Watsonův faktor,  $K^{1/3}$
- $M$  molární hmotnost,  $\text{kg.kmol}^{-1}$
- $P$  tlak, Pa
- $S$  specifická hustota
- $T$  teplota, K nebo R (je-li horní index R)
- $x_v$  objemový zlomek
- $\omega$  acentrický faktor
- $\Phi$  objemový oddestilovaný podíl
- $\rho$  hustota,  $\text{kg.m}^{-3}$

#### Dolní indexy

- $b$  při bodu varu
- $c$  kritická veličina
- $i, j$  složka  $i, j$
- $r$  redukovaná veličina

#### Horní indexy

- $L$  levý okraj intervalu
- $R$  pravý okraj intervalu

Práce byla vykonána s podporou fondu MSM 223400007.



## LITERATURA

1. Perry R. H., Green D. W., Maloney J. O.: *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. McGraw-Hill, New York 1997.
2. Greenfield M. L., Lavoie G. A., Smith C. S., Curtis E. W.: SAE paper 982724 (1998).
3. Kesler M. G., Lee B. I.: *Hydrocarbon Process.* (3), 153 (1976).
4. Edmister W. C.: *Petroleum Refiner* (4), 173 (1958).
5. Riazi M. R., Daubert T. E.: *Hydrocarbon Process.* (3), 115 (1980).
6. Sim W. J., Daubert T. E.: *IEC Proc. Des. Dev.* (3), 386 (1980).
7. HYSYS.Plant 2.1 Documentation, Hyprotech Ltd., Calgary, 1998.
8. Reid R. C., Prausnitz J. M., Poling B. E.: *The Properties of Gases and Liquids*. McGraw-Hill, New York 1986.
9. Eckert E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 571 (1999).
10. Eckert E., Královec K., Vaněk T.: *14<sup>th</sup> Int. Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2000, P3.11, Praha, 27.–31. srpen 2000.*
11. Eckert E., Královec K., Vaněk T.: *3<sup>rd</sup> European Congress of Chemical Engineering, Nürnberg, 26.–28. červen 2001.*

**E. Eckert** (*Department of Chemical Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Do We Need Pseudocomponents?**

A comparison of computation results for molecular weight, critical temperature, critical pressure and the acentric factor for 98 pure components using different methods frequently utilised for pseudocomponents characterising crude oil and petroleum fractions was made. It is shown that these methods mostly afford the estimated parameters with large errors. On the example of the true boiling point characterisation test, the possibility to use real components instead of pseudocomponents is shown. For real components, all thermodynamic characteristics are known with high accuracy. In addition, by the choice of real components, the user can take into account some specificities in the composition of the studied mixture.

## NÁVRH PIECKY PRE TERMICKÉ ANALÝZY NA VELMI VYSOKÉ TEPLoty

PETER HORBAJ

Strojnícka fakulta, Technická univerzita, Letná 9, 041 87  
Košice, Slovenská republika

Došlo dňa 18.II.2000

Kľúčové slová: termická analýza, spaľovanie metánu v kyslíku, piecka

### Úvod

V súčasnosti sa pre termickú analýzu používajú laboratórne piecky, ktoré sú súčasťou prístrojov pre termickú analýzu, ako sú napr. Mom, Rigaku, Netch.

Piecky prístrojov termickej analýzy pracujú väčšinou s elektrickým ohrevom a sú konštruované tak, aby v čo najmenšej miere ovplyvňovali termoelektrické napätie meracích termočlánkov. Horeuvedené zariadenia sú však cenovo ťažko dostupné a ich prevádzka si vyžaduje zaškolený personál.

Cieľom práce bolo navrhnúť a skonštruovať čo možno najjednoduchšiu laboratórnu piecku pre termickú analýzu, so zreteľom na využitie domácich materiálových a surovinových zdrojov a s tým, že ma zabezpečovať rýchly ohrev vzoriek na vysoké teploty a zároveň rýchlu možnosť chladnutia skúmaných vzoriek<sup>1</sup>.

Takto navrhnutá a skonštruovaná piecka bola v ďalšom verifikovaná na štúdiu priebehu teplôt liquidu a solidu pseudoneuspokojených ocelí<sup>2</sup>.

Pri výbere spôsobu ohrevu bol použitý ako palivo zemný plyn spaľovaný v čistom kyslíku, aby sa dosiahla vysoká teplota spalín. Pri návrhu tvaru a rozmerov piecky sa vychádzalo z rozmerov pracovného priestoru pece a podmienok nutných pre proces termickej analýzy. Pri konštrukcii piecky bolo nutné dbať na jednoduchosť realizácie montáže a demonštrácie jednotlivých dielcov piecky resp. na jednoduchosť vkladaní a vyberania meranej vzorky.

### Základné výpočty spaľovania metánu s kyslíkom

Výpočet reakčnej teploty spaľovania metánu s kyslíkom

Definujme reakčnú teplotu ako teplotu exotermickej reakcie, ktorá prebieha adiabaticky a izotermicky v štandardných podmienkach (prietokový systém, ustálený stav, východzie látky vo stechiometrickom pomere danej reakcie, rozsah reakcie jednotkový). Uvoľnené teplo  $\Delta H_{R,T}^0$  zvýši teplotu produktov z teploty  $T$  na teplotu reakčnú  $T_r$ :

$$-\Delta H_{R,T}^0 = \int_T^{T_r} \sum_i n_i C_{p_i} \cdot dT \quad (1)$$

$\Delta H_{R,T}^0$  – štandardná reakčná entalpia uvažovanej exotermickej reakcie pri teplote  $T$  napr. 298,15 K,  $n_i$  – látkové množstvo  $i$ -tého produktu, číselne zhodné so stechiometrickým koeficientom produktu,  $C_{p_i}$  – mólové teplo  $i$ -tého produktu.

Reakčnou teplotou sa nazýva teoretická teplota plameňa pri horení (oxidácii kyslíkom) bez ohľadu na skupenstvo reagujúcich (spaľovaných) látok. V literatúre sa tiež používa pojem – adiabatická teplota. Teoretická teplota plameňa je teplota vypočítaná a má najvyššiu hodnotu, pretože sa neuvádzajú disociačné endotermické reakcie<sup>6</sup>.

### Výpočet výhrevnosti metánu

Pri výpočte vychádzame zo základnej stechiometrickej rovnice oxidácie metánu:



Štandardnú reakčnú entalpiu  $\Delta H_{R,298}^0$  pre uvedenú reakciu určíme na základe Hessovho zákona, pričom hodnoty zlučovacích tepiel sú prevzaté z cit<sup>4,5,9</sup>.

$$\begin{aligned} \Delta H_{R,298}^0 &= -Q_n = \\ &= \Delta H_{\text{zl,CO}_2}^0 + 2 \Delta H_{\text{zl,H}_2\text{O}}^0 - \Delta H_{\text{zl,CH}_4}^0 - 2 \Delta H_{\text{zl,O}_2}^0 = \\ &= -393\,505,2 + 2(-242\,462,8) - (-74\,809,92) - \\ &- 2(0) = -803\,621 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1} \end{aligned} \quad (3)$$

Teda pri oxidácii metánu sa v reakčnej zóne plameňa uvoľní 803 621 J z jedného mólu  $\text{CH}_4$ .

### Návrh laboratórnej piecky pre termickú analýzu

Pri návrhu bolo potrebné zabezpečiť čo najhomogénnejšie pole, a preto bolo navrhnuté symetrické rozloženie horáčikov okolo pracovného priestoru pece. Na obr. 1 je znázornený systém centrálného rozvodu a usporiadania horáčikov.

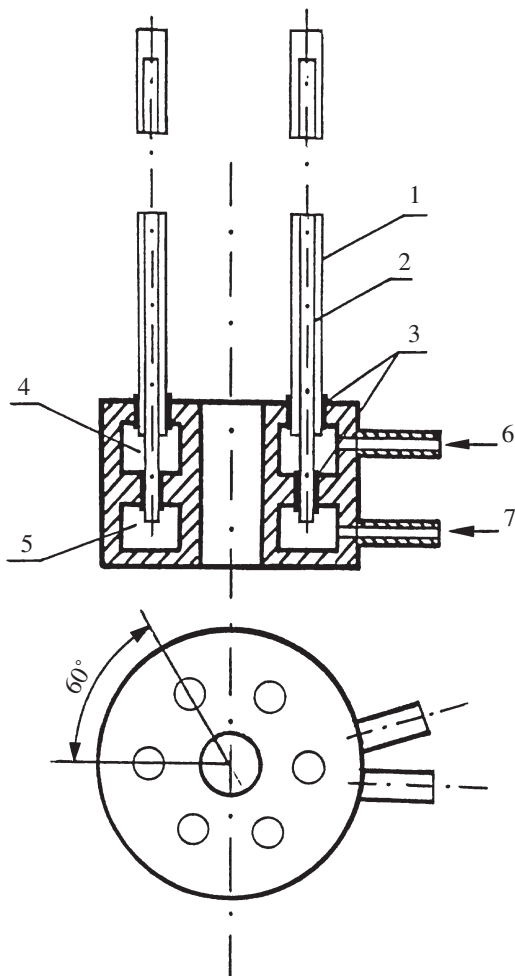
Pre kontrolu režimu prietoku boli použité prietokomery:

- pre metán – rotameter R-01
- pre kyslík – rotameter R-1

Prietok sa riadil pomocou ventilov priamo na zdroji. Prietokné množstvá zemného plynu sa pohybovali od 246 do 4 500  $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$  a prietokné množstvo kyslíka od 825 do 9 840  $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ . Pre meranie teplôt povrchov výmuroviek sa používali termočlánky chromel – alumel a pre meranie teploty odpadných spalín termočlánky Pt–Pt/Rh-10. Výsledky zapisoval líniový zapisovač EZ-9C. Schéma merania je zobrazená na obr. 3.

Rýchlosť prúdenia zemného plynu sa pohybovala v rozmedzí od 0,68 do 12,5  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  a rýchlosť prúdenia kyslíka od 0,32 do 3,8  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Výkony horáčikov sa menili od 134,76  $\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ , resp. 485,14  $\text{kJ}\cdot\text{hod}^{-1}$  do 2467  $\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ , resp. 8880,3  $\text{kJ}\cdot\text{hod}^{-1}$ .

Pri realizovaní piecky na termickú analýzu boli kladené vysoké požiadavky na žiaruvzdorný materiál. Bola požadovaná žiaruvzdornosť okolo 2000 °C, odolnosť voči náhlym zmenám teploty (rychlého nábehu teploty cca 150 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ , resp.



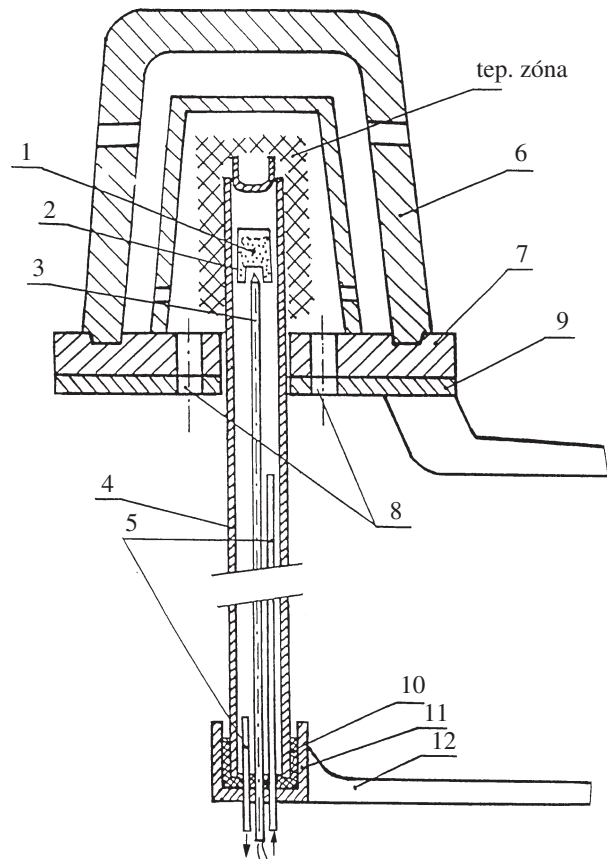
Obr. 1. **Horákový systém pece:** 1 – keram. rúrka ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) pre prívod  $\text{O}_2$ , 2 – keram. bikapilára ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) pre prívod  $\text{CH}_4$ , 3 – gumené tesnenie, 4 – kyslíková komora, 5 – plynová komora, 6 – prívod kyslíka, 7 – prívod plynu

rovnako rýchleho ochladenia), čo najnižšia tepelná vodivosť a merná tepelná kapacita.

Pri navrhovaní tvaru bolo potrebné rešpektovať jednoduchosť montáže keramických dielcov tak, aby bola možná rýchla výmena skúšobnej vzorky resp. výmena poškodenej časti pecky. Zvolené bolo odlievanie dielcov pecky do foriem. Ako materiál bol použitý žiarobetón Ti 17, vyrábaný na báze guľičkového korundu a vysokohlinitého cementu. Schéma laboratórnej pecky je zobrazená na obr. 2.

#### Tepelná práca laboratórnej pecky

Experimenty boli zamerané na určenie teploty v pracovnom priestore pecky v závislosti od príkonu<sup>2</sup>. Súbežne sa vyhodnocovala doba nábehu teploty v pracovnom priestore pecky, spotreba zemného plynu a kyslíka pri konštantnom príkone z 20 °C až po stacionárny stav, teplota spalín počas nábehu pecky, teplota vonkajšieho povrchu pracovnej a izolačnej výmurovky. Pod pojmom konštantný príkon je potrebné rozumieť presné dávkovanie zemného plynu a kyslíka od počiatku ohrevu v čase  $\tau = 0$  až po nábeh max. teploty v pra-



Obr. 2. **Schéma laboratórnej pece:** 1 – vzorka, 2 – keramický téglik, 3 – bikapilára s termočlánkom, 4 – retorta, 5 – kovová kapilára, 6 – tepelná izolácia, 7 – tepelná izolácia, 8 – horák, 9 – podložka, 10 – gumené tesnenie, 11 – objímka, 12 – držiak

čovom priestore pecky, úmernej prívádzanému množstvu tepla<sup>8</sup>. Ako vyplýva z obr. 4, na ktorom sú graficky interpretované namerané výsledky z experimentov, je možné predpokladať lineárnu závislosť doby nábehu teploty na príkone. Pre tento účel bola navrhnutá funkcia<sup>1,3</sup>

$$t(\tau) = t_p^K (1 - e^{-b\tau}) \quad (4)$$

kde:  $t_p^K$  je limitujúca teplota (konečná teplota – stacionárny stav),  $b$  – konštanta, vypočítaná pomocou regresnej analýzy.

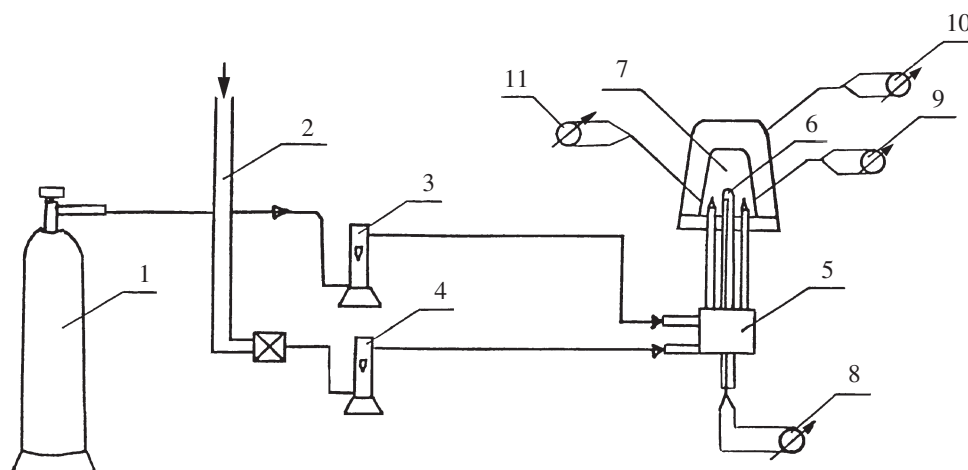
Aby bolo možné vypočítať konštantu  $b$ , upraví sa táto rovnica na tvar:

$$Y = \ln \left( 1 - \frac{t(\tau)}{t_p^K} \right) = -b \cdot \tau \quad (5)$$

Konštanta  $b$  je úmerná príkonu  $P$  a keďže  $b = k_0 \cdot P$  je možné predchádzajúcu rovnicu napísať v tvare:

$$Y = \ln \left( 1 - \frac{t(\tau)}{t_p^K} \right) = -k_0 P \cdot \tau \quad (6)$$

Pomocou tejto rovnice a konštanty  $k_0$  je možné vypočítať dobu nábehu teploty pri ľubovoľnom zvolenom príkone



Obr. 3. Schéma zapojenia termočlánkov umiestnených na laboratórnej pece; 1 – zdroj kyslíka, 2 – zdroj zemného plynu, 3 – meranie prietoku kyslíka, 4 – meranie prietoku zemného plynu, 5 – centrálny rozvod médií, 6 – pracovný priestor pece, 7 – spaľovacia komora, 8 – zapisovač teploty v pracovnom priestore pece termočlánkov Pt–Pt/Rh-10, 9 – zapisovač teploty vonkajšieho povrchu pracovnej výmurovky – termočlánkov Ch-A, 10 – zapisovač teploty vonkajšieho povrchu trvalej výmurovky – termočlánkov Ch-A, 11 – zapisovač teploty odchádzajúcich spalín zo spaľovacej komory termočlánkov Pt–Pt/Rh-10

ne. Toto tvrdenie však platí len pre testovanú laboratórnu pecku<sup>1</sup>.

## Diskusia výsledkov

Výsledky stechiometrického spaľovania sa opierali o základnú rovnicu (2).

Pre popis dejov prebiehajúcich pri spaľovaní metánu v kyslíku bol použitý termodynamický prístup. Základné termodynamické hodnoty pre  $O_2$ ,  $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $CO$ ,  $CH_4$ ,  $H_2O(g)$ ,  $C$  uvedené v cit.<sup>4,5</sup> majú platnosť do 3000 K. Pre niektoré disociačné reakcie však bolo potrebné uvažovať pri výpočtoch rovnovážnych konštánt teploty až 5000 K.

Základné termodynamické hodnoty pre uvažované reakcie pri spaľovaní metánu v kyslíku sa opierajú o tabelárne hodnoty.

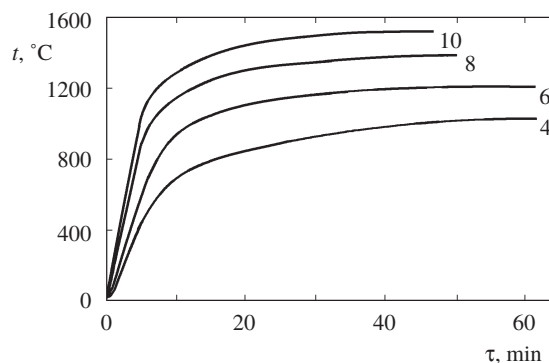
Stupeň premeny metánu pri jeho stechiometrickom spaľovaní v kyslíku je prakticky stopercentný, pri teplote 5000 K  $\alpha_{CH_4} = 0,9987$ , a preto pri ďalších výpočtoch bola uvažovaná iba priama reakcia a spätná bola pri výpočtoch zanedbaná.

Štandardná reakčná entalpia reakcie spaľovania metánu s kyslíkom má hodnotu  $\Delta H_{R,298,15}^0 = -803\,621\text{ J}$ .

Pre túto výhrevnosť bola vypočítaná teoretická teplota plameňa stechiometrického spaľovania metánu s kyslíkom bez disociácie  $T_{ad} = 4751\text{ K}$ . Je to teplota, ktorú by dosiahli produkty predchádzajúcej reakcie, pri privádzaní reaktantov adiabatického spaľovania do procesu o teplote 298,15 K.

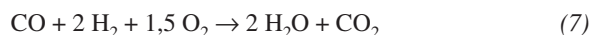
Výpočet teoretickej teploty stechiometrického spaľovania s disociáciou, môže byť uskutočňovaný dvoma spôsobmi.

1. Tak, že teoreticky necháme spáliť metán na zložky  $CO_2$  a  $2\ H_2O$  (exotermická reakcia), ktoré dosiahnú teplotu  $T_{ad} = 4751\text{ K}$ . Z tejto teploty je vedená adiabatou produktov disociácie  $CO_2$  a  $2\ H_2O$  na  $CO$ ,  $H_2$  a  $O_2$  (cit.<sup>1</sup>). Priesečnica adiabaty s rovnovážnou krivkou disociácie, udáva teoretickú teplotu spaľovania metánu v kyslíku disociáciou  $T_{adis} = 3300\text{ K}$ .



Obr. 4. Nábeh teploty v závislosti od času a príkonu; jednotlivé krivky (od spodnej po hornú) sa líšia stúpajúcim príkonom

2. Podľa druhého spôsobu necháme metán spáliť nedokonale na zložky  $CO$ ,  $H_2$ ,  $O_2$  tak, ako je to vyjadrené reakčným cyklom, teda takú istú teplotu  $T_{ad} = 4751\text{ K}$  dostaneme, ak by sa uvažovala reakcia:



ktorej reaktanty by mali tepelný obsah 35 731,5 J, čo znamená potrebu ohriať ich na teplotu 541,6 K. Rovnovážna krivka tejto reakcie s adiabatou dáva takú istú teplotu ako prvý spôsob, t.j.  $T_{adis} = 3300\text{ K}$ .

Pre pyrometrickú účinnosť podľa výpočtu teoretických teplôt platia vzťahy:

$$\eta = \frac{T_{skut}}{T_{ad}} = \frac{T_{skut}}{4751} \quad (8)$$

$$\eta = \frac{T_{skut}}{T_{adis}} = \frac{T_{skut}}{3300} \quad (9)$$



Pyrometrická účinnosť spaľovania metánu v kyslíku bez disociácie a s disociáciou bude

$$\eta = \frac{T_{\text{adis}}}{T_{\text{ad}}} = \frac{3300}{4751} = 0,7 \quad (10)$$

V experimentálnej časti bola navrhnutá laboratórna piecka zrealizovaná a boli na nej vykonané mnohé merania. Piecka má slúžiť pre účely termickej analýzy. Ako najvhodnejšia žiaruvzdorná hmota sa pri experimentálnych meraniach ukázala hmota v zložení:

- guľkový korund,
- vysokohlinový cement,
- jemnomletý  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Pri objemovom prietoku  $3084 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  zemného plynu a  $6550 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  kyslíka, bola v stacionárnom stave dosahovaná teplota cca 1800 K. Stacionárny režim bol pre uvádzané príkony dosahovaný cca v 40. minúte<sup>1</sup>.

## Záver

Neustále zvyšovanie ceny fosílnych palív, vrátane zemného plynu, ktoré súvisí s ich postupným ubúdaním, zvyšuje tlak na efektívnejšie využívanie týchto palív. Potreba dosahovania vysokých teplôt pre rôzne účely (laboratória, výskumné pracoviská, vysoké školy a pod.), rovnako pôsobí na skutočnosť jednoduchého naplnenia tejto potreby. Pritom spaľovanie zemného plynu v čistom kyslíku toto ľahko umožňuje<sup>7,8</sup>.

Neopomenuteľná je tiež cena prístrojov pre termickú analýzu, ktorej základnou časťou je práve laboratórna piecka. Tieto zariadenia okrem cenovej náročnosti vyžadujú aj odborné zaškolený personál. Podľa návrhu<sup>1</sup>, tieto aspekty odpadávajú.

V ďalšom je potrebné spomenúť výhody vyplývajúce zo spaľovania zemného plynu v kyslíku, konkrétne:

- malý objem spalín,
  - nehlučnosť,
  - nepožaduje sa predohrev plynov,
  - vysoká rýchlosť spaľovania,
  - jednoduchá regulácia rýchlosti ohrevu,
- z čoho vyplývajú i malé rozmery navrhovaných piecok.

## LITERATÚRA

1. Girman V.: *Diplomová práca*. HF TU, Košice 1988.
2. Kijac J.: *Závěrečná správa VÚ P – 3 – 1 186*, Košice 1987.
3. Ďurišin J.: Prihláška ZN č.36/86.
4. Barin I., Knacke O.: *Thermochemical Properties of Inorganic Substances*. Springer-Verlag, Berlin 1973.
5. Raznievič K.: *Termodynamické tabuľky*. Alfa, Bratislava 1985.
6. Příhoda M., Rédr M.: *Základy tepelné techniky*. SNTL, Praha 1991.
7. Komorová L., Imriš I.: *Termodynamika v hutníctve*. Alfa, Bratislava 1991.
8. Horbaj P., Girman V.: *Hutnícke Listy* 46, 3, 199 (1991).
9. Kačík F., Kačíková D.: *Fyzikálna chémia a fyzikálno-chemické analytické metódy*. Technická univerzita, Zvolen 1998.

**P. Horbaj** (*Mechanical Engineering Faculty, Technical University, Košice, Slovak Republic*): **Design of a Laboratory Furnace for Thermal Analysis at Very High Temperatures**

The contribution presents a home-made relatively simple and inexpensive high laboratory furnace for thermal analysis. Natural gas is used as a fuel and oxygen as an oxidation agent.

## DATABÁZE PMMA-2DPAGE – NOVÝ ČLEN RODINY FEDERALIZOVANÝCH DATABÁZÍ DVOUROZMĚRNÉ GELOVÉ ELEKTROFORÉZY

JIŘÍ KNÍŽEK<sup>a</sup>, JIŘÍ STULÍK<sup>a</sup>, LENKA HRDLIČKOVÁ<sup>b</sup>, IVANA KOMÁRKOVÁ<sup>b</sup>  
a ALEŠ MACELA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav radiobiologie a imunologie, e-mail: knizek@pmfhk.cz, jstulik@pmfhk.cz, <sup>b</sup>Ústav informací, Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

Došlo dne 21.IX.2000

**Klíčová slova:** dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza, proteinová databáze, proteom, federalizovaná databáze, kolorektální karcinom

### Úvod

Proteom je rychle se rozvíjející oblast výzkumu zaměřená na kvantitativní a kvalitativní analýzu proteinové exprese. Předpokládá se, že tato technologie přinese nové výsledky, které nemohou být získány např. sekvenováním DNK, tj. analýzou genomu. Proteom by měl poskytovat kompletně nové informace týkající se funkčních molekul-proteinů se zaměřením na jejich buněčný metabolismus, včetně analýzy post-translačních modifikací, subcelulární lokalizaci, funkční aspekty a fyzikální interakce proteinů s dalšími buněčnými složkami<sup>3</sup>.

Současné rozšíření proteomové technologie odráží velký pokrok dosažený ve třech základních proteomových postupech zahrnujících dvourozměrnou gelovou elektroforézu (2-DE), hmotnostní spektrometrii a počítačovou analýzu obrazu včetně konstrukce 2-DE databáze. Tento metodologický zlom vyvolal potřebu porovnávat a vyměňovat data navzájem mezi jednotlivými laboratořemi. Za tímto účelem byla navržena pravidla pro výstavbu federalizované 2-DE databáze<sup>1</sup>. V současné době je z domovských stránek WORLD-2DPAGE databáze dostupných více než třicet plně nebo částečně federalizovaných 2-DE databází. Nedávno byl vyvinut nový software pro výstavbu 2-DE databáze na libovolném vlastním Webovém serveru<sup>2</sup>. My jsme použili tento software pro konstrukci naší vlastní plně federalizované 2-DE databáze proteinů extrahovaných z lidského kolorektálního karcinomu (PMMA-2DPAGE).

Tato publikace popisuje základní vlastnosti této databáze, která může být též využívána dalšími uživateli pro prezentaci jejich 2-DE dat získaných proteomovou analýzou mnoha různých organismů.

### Experimentální část

Příprava vzorků, 2-DE elektroforéza a hmotová spektrometrie

Kompletní postupy popisující přípravu vzorků, 2-DE a identifikace proteinů byly popsány jinde<sup>5</sup>. Krátce jednotlivé páry

kolorektálního karcinomu a normální sliznice tlustého střeva byly během 30 min po chirurgické resekcii extrahovány v lyzovacím vzorkovém pufru pro izoelektrickou fokusaci. V prvním směru dvourozměrné gelové elektroforézy byla prováděna izoelektrická fokusace na sigmoidálních pH 3–10 gradientech. V druhém směru jsme použili buď gradientní 9–16 % polyakrylamidovou elektroforézu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) nebo 16,5 % T, 6 % C tricínovou-SDS-PAGE pro separaci nízkomolekulárních proteinů. Po elektroforéze byly proteiny obarveny koloidním roztokem stříbra a pak byly denzitometricky proměřeny pomocí laserového denzitometru (4000x5000 pixel, 12 bit/pixel; Molecular Dynamics, Palo Alto, USA), jenž byl propojen po síti se SunSparc s-s20 pracovní stanicí (Sun Microsystems Inc., Mountain View, USA). Počítačová 2-DE analýza obrazu byla provedena použitím programu Melanie, verze 2.2 (Bio-Rad, Richmond, USA)<sup>13</sup>. Pro identifikaci proteinů byly připraveny 2-DE mikropreparativní gely, na které bylo naneseno 500 µg proteinů. Separované proteiny byly buďto přímo vyříznuty z gelů nebo byly elektroforeticky přeneseny na nitrocelulosovou membránu a obarveny amidočerní. Vybrané proteinové skvrny byly vyříznuty z gelu, trypsinem degradovány na peptidy a vzniklá peptidická směs byla smíchána s 2-(4-hydroxybenzyliden)-2-kyanoctovou kyselinou a proměřena hmotnostním spektrometrem Voyager DE PRO „reflectron time of flight instrument with delayed extraction“ (PerSeptive, Framingham, MA, USA). V případě nejednoznačné proteinové identifikace, peptidické sekvence, získané na zařízení Micromass Q-ToF „hybrid quadrupole orthogonal acceleration tandem mass spectrometer fitted with Z-spray nanoflow electrospray ion source“ (Micromass, Manchester, UK), byly použity pro databázové vyhledávání.

### Konstrukce databáze

Databáze byla zkonstruována využitím softwaru Make2ddb napsaného v jazyce Perl<sup>2</sup>. Tento program je dostupný na internetu<sup>6</sup> a musí být nainstalován na skriptech WWW serveru Apache 1.27 (serverový software může být získán z internetu<sup>7</sup>); pracuje na pracovní stanicí Sun pod operačním systémem Unix. Soubory 2-DE obrazů byly vytvořeny proměřením gelů obarvených stříbrem denzitometrem s vysokým rozlišením. Takto připravené 2-DE obrazy byly zpracovány softwarem Melanie 2-DPAGE<sup>13</sup> za účelem získání 2-DE map, na kterých byly detegovány a označeny proteinové skvrny. 2-DE obrazy v „Melanie-formátu“ byly konvertovány na soubory GIF za účelem vytvoření obrazů, které umožňují uživatelský dotaz jednoduše kliknutím na proteinovou skvrnu. Vstupní stránka a některé další návštěvní stránky proteinové databáze PMMA-2DPAGE<sup>8</sup> byly naprogramovány v jazyce HTML<sup>4,9</sup>.

### Výsledky a diskuse

Zkonstruovali jsme WWW databázi, s názvem PMMA-2DPAGE, za účelem prezentace našich výsledků získaných z proteomové studie zaměřené na etiopatogenezi tumoru tlustého střeva. Tato databáze byla vytvořena za využití Make2ddb softwaru vyvinutého v Ženevě, jenž splňuje všechna kritéria požadovaná pro plně federalizované 2-DE databáze. Vlastní vstup do databáze<sup>10</sup> je zobrazen na obr. 1. PMMA-2DPAGE

**PMMA-2DPAGE**Gateway: URL: <http://www.pmma.pmfhk.cz/2d.html>**PMMA-2DPAGE****Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database****Search in PMMA-2DPAGE**

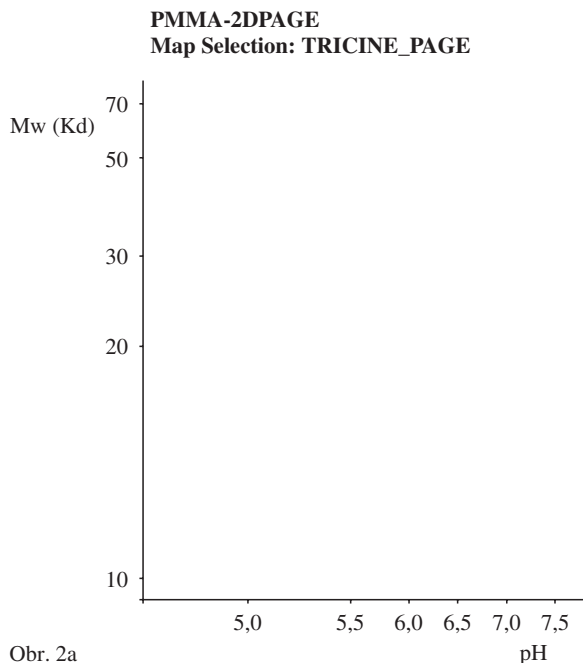
- [by description line \(DE\)](#) or [by ident \(ID\)](#)
- [by accession number \(AC line\)](#)
- [by clicking on a spot](#): select one of the reference maps, click on a spot and then get the corresponding information from the database.
- [by author \(RA lines\)](#)
- [list all entries](#)

**Gateways to other related servers**

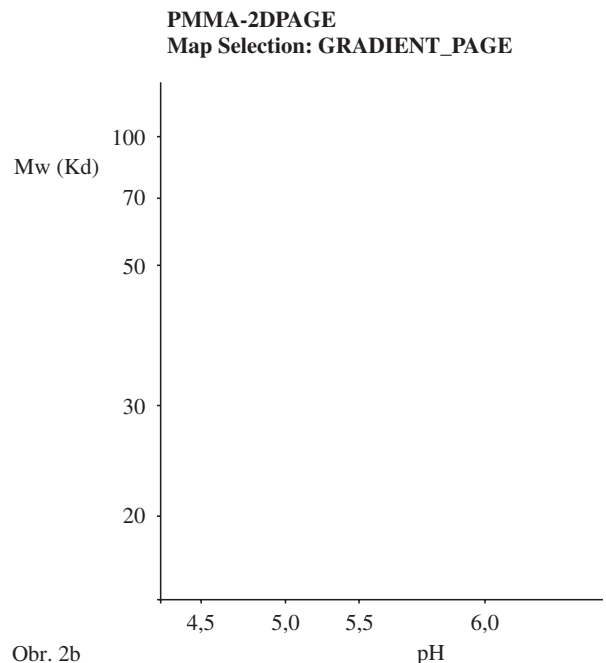
- [WORLD-2DPAGE](#) - Index to other Federated 2-D PAGE database
- [ExPASy](#) - The molecular biology web server in Geneva
- [PROTEOME CENTER](#) - Proteome Center for the Study of Intracellular Parasitism of Bacteria
- [MALDI - TOF](#) - Mass Spectrometry Laboratory in Techonin
- [PMFHK](#) -The Purkyne Military Medical Academy in [Hradec Králové](#) (A4-format printable photo)
- [List of Publications](#)

*This database was constructed and maintained by [Jiri Knizek](#) and [Jiri Stulik](#), [Lenka Hrdlickova](#) and [Ivana Komarkova](#) using the [Make2ddb](#) package from the [WORLD-2DPAGE](#) of the [ExPASy web sever](#).*

Obr. 1.



Obr. 2a



Obr. 2b

## PMMA-2DPAGE: all entries

1. **1AXN\_HUMAN (1421662)**  
Annexin Family Mol\_id: 1; Molecule: Annexin Iii; Chain: Null; Engineered: Yes; Other\_details: Human Recombinant.
2. **AAC31610\_HUMAN (AAC31610)**  
LYSOPHOSPHOLIPASE.
3. **ANX4\_HUMAN (P09525)**  
ANNEXIN IV (LIPOCORTIN IV) (ENDONEXIN I) (CHROMOBINDIN 4) (PROTEIN II) (P32.5) (PLACENTAL ANTICOAGULANT PROTEIN II) (PAP-II) (PP4-X) (35-BETA CALCIMEDIN) (CARBOHYDRATE-BINDING PROTEIN P33/P41) (P33/41).
4. **BAA37117\_HUMAN (BAA37117)**  
NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase.
5. **CAH1\_HUMAN (CRHU1)**  
CARBONIC ANHYDRASE I (EC 4.2.1.1) (CARBONATE DEHYDRATASE I).
6. **CRTC\_HUMAN (P27797)**  
CALRETICULIN (CRP55) (CALREGULIN) (HACBP) (ERP60) (52 KD RIBONUCLEOPROTEIN AUTOANTIGEN RO/SS-A).
7. **CYPH\_HUMAN (P05092)**  
PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE A (EC) (PPIASE) (ROTAMASE) (CYCLOPHILIN A) (CYCLOSPORIN A-BINDING PROTEIN).
8. **EF2\_HUMAN (P13639)**  
ELONGATION FACTOR 2 (EF-2).
9. **FABL\_HUMAN (P07148)**  
FATTY ACID-BINDING PROTEIN, LIVER (L-FABP).
10. **K1CR\_HUMAN (P05783)**  
KERATIN, TYPE I CYTOSKELETAL 18 (CYTOKERATIN 18) (K18) (CK 18).
11. **NDKA\_HUMAN (P15531)**  
NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE A (EC 2.7.4.6) (NDK A) (NDP KINASE A) (TUMOR METASTATIC PROCESS-ASSOCIATED PROTEIN) (METASTASIS INHIBITION FACTOR NM23) (NM23-H1).
12. **PHB\_HUMAN (P35232)**  
PROHIBITIN.
13. **PLS1\_MOUSE (P50580)**  
PROLIFERATION-ASSOCIATED PROTEIN 1 (PROTEIN P38-2G4).
14. **S108\_HUMAN (P05109)**  
CALGRANULIN A (MIGRATION INHIBITORY FACTOR-RELATED PROTEIN 8) (MRP-8) (CYSTIC FIBROSIS ANTIGEN) (CFAG) (P8) (LEUKOCYTE L1 COMPLEX LIGHT CHAIN) (S100 CALCIUM-BINDING PROTEIN A8).
15. **S109\_HUMAN (P06702)**  
CALGRANULIN B (MIGRATION INHIBITORY FACTOR-RELATED PROTEIN 14) (MRP-14) (P14) (LEUKOCYTE L1 COMPLEX HEAVY CHAIN) (S100 CALCIUM-BINDING PROTEIN A9).
16. **S111\_HUMAN (P31949)**  
CALGIZZARIN (S100C PROTEIN) (MLN 70).
17. **SM22\_HUMAN (Q01995)**  
SMOOTH MUSCLE PROTEIN 22-ALPHA (SM22-ALPHA) (TRANSGELIN) (WS3-10) (22 KDA ACTIN-BINDING PROTEIN).
18. **SODM\_HUMAN (P04179)**  
SUPEROXIDE DISMUTASE [MN], MITOCHONDRIAL (EC).
19. **TPIS\_HUMAN (P00938)**  
TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE (EC) (TIM).
20. **TPM1\_MOUSE (P46901)**  
TROPOMYOSIN, FIBROBLAST ISOFORM 1 (TM-1).

Obr. 3.

v současné době obsahuje dvě odlišné 2-DE mapy lidského nádoru tlustého střeva. První zmíněná 2-DE mapa (s názvem TRICINE\_PAGE, obr. 2a) zahrnuje asi 2000 proteinů s molekulárními hmotnostmi v rozpětí od 8 do 70 kDa. Druhá zmíněná 2-DE mapa (s názvem GRADIENT\_PAGE, obr. 2b) obsahuje přibližně 2500 proteinů, jejichž molekulární hmotnosti se nacházejí v rozpětí od 14 do 200 kDa. Všechny identifikované proteiny jsou (červeně) zvýrazněny a kliknutím na jednotlivé skvrny je vždy vyvolán z databáze uložený text s detailním popisem příslušného proteinu. K získání požadovaných informací o proteinech, tzv. databázové vstupy, mohou být aplikovány různé přístupy pátrání (obr. 1). Každý vstup pak poskytuje základní informaci o proteinu jako proteinový identifikační kód, přístupové číslo, název proteinu, specifikaci organismu, který byl zdrojem proteinu, literární citace, funkční a strukturní data, postup použitý k identifikaci proteinu a dále též křížové odkazy (hypertexty) na jiné databáze. Podrobnosti je možné nalézt v manuálu „SWISS-2DPAGE

USER MANUAL“ na internetu<sup>11</sup>. Naše databáze v současné době obsahuje 20 různých vstupů; jejich seznam je uveden na obr. 3. Vstupové názvy proteinů a jejich přístupová čísla korespondují se vstupovými názvy a přístupovými čísly těchto proteinů v proteinových databázích SWISS-PROT nebo NCBI za účelem usnadnění vzájemné komunikace. Všechny informace uložené v PMMA-2DPAGE, tj. zmíněné 2-DE mapy a proteinové vstupy, mohou být snadno aktualizovány a rozšiřovány.

Ohromující množství informací získaných při sekvenování kompletních genomů a pokrok v proteinové separaci a analýze tvoří základ současné expanze proteomového výzkumu. Efektivní využívání nahromaděných dat nutně vede ke konstrukci 2-DE databází, což umožňuje rozšiřování informací mezi vědeckými skupinami. PMMA-2DPAGE databáze je první českou 2-DE databází, která byla začleněna do seznamu federalizovaných 2-DE databází přístupných na internetu<sup>12</sup>. Databáze PMMA-2DPAGE je otevřena pro další české vědce



zabývající se proteomovým výzkumem za účelem konfrontace a výměny jejich 2-DE dat s jinými laboratořemi.

## Závěr

Proteomová analýza je relativně novou technologií poskytující informace o kvantitativních změnách v proteinové expresi za přesně definovaných podmínek. Tato technologie by měla doplňovat data získaná sekvenováním DNK a měla by nabízet nové cíle pro biologické a medicínské studie. Podobně jako sekvenování DNK představuje nyní proteomová analýza vysoce efektivní technologii produkující obrovská množství dat, která je třeba vzájemně vyměňovat. Za tímto účelem jsou konstruovány vzájemně propojené rozsáhlé databáze proteinů separovaných pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy. Tato zpráva popisuje vznik první české databáze tohoto druhu; jenž může být využívána českou vědeckou komunitou pro zveřejňování výsledků z proteomových studií.

*Studie byla subvencována z grantu č. 310/00/1373 Grantové agentury České republiky.*

## LITERATURA

1. Appel R. D., Bairoch A., Sanchez J.-C., Vargas J. R., Golaz O., Pasquali C., Hochstrasser D. F.: *Electrophoresis* 17, 540 (1996).
2. Hoogland C., Baujard V., Sanchez J.-C., Hochstrasser D. F., Appel R. D.: *Electrophoresis* 18, 2755 (1997).
3. Humphrey-Smith I., Blackstock W.: *J. Protein. Chem.* 16, 537 (1997).
4. Spainhour S., Eckstein R.: *Webmaster v kostce*. Computer Press, Praha 1999.
5. Stulík J., Koupilová K., Österreicher J., Knížek J., Macela A., Bureš J., Jandík P., Langr F., Dědič K., Jungblut P. R.: *Electrophoresis* 20, 3628 (1999).
6. URL: <http://www.expasy.ch/ch2d/make2ddb.html>
7. URL: <http://www.apache.org/>
8. URL: <http://www.pmma.pmfhk.cz/>
9. URL: <http://www.w3.org/MarkUp/>
10. URL: <http://www.pmma.pmfhk.cz/2d.html>
11. URL: <http://www.expasy.ch/ch2d/manch2d.html>
12. URL: <http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html>
13. URL: <http://www.expasy.ch/melanie/>

**J. Knížek<sup>a</sup>, J. Stulík<sup>a</sup>, L. Hrdličková<sup>b</sup>, I. Komárková<sup>b</sup>, and A. Macela<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Radiobiology and Immunology*, <sup>b</sup>*Institute for Information, Purkyně Military Medical Academy, Hradec Králové*): **The PMMA-2DPAGE Database a New Member of Federalized Two-dimensional Electrophoresis Databases: A Simple Means of Publishing Two-dimensional Electrophoresis Data**

Proteome analysis is a relatively new technology providing information about the quantitative changes in protein expression under precisely defined conditions. This procedure should complete data obtained by DNA sequencing and should offer new objectives for biological and medical studies. Likewise DNA sequencing, proteome study is a high throughput technology producing huge amounts of data that need to be exchanged. For this purpose, large networked databases of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis are constructed. This paper describes the formation of the first Czech database of this kind which can be used by the Czech scientific community for publishing the results of proteome studies.

## RECENZE

J. Mleziva, J. Šňupárek:

### **Polymery – struktura, vlastnosti a použití**

Sobotáles, Praha 2000. Stran 537, tabulek 107, obrázků 64, ISBN 80-85920-72-7.

Kniha je druhým, přepracovaným vydáním osvědčené monografie prof. Ing. Dr. Josefa Mlezivy, DrSc., který již, žel, není mezi námi. Prvé vydání (z roku 1993) aktualizoval neméně známý odborník prof. Ing. Jaromír Šňupárek, DrSc., který se také po prof. Mlezivovi stal vedoucím Ústavu polymerních materiálů na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

V přepracovaném vydání se prof. Šňupárkovi podařilo to, co málokterému autorovi, totiž rozšířit informační hodnotu díla při prakticky zachovaném stránkovém rozsahu (1. vydání čítalo 525 stran). Podařilo se mu také aktualizovat monografii při zachování její původní osnovy, rozčleněné do 25 kapitol.

Po stručném, ale výstižném úvodu, koncipovaném jako první kapitola, následuje tolik potřebný, byť často opomíjený seznam symbolů a stejně důležitý seznam zkratk významných polymerů. Následujících 21 kapitol představuje encyklopedické pojednání o polyolefinech, polydienech, styrenových plastech (s ne zcela správným původním označením „Polystyrenové plasty“), polyhalogenolefinech, polyvinylesterech a odvozených polymerech, polyvinyletherech (asi by bylo šťastnější odklonit se nepatrně od původního členění a věnovat jednu kapitolu vinylovým polymerům a další fluoroplastům a fluoroelastomerům), polymerech kyseliny akrylové a methakrylové a jejich derivátech, polyetherech (možná, že při přepracování díla by bylo bývalo vhodnější zahrnout do této kapitoly i malou, pouze dvoustránkovou kapitolku o polyvinyletherech, zvláště když vinylové polymery nejsou uvedeny v samostatné kapitole), polyacetalech (kde je ovšem uveden pouze polyoxymethylen, což je ale vlastně polyether), polyesterech, polyamidech, polyimidech a polyimidazolech, polysulfidech a polysulfonech, fenoplastech, aminoplastech, furanových pryskyřicích, silikonech, epoxidových pryskyřicích, polyurethanech, celulóze a jejich derivátech, měničích iontů (těm by však asi lépe slušelo zařazení do kapitoly 24, nazvané „Přehled zpracování a použití polymerů“, kterou vtipně předchází kapitola věnovaná struktuře a vlastnostem polymerů).

Velmi oceňuji kapitolu 25. obsahující rozsáhlé srovnávací tabulky významných vlastností polymerů, včetně vlastností tepelných, a seznam použité všeobecné a doporučené literatury, čítající 20 pramenů monografického charakteru a citující rovněž materiály Evropské hospodářské komise OSN a Statistickou ročenku ČR. Seznamy speciálních citovaných literárních pramenů jsou uváděny vždy hned za příslušnou kapitolou, což při celkem 578 citacích usnadní čtenáři orientaci.

Neméně oceňuji podkapitolu 24.7. o recyklaci polymerů, která v prvním vydání vůbec nebyla obsažena. Za námět k zamyšlení považuji klasifikaci recyklace na primární (zpracování čistého, nekontaminovaného odpadu jediného typu polymeru), sekundární (zpracování směsného polymerního odpadu), terciární (tj. „chemickou“ a „termickou“, která je ovšem vlastně také chemickou) a kvarterní (spalování odpadu).

Publikace, kterou v jejím závěru doplňuje pečlivě zpracovaný devítistránkový věcný rejstřík, může posloužit jak pracovníkům všech průmyslových a dalších odvětví spojených s výrobou, zpracováním a používáním polymerů, tak studentům středních a vysokých škol, zejména v oborech zabývajících se chemií, technologií a aplikacemi polymerů, ale i zvidavé laické veřejnosti včetně frekventantů a absolventů kursů celoživotního vzdělávání a univerzit třetího věku. Všem ji vřele doporučuji.

Vratislav Ducháček

H. Čtrnáctová, J. Halbych,  
J. Hudeček, J. Šímová:

### **Chemické pokusy pro školu a zájmovou činnost**

Prospektrum, Praha 2000. Stran 295, 100 obrázků, 18 tabulek, ISBN 80-7175-057-3.

Tato encyklopedie chemických pokusů patří bezesporu k nejužitečnějším publikacím pro učitele chemie za několik minulých desetiletí. Je výborně využitelná nejen na základní a střední škole, ale i na všech fakultách připravujících učitele. Budou z ní určitě čerpat i žáci a studenti přírodovědných kroužků různých zájmových sdružení. V textu je zařazeno 365 pokusů k 240 tématům. Každý experiment obsahuje vedle obvyklého, jako jsou pomůcky, chemikálie a postup práce, i princip a poznámky včetně chemických rovnic a výpočtů. Součástí návodů jsou i piktogramy znázorňující čas, potřebný pro provedení pokusu, organizační zařazení pokusu ve výuce, použití digestoře a práce s nebezpečnými chemikáliemi. Všechny učitele bude určitě také zajímat velmi diskutovaný zákon o chemických látkách a přípravcích v aplikaci na školní praxi, kterému je zde věnována celá kapitola. Praktickým výstupem je označení chemikálií, vedle obrázků, ještě písmenným symbolem. V první kapitole je vybavení a práce ve školní chemické laboratoři s popisem základního skla a pomůcek, skladování a používání chemikálií, jedů a škodlivých látek. Přehledně jsou uvedeny zásady bezpečné práce v chemické laboratoři, první pomoc a základní práce spolu s nákresem aparatur. V dalších kapitolách jsou popsány známé i méně známé pokusy z chemie obecné, anorganické, organické a biochemie. Didakticky cenné jsou kvalitativní a kvantitativní varianty pokusů. V závěru knihy je přehled přípravy činidel a indikátorů, přehled nebezpečných chemikálií včetně jejich označení pomocí rizikových vět a bezpečnostních pokynů a přehled standardních R a S vět, včetně jejich kombinace. Dále jsou uvedeny některé chemické výpočty potřebné pro experimenty a tabulky vlastností prvků a sloučenin. Orientaci v příručce usnadňuje seznam pokusů, obrázků a tabulek. Bez nadsázky je možno konstatovat, že publikace obsahuje maximum toho co lze napsat ke dni vydání o školních chemických pokusech v tradičním provedení. Dá se očekávat, že toto dílo výrazně podpoří zájem o experimentální činnost ve výuce chemie.

Petr Koloros

W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby,  
R. E. Moore (Eds.):

**Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Vol. 80**  
Springer Verlag, Wien 2000. Stran 251; cena 280,- DEM.  
ISBN 3-211-83428-1

Stalo se pravidlem, že publikace, vycházející v této edici založené L. Zechmeisterem, jsou zárukou kvality; stejně je tomu i v 80. svazku zahrnujícím dvě přehledné práce.

Studie *Naturally Occurring Isothiocyanato/Isothiocyanato and Related Compounds* (C. W. J. Chang) podává přehled o výzkumu uvedených látek od doby první přehledné práce na toto téma, publikované v roce 1988. Od konce 80. let se v oblasti výzkumu isokyan/isothiokyanato sloučenin nahromadila řada nových poznatků, které autor detailně a velmi přehledně roztrídil. Některé kapitoly (zejména úvodní) zpracoval velmi koncizně; např. v kapitole o izolaci a identifikaci se jen stručně věnuje sdělení o vlivu kyselin a nukleofilů na tyto látky a jejich reaktivitu při izolaci. Protože se nejedná o běžné sloučeniny, řada zájemců by jistě pro svoji práci uvítala konkrétní příklady. Pěkně a poučně je zpracována úvodní kapitola se zmínkou o isothiokyanátech čeledi *Brassicaceae* a navazujících strukturách s uvedením přehledů, které se k těmto látkám vztahují (a které jsou zajímavé z hlediska prevence zhoubných novotvarů).

Klasifikace jednotlivých skupin sloučenin se pohybuje ve dvou liniích – autor dělí látky na dvě skupiny: z organismů mořských a terestrických. V případě sinic popisuje monoterpenické indolové alkaloidy, (resp. C<sub>21</sub> sloučeniny, oxindoly a modifikované kyslíkaté C<sub>21</sub> indoly, C<sub>26</sub> indolové alkaloidy) a reaktivitu a syntetické reakce hapalindolů pařících do C<sub>21</sub> sloučenin. Z oblasti mořských hub se zabývá diterpeny (acyklickými sloučeninami, kalihinany, amfilektany), seskviterpeny (8 strukturálních typů) a poměrně neobvyklými látkami mořských organismů (dichloridy terpenických karbonimidů, isothiokyanato/thiokyanato-norterpenoidy a nitrily mořských hub). Sloučeniny izolované z terestrických zdrojů nejsou tak četné jako látky předchozích typů; v této kapitole jsou enumerovány isonitrily „nižších organismů“. Protože se jedná hlavně o produkty mikromycet rodů *Aspergillus* a *Penicillium*, je takové označení poměrně kuriózní: ve fylogenetickém kmeni organismů to nebývá obvyklé. Poněvadž však jde o různé taxony, lze autorovo označení chápat jako zastřešující zástupný výraz. Zvláštní kapitola je věnována biogenezi a biosyntetickým cestám všech tříd látek, o kterých je v práci pojednáno. Práce je zakončena diskusí a doplňkem nově izolovaných sloučenin.

Čtenáři se dostává do rukou excelentní studie, psaná velmi střízlivým, nekomplikovaným jazykem, svědčícím o rozsáhlé znalosti tématu. Styl jazyka je někdy příliš úsečný, což je pochopitelné – autorovou ambicí bylo zpracovat velké množství materiálu srozumitelnou a logickou formou, které podřídil styl. Grafická stránka tohoto přehledu je skvěle provedena.

Jedná se o klíčovou publikaci na toto téma v současné době. Přináší zajímavé poznatky o látkách ne zcela obvyklých, a to i z hlediska praktického: konec každé kapitoly, popisující jednotlivé typy látek, je často věnován biologické aktivitě (především cytotoxické a antifungální), což může mít význam pro pracovníky v oblasti farmaceutického výzkumu, mikrobiologické biotechnologie a toxikologie.

Druhá studie *Sulfur-Containing Amides from Glycosmis Species (Rutaceae)* (O. Hofer, H. Greger) se zabývá studiem obsahových látek druhů systematicky jasně definovaného neevropského rostlinného rodu *Glycosmis* z čeledi routovitých. Po úvodu zahrnujícím velestučnou deskriptivní morfologii rostlinných částí a stručné obecné chemotaxonomické aspekty čeledi *Rutaceae*, popisují autoři metody izolace a řešení struktury amidů substituované propenové kyseliny (methylthio-, methylsulfinyl- a methylsulfonylpropenové) a kyseliny uhlíčné (methylthiouhlíčné). Tato kapitola obsahuje konkrétní údaje, které umožňují čtenáři udělat si základní přehled o chování látek při izolaci a při spektroskopickém hodnocení. Stručně je pojednáno o biosyntéze amidů, v širším měřítku se autoři věnují popisu totálních syntéz těchto látek. Výpis jednotlivých strukturálních typů je nutný pro orientaci v kapitole o biologické aktivitě (vycházející z projektu screeningu biologicky aktivních přírodních látek z čeledi *Rutaceae* ze Srí Lanky). U řady těchto relativně lipofilních látek byla zjištěna fungitoxičita, některé jsou toxické vůči hmyzu (*Spodoptera littoralis*). Škoda, že nejsou k dispozici údaje o toxicitě na obratlovcích, které by poskytly obraz o možném osudu těchto látek z hlediska jejich dalšího studia biologické aktivity. Významným přínosem přehledu je diskusní kapitola o chemotaxonomických aspektech substituovaných propenových kyselin v rodu *Glycosmis*. Je dalším příspěvkem nejen pro úvahu o existenci chemotypů některých taxonů tohoto rodu, ale také např. pro hodnocení vývojových vztahů určitých rodů ze skupiny *Clauseneae*. V doplňku přináší práce zmínku o sirných bisamidech některých taxonů z rodu *Aglaia* (Meliaceae); autoři se tímto typem látek zabývají a oprávněně pokládali za vhodné je v přehledu uvést.

Při čtení této práce působí příznivě kromě jiného její konkrétnost a jasnost. Může se zdát, že samotné téma je poměrně izolované a úzké; práce není svým rozsahem velká (31 stran), přikládám jí však velký význam. Je totiž dalším souhrnným příspěvkem k poznání biosyntézy a metabolismu *de facto* kyseliny propionové: metabolické produkty některých mikromycet a cévnatých rostlin obsahující tuto látku substituovanou, jsou přítomny v taxonomicky uzavřených jednotkách (např. estery kyseliny 3-nitropropionové v rodu *Coronilla*, *Lotus*, látky vycházející z 3-nitropropanolu v *Asragalus* aj.). Jejich poznání má význam nejenom vědecký, ale také velmi praktický z hlediska toxikologie obratlovců a živočišné produkce.

Lubomír Opletal

## OBSAH

|  |     |
|--|-----|
| ÚVODNÍK  | 341 |
| REFERÁTY   |     |
| Kvantifikace chiralit<br>J. Jonas  | 342 |
| Současné uplatnění (chrono)potenciometrické<br>rozpouštěcí analýzy<br>J. Konvalina a K. Vytřas   | 344 |
| Substituce v polohách 2 a 2' C <sub>2</sub> -symetrických<br>1,1'-binaftylových derivátů – substituční reakce<br>aromatických zlúčenin so stereochemickým<br>aspektem<br>M. Putala | 353 |
| Fotoafinitní značení – metoda studia proteinů<br>B. Kubíčková a P. Hodek   | 359 |
| LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY  |     |
| Využití mikrovlnné techniky při odštěpování<br>acidolabilních skupin v chemii peptidů<br>J. Šebestík, J. Hlaváček a I. Stibor  | 365 |
| Potřebujeme pseudosložky?<br>E. Eckert   | 368 |
| Návrh pecky pro termické analýzy na velmi<br>vysoké teploty<br>P. Horbaj   | 374 |
| Databáze PMMA-2DPAGE – Nový člen rodiny<br>federalizovaných databází dvourozměrné gelové<br>elektroforézy<br>J. Knížek, J. Stulík, L. Hrdličková, I. Komárková<br>a A. Macela      | 378 |
| RECENZE  | 382 |

## CONTENTS

|   |     |
|---|-----|
| EDITORIAL   | 341 |
| REVIEW ARTICLES   |     |
| Quantification of Chirality<br>J. Jonas   | 342 |
| The Present Use of (Chrono)potentiometric<br>Stripping Analysis<br>J. Konvalina and K. Vytřas   | 344 |
| Substitutions in Positions 2 and 2'<br>of C <sub>2</sub> -Symmetric Binaphthyl Derivatives.<br>Substitution Reactions of Aromatic Compounds<br>with Stereochemical Aspects<br>M. Putala   | 353 |
| Photoaffinity Labelling – A Method of Protein Study<br>B. Kubíčková and P. Hodek  | 359 |
| LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS  |     |
| Utilization of Microwave Technique for Cleavage<br>of Acid-Labile Groups in Peptide Chemistry<br>J. Šebestík, J. Hlaváček, and I. Stibor  | 365 |
| Do We Need Pseudocomponents?<br>E. Eckert   | 368 |
| Design of a Laboratory Furnace for Thermal<br>Analysis at Very High Temperatures<br>P. Horbaj   | 374 |
| The PMMA-2DPAGE Database a New Member<br>of Federated Two-dimensional Electrophoresis<br>Databases: A Simple Means of Publishing<br>Two-dimensional Electrophoresis Data<br>J. Knížek, J. Stulík, L. Hrdličková, I. Komárková,<br>and A. Macela | 378 |
| BOOK REVIEWS  | 382 |

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 95 (2001), čís./no. 6 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 125, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 111 • ČASOPIS ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ • Bulletin roč./vol. 32 • Vydává Česká společnost chemická ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, s Českou společností průmyslové chemie a Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt LP 0001), Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORI/EDITORS: J. Berek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Gut, J. Hetflejš, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke, M. Bláhová (Bulletin), M. Ferles (Bulletin), B. Valter (Bulletin), I. Valterová (Bulletin), R. Liboska (webové stránky), P. Zámstný (webové stránky) • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), J. Soušek (Olomouc), J. Šibor (Brno) • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: C. Jirátořová • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, M. Drdák, J. Hanika, J. Churáček, Č. Jech, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ, INZERCI, INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY A PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420(2) 2108 2370, fax +420(2) 2222 0184, e-mail: jiratova@csvts.cz, IČO 444715 • SOUHRNÝ NA INTERNETU/PREPUBLISHED ABSTRACTS ON URL: [http://staff.vscht.cz/chem\\_listy/index.html](http://staff.vscht.cz/chem_listy/index.html) • TISK: PORS 052, Školní náměstí 11, 537 33 Chrudim; SAZBA: SF SOFT, Jinonická 329, 158 00 Praha 5 • Copyright © 2001 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 100 Kč, roční předplatné 2001 (12 čísel) 1034 Kč. Předplatné ve Slovenské republice 2310 Kč. Pro členy ČSCH je sleva 50 %, pro studenty 70 % • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2001 (12 issues) DEM 440 • Podávání novinových zásilek povoleno ČP s.p. OZ VČ, č.j. PP/I 5333/95 • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use. • Pokyny pro autory najdete v čísle 7/97 na straně 492, nebo budou zaslány na požádání, zkratky odb. časopisů viz 10/97 str. 911 • Instructions for authors will be sent on request. • Chemické listy obsahující Bulletin jsou 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. SAZBA BULLETINU: B. Valter, SEKRETARIÁT ČSCH: Novotného lávka 5, tel., fax +420(2) 2222 0184, e-mail: mblahova@csvts.cz