

Biotechnology is the integration of natural sciences and engineering sciences in order to achieve the application of organisms, cells, parts thereof and molecular analogues for products and services (Definice schválená na valném shromáždění EFB, 1989)

Chemici a biotechnologie

Chemici byly vždy spojeni s tzv. tradičními biotechnologiemi, zejména fermentačními procesy a různými biotransformacemi, takže kromě biochemiků, to byli především chemičtí inženýři, kteří aktivně vstoupili do éry moderních biotechnologií a zasloužili se o praktickou realizaci úspěšné tovární produkce řady významných biologicky aktivních látek vyvinutých technikami genového inženýrství. Vznik moderních biotechnologií byl umožněn důslednou aplikací molekulárních principů při studiu biologických procesů a tedy vlastně absolutním prosazením chemického pohledu ve výzkumu v hraničních disciplínách jako je mikrobiologie, biologie, genetika, farmacie aj. Velké množství poznatků nahromaděných v posledních desetiletích vytvořilo předpoklady pro jejich praktické využití, ale zároveň přineslo i nebývalé množství překážek, které musí být před realizací každé nové technologie překonány. Na zavedení nových technologií je třeba čím dál tím víc volných finančních prostředků, a proto jsou v tomto zápase o trhy zvýhodněny velké firmy. V biotechnologiích však nejde jen o produkty genového inženýrství (zejména farmaceutika a nyní tolik diskutované geneticky modifikované organismy, všeobecně používaná zkratka GMO), ale o ohromnou plejádu dalších produktů a aplikací. Určitou představu o aplikačním rozsahu biotechnologií dává v záhlaví uvedená definice Evropské federace biotechnologií (EFB), i když i tato definice není zřejmě zcela vyčerpávající. Např. se nezmiňuje o uplatnění chemických materiálů v biotechnologiích, což je pro chemika problém velice důležitý a závažný.

Dnešní úvodník jsem však začal psát proto, abych členy naší společnosti stručně seznámil s postoji naší střešní organizace IUPAC k biotechnologiím. O významu biotechnologií pro chemický průmysl a jeho další rozvoj není pochyb. Ostatně stále se zvyšující zisky, zejména některých amerických společností, z biotechnologických produktů jsou toho nezvratným důkazem. IUPAC vidí v biotechnologiích příležitost (challenge) pro chemii, ale představa jak rozvoj biotechnologií stimulovat se v posledních letech několikrát změnila, tak jak docházelo ke změnám v názorech na novou organizační strukturu jednotlivých orgánů IUPAC.

Komise pro biotechnologie byla původně součástí Divize aplikované chemie.

Při reorganizaci divizí na valném shromáždění IUPAC v Guilfordu (UK) v r. 1995 byla Komise pro biotechnologie (COB) podřízena přímo byru, a bylo uvažováno několik alternativ od vytvoření samostatné divize pro biotechnologie až pro přiřazení COB k některé z nově vytvořených divizí. Na základě loňského jednání berlínského valného shromáždění IUPAC se v letošní „modré knize“ (IUPAC Handbook 2000–2001) objevila COB jako součást Divize III – Organická a biomolekulární chemie pod evidenčním číslem III. 4 (str. 37).

Jednou z významných a trvalých činností COB IUPAC je pořádání biotechnologických sympozií ve čtyřletých intervalech, a to programově v různých kontinentech světa. Poslední sympozium se konalo v australském Sydney (1996). V letošním roce, tj. 3.–8.9.2000 se pořádá již 11th International Biotech-

nology Symposium v Berlíně (podrobnosti lze získat na internetové adrese <http://dechema.de/biotechnology2000.htm>).

Na sympozium jste všichni srdečně zváni. Jsme si však vědomi toho, že poměrně vysoké vložné nasazené německými organizátory bude překážkou účasti mnoha potenciálních zájemců.

Sympozium se za čtyři roky uskuteční na jihoamerickém kontinentě v Santiagu de Chile. (Pro úplnost připomínám, že biotechnologická sympozia Federace evropských biotechnologií se konají ve dvouletých intervalech a nekryjí se s akcemi IUPAC.)

V minulých letech se COB věnovala řadě projektů, jejichž výsledkem byla publikace přehledných článků v oficiálním časopise IUPAC „Pure and Applied Chemistry“. Cílem bylo seznamovat chemickou veřejnost s aktuálními tématy biotechnologií. V tomto duchu se nesly i další publikační aktivity (např. slovník biotechnologických termínů – „Biotechnology Glossary“) a pravidelná přednášková odpoledne konaná v době valných shromáždění IUPAC (každé dva roky). COB pravidelně spolupracuje s jinými orgány IUPAC zejména v oblasti tvorby názvosloví.

V současné době se COB snaží o vytvoření informačního systému o biotechnologiích, resp. alespoň o kompletaci internetových adres v různých zemích světa. Není to záležitost jednoduchá, protože počet členů COB je velice omezený.

Pokud se týká naší republiky, můžeme zájemcům o biotechnologie doporučit tři internetové adresy, a to:

Biotechnology navigator: <http://staff.vscht.cz/bio/bionavig.html> (Prosíme o pomoc, při zařazení dalších adres podniků a společností podnikajících v oblasti biotechnologií. Tato databáze bude součástí databáze IUPAC.)

Czech Biopages připravené kolegy z Masarykovy univerzity v Brně: <http://orion.chemi.muni.cz/index.htm>

Biotrin v společnosti Biotrend, institucionálního člena Biotechnologické společnosti: <http://www.biotrin.cz>

Komise pro biotechnologie IUPAC pracuje v současné době ve složení:

Titulární členové: prof. Milton T.W. Hearn (Austrálie) – předseda, Dr. Michelle Browner (USA) – místopředseda, prof. Jan Káš (ČR) – sekretář, Dr. Mark Dibner (USA), Dr. Takashi Nara (Japonsko), prof. Rolf Schmid (Německo) a prof. Daniel Thoma (Francie) – členové.

Národní delegáti: prof. Alois Jungbauer (Rakousko), prof. Murray Moo-Young (Kanada), prof. Inger Mollerup (Dánsko), prof. Bela Sevela (Maďarsko), prof. C.M. Gupta (Indie), prof. Terence G. Watson (Jižní Afrika) a prof. Patrik Adlercreutz (Švédsko).

Náměty pro činnost COB a spolupráci se členy a pracovními skupinami českých chemických společností je velmi vítána, zejména při kompletaci podniků a společností pracujících v oboru biotechnologií.

Těšíme se na spolupráci.

Jan Káš

SENZORY S TUHÝMI POLYMERY PRO MĚŘENÍ VLHKOSTI PLYNŮ

PETRA HRNČÍŘOVÁ a FRANTIŠEK OPEKAR

UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 43 Praha 2

Došlo dne 11.XI.1999

Klíčová slova: relativní vlhkost, senzory, tuhé polymery

Úvod

Voda je prakticky všudypřítomná, je jedním z nejběžnějších analytů a pro její stanovení existuje řada klasických i instrumentálních metod¹⁻³. Specifický analytický přístup vyžaduje stanovování obsahu vody, vlhkosti, v plynném prostředí. Vlhkost plynu, tj. množství vodní páry, kterou plyn obsahuje, lze vyjádřit absolutně hmotností vody v určitém objemu plynu, $\Phi = m/V$ (např. v $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$), bezrozměrnou měrnou vlhkostí, $\phi = m/m_g$, kde m je hmotnost vody v určitém objemu plynu a m_g je hmotnost téhož objemu plynu suchého, případně parciálním tlakem vodní páry či teplotou rosného bodu. V praxi je obsah vody v plynu velice často vyjadřován relativně jako tzv. relativní vlhkost, RH . Relativní vlhkost se rovná podílu absolutní vlhkosti daného plynu a absolutní vlhkosti tohoto plynu, který je za stejné teploty a tlaku vodní parou nasycen, tj. $RH = \Phi/\Phi_{\text{max}}$; relativní vlhkost je veličinou bezrozměrnou a zpravidla se udává v procentech.

Podobně, jako tomu je i v případě jiných chemických látek, významným nástrojem pro detekci a stanovení vody se stávají senzory⁴⁻⁶. Důvodů pro to je několik:

- senzor může v řadě případů nahradit drahý přístroj a složitý experimentální postup při provádění analýzy,
- potřeba měřit vlhkost prudce roste s rozvojem řady průmyslových odvětví, kde jsou využívány náročné specializované technologie,
- automatizované a tzv. inteligentní pracovní nástroje mají značné nároky na množství informací o stavu a vlastnostech pracovního prostředí v němž vykonávají určitou činnost a tyto nároky je nutno uspokojit množstvím senzorů, jimiž jsou na své pracovní prostředí napojeny,
- v neposlední řadě je měření vlhkosti důležité i při zajišťování lidského komfortu klimatizováním pracovního, společenského i domácího prostředí.

Z přehledu v tabulce I je zřejmé, že oblast použití senzorů vlhkosti je velice široká a tudíž jsou na ně kladeny nejrozmanitější nároky. Obecně, bez ohledu na oblast použití, by měly moderní senzory vlhkosti splňovat několik základních požadavků:

- dostatečnou citlivost v širokém intervalu vlhkostí,
- rychlou odezvu,
- reprodukovatelnost odezvy a malou hysterezi,
- nezávislost na teplotě,

- nezávislost odezvy na složení plynu,
- mechanickou odolnost a dlouhou životnost,
- kompatibilitu se současnou mikroelektronikou,
- jednoduchou konstrukci a odtud i malou pořizovací hodnotu.

Ve snaze vyhovět pokud možno většině těchto požadavků jsou vyvíjeny a testovány senzory vlhkosti různého mechanického uspořádání, které využívají k detekci vlhkosti různých principů. K dispozici jsou senzory využívající klasické principy měření vlhkosti, tj. senzory založené na měření rosného bodu, dilataci přírodních nebo umělých vláken či psychrometry. Z důvodů kompatibility s moderní elektronikou jsou oblíbené senzory založené na měření změn elektrických vlastností (permitivita, odpor) různých materiálů majících určitou afinitu k vodě. Zde, vedle anorganických látek (Al_2O_3 , TiO_2 - V_2O_5 , SiO_2 -oxid kovu, MgCr_2O_4 - TiO_2 a mnoho dalších), které bývaly v nedávné době dominantními materiály pro konstrukce senzorů vlhkosti, nacházejí velké uplatnění právě polymerní materiály⁷. Tyto materiály jsou též významným konstrukčním prvkem ampérometrických či potenciometrických tuhých senzorů různých plynů^{8,9}. Zatímco v těchto senzorech je změna vlastností polymeru způsobená změnou vlhkosti analyzovaného plynu nežádoucí, v senzorech vlhkosti je s výhodou využívána (viz pořekadlo „šum pro jednoho je využitelným signálem pro druhého“). Tento článek je věnován využití různých polymerů právě v senzorech vlhkosti. Je dal-

Tabulka I
Příklady aplikačních oblastí senzorů na měření vlhkosti plynů

Odvětví	Oblast použití
Průmysl a energetika	klimatizace výrobních a skladových hal technologické plyny sušicí a zvlhčovací zařízení chladicí zařízení ochranné plyny při sváření kovů vysokonapěťové spínače
Zemědělství	skleníky hydroponické pěstování rostlin haly živočišné výroby sila na obilí, seníky
Medicína	sterilizátory inkubátory respirátory
Výzkum	boxy s řízenou atmosférou biokultivátory testování senzorů plyných látek
Lidské společenství	meteorologie uchovávání uměleckých předmětů zhotovování fotografií
Domácnost	klimatizační jednotky mikrovlnné trouby sušičky prádla

Tabulka II
Příklady polymerů testovaných v impedančních senzorech pro stanovení relativní vlhkosti

Typ polymeru ^a	Poznámky	Cit.
Nafion	<i>RH</i> 0–100 %; kompozit (1:3) vykazoval delší lineární dynamický rozsah, ale nižší citlivost detekce než samotný Nafion.	17
Kompozit Nafion/SiO ₂	<i>RH</i> 0–100 %; počet OH– skupin na strukturní jednotku různě modifikovaného	14
Poly(vinylalkohol) (PVA)	PVA či kopolymeru polyethylen-PVA a typ protiiontu (H ⁺ , Li ⁺ a Na ⁺) v Nafionu a ionizace modifikovaného Si-ftalocyaninu ovlivňují vlastnosti senzoru. Nejlepší odezvu poskytoval Li-Nafion.	
Nafion Si-ftalocyanin	testovány různé způsoby kopolymerace hydrofilního kvarternizovaného PVP s hydrofobním polymerem (prokřížením či roubováním). Nejlepších výsledků dosaženo se senzorem obsahujícím PVP naroubovaný na PTFE nebo prokřížený s dibrombutanem; viz též ^{11,16,64} .	12
Poly(vinylpyridin) (PVP)	vzájemně se prostupující polymerní síť hydrofilního (HMPTAC) a hydrofobního (EGDMA) polymeru je stabilní, změna impedance je asi pět řádů při změně <i>RH</i> od 0 do 90 %. Týž hydrofilní polymer naroubovaný na polyethylen byl testován ⁶⁵ .	66
HMPTAC prokřížený s EGDMA	polymer použit v čtyřelektrodevém planárním senzoru, nelineární závislost na <i>RH</i> v oblasti 12–80 %. Výrazná závislost na <i>RH</i> byla pozorována u kompozitu tohoto polymeru se syntetickým silikátem ⁶⁷ Laponite RD.	68
DMDAAC	lineární závislost na <i>RH</i> (25–98 %) dána acidobazickými změnami v kompozitu, viz též ^{69,70} . Obdobné chování bylo pozorováno u kompozitů PVA s poly(aminofenolem) ⁷¹ a poly(anilinem) ⁷² .	73
Kompozit poly-(<i>o</i> -fenylendiamin) + PVA	iontová vodivost polymeru dopovaného kyselinou sírovou exponenciálně roste s <i>RH</i> . Závislost vodivosti polymeru obsahujícího vodu (60 %) na <i>RH</i> byla studována v cit. ⁷⁴	75
Poly(propargylalkohol)	impedance filmu PVA klesala s růstem <i>RH</i> . Přídavek sodných solí kyselin chlorovodíkové, <i>p</i> -styrensulfonové či <i>m</i> -benzendisulfonové výrazně přispěl k citlivosti senzoru (změna vodivosti o čtyři řády v oboru <i>RH</i> 15–95 %). Prokřížení polymeru působením argonové plazmy mělo příznivý vliv na stabilitu filmu.	76
Poly(vinylalkohol)	polymer naroubovaný na mikroporézní film poly(ethylenu).	77
AMPS	film organopolysiloxanů obsahujících hydrofilní skupiny typu –NH ₂ , –N(CH ₃) ₃ Cl, a –SO ₃ H naroubované na silikagelu nebo sintrovaném oxidu hlinitém.	78
Organopolysiloxany	film poly(hexanviologen) ⁺ PF ₆ ⁻ je výhodný k detekci nižších hodnot <i>RH</i> (0–35 %). Interferují páry nižších alkoholů a organofosfáty.	79
Viologen	odolnost polymeru pro senzory použitelné v prostředích o vyšší <i>RH</i> (odolávající případně i krátkodobému kontaktu s vodou) bylo dosaženo současným prokřížením a kvarternizací při reakci s TMHDA.	80
Poly(chlormethylstyren)		

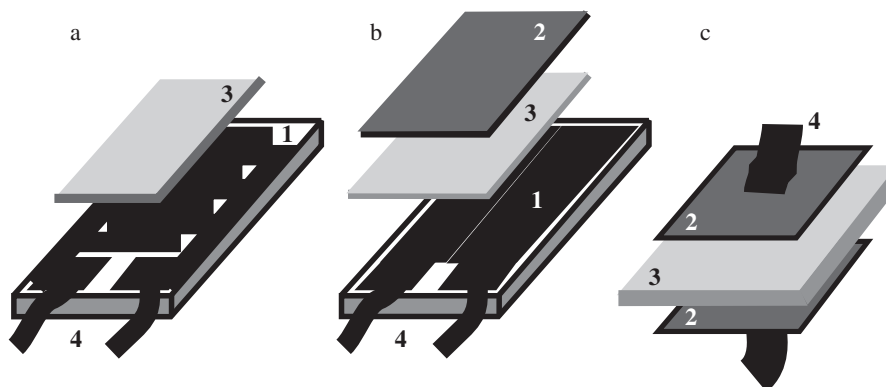
^a HMPTAC – poly(2-hydroxy-3-methakryloxypropyltrimethylammoniumchlorid); EGDMA – poly(ethylenglykoldimethakrylát); DMDAAC – poly(dimethyldiallylammoniumchlorid); AMPS – poly(2-acrylamido-2-methylpropanosulfonát); TMHDA – N,N,N',N' - tetramethyl-1,6-hexandiamin

ším pokračováním volné série referátů věnovaných chemickým senzorem publikovaných v tomto časopise^{8,10}.

Polymery používané pro konstrukce senzorů vlhkosti

V senzorech vlhkosti jsou používány polymery, které mohou v důsledku absorpčních či adsorpčních procesů vyměňovat se svým okolím vodu. Změna obsahu vody v polymeru se může projevit různými změnami jeho vlastností, které lze pro stanovení *RH* využít. Jsou to hlavně již zmíněné vlastnosti elektrické, ale i vlastnosti optické, mechanické či změna hmotnosti.

Bez ohledu na to, v jakém typu senzoru je polymer použit, musí mít dvě důležité vlastnosti – musí být ve vodě nerozpustný (při zachování svých hydrofilních vlastností) a chemicky stálý. Příprava nových polymerů pro senzory *RH* je do značné míry orientována na vylepšování těchto vlastností. Ve vodě nerozpustných a stabilních struktur se dosahuje zpravidla prokřížením řetězců polymeru kopolymerací vhodných monomerů (postup běžný při výrobě klasických iontoměníčů) nebo naroubováním (graft – polymerization) hydrofilních skupin na chemicky stabilní, hydrofobní polymerní kostru. Obě tyto metody umožňují strukturu polymeru modifikovat tak, aby jeho výsledné chování bylo optimální pro použití v konkrétní situaci^{11,12}.



Obr. 1. Příklady nejčastějších konstrukčních uspořádání *RH* senzorů založených na měření impedance (a), kapacity (b) a uspořádání použitelné v obou případech (c); 1 – inertní podložka s vodivostními elektrodami, 2 – mikroporózní kovová elektroda, 3 – polymer, 4 – přírodní vodiče

Z výše uvedených důvodů jsou v senzorech *RH* často využívány polymery měnící se změnou *RH* své elektrické vlastnosti – relativní permitivitu nebo iontovou, případně elektronovou vodivost. Podle toho, která z těchto vlastností je měřena a vyhodnocována jako míra vlhkosti analyzovaného plynu, jsou senzory rozdělovány na impedanční (odporové) nebo kapacitní⁷. Velice intenzivně jsou však vyvíjeny i senzory pracující na principu změn hmotnosti polymeru či jeho změn rozměrových. Významné jsou senzory optické využívající jako zdroje záření světloemittující diody (LED) nebo laserové diody (LD), optická vlákna jako vodiče záření a polovodičové detektory samostatně případně v souborech (detektorová pole). Jde o tzv. solid-state instrumentaci, kterou lze charakterizovat chemickou odolností, odolností proti interferencím externích elektrických polí (na rozdíl od senzorů snímajících změny elektrických veličin), malými rozměry a nízkou cenou. Svými vlastnostmi a technologií přípravy jsou použitelné jako detekční systémy integrovaných a inteligentních senzorů.

Impedanční (odporové) senzory

V těchto senzorech se využívá polymerů, které obsahují s polymerní kostrou pevně vázané hydrofilní ionty, jejichž náboj je kompenzován protionty. Při vzrůstu *RH* analyzovaného prostředí tyto hydrofilní skupiny absorbují vodu do svých hydratačních obalů, při poklesu *RH* ji uvolňují. Podle obsahu vody v polymeru se protionty uvolňují disociací, např.: $R-SO_3^- H^+ + H_2O \rightleftharpoons R-SO_3^- + H_3O^+$, takže iontová vodivost polymeru závisí na *RH* analyzovaného prostředí. Typickým polymerem majícím tyto vlastnosti je Nafion (obchodní název firmy DuPont, USA, pro kopolymer poly(tetrafluoroethylenu) s poly(sulfonylfluorvinyletherem))¹³. Jde o katex s pevně vázanými sulfoskupinami, protionty bývají zpravidla vodíkové ionty; v senzorech vlhkosti byl zkoušen i Nafion obsahující lithné či sodné protionty¹⁴. Podobné polymerní struktury byly též připraveny roubováním např. sulfonovaného polystyrenu na poly(tetrafluoroethylen)^{11,15}. Fluorované polymery jsou obecně chemicky stálé, a protože fluor má menší iontový poloměr než vodík, mají kompaktnější strukturu a jsou tak odolnější vůči rozměrovým změnám (botnání) při změně obsahu vody. Z toho vyplývá vyšší stabilita polymeru a delší

doba života senzoru. Příklady dalších polymerů testovaných pro použití v impedančních senzorech vlhkosti jsou v tabulce II.

Základním uspořádáním impedančního *RH* senzoru je tzv. planární uspořádání (obr. 1a). Na inertním substrátu (keramika, sklo) je vakuovým napařením či sítotiskem vytvořena dvojice platinových nebo zlatých vodivostních elektrod, zpravidla hřebínkového tvaru (interdigital electrodes), které jsou překryty filmem polymeru. Film je obvykle připravován pokrytím elektrod roztokem polymeru ve vhodném rozpouštědle za rotace (spin coated), po jehož odpaření se na elektrodách vytvoří film polymeru požadované tloušťky. Tloušťka filmu má zásadní vliv na rychlost odezvy senzoru; čím je film tenčí, tím rychleji se při změně *RH* ustaví rovnováha mezi obsahem vody v analyzovaném plynu a v polymeru. Tloušťky filmů jsou řádu desetin až stovek μm .

V některých konstrukcích byla použita membrána z hydrofobního polymeru (např. z poly(tetrafluoroethylenu) či polyethylenu) na němž byla naroubována vrstvička hydrofilního polymeru (např. kvarternizovaný vinylpyridin). Vodivostní elektrody byly v tomto případě napařeny přímo na polymer¹⁶; tloušťka elektrod musí být dostatečně malá (řádově desítky až stovky nm), aby byla umožněna výměna vodní páry mezi polymerem a analyzovaným prostředím.

Impedance polymeru se měří za podmínek obvyklých při měření vodivosti, kdy senzorem prochází střídavý proud o frekvenci desítek až tisíců Hz. Měřená impedance se v rozmezí *RH* od ca 0 do 100 % mění o několik řádů a je zpravidla na *RH* nelineárně závislá. Jednou z příčin nelineární závislosti je nepochybně komplexní charakter měřené impedance. Ta obsahuje příspěvek daný odporem filmu polymeru a příspěvek reakční impedance vznikající na rozhraní kovová elektroda/polymer. Podle obsahu vody v polymeru se na celkové impedanci jednotlivé příspěvky podílejí různou měrou, což se projevuje v nelinearitě závislosti¹⁷ měřeného signálu na *RH*. Příznivější vlastnosti z hlediska linearitě odezvy by mohly mít kompozitní materiály, jak bylo pozorováno v případě kompozitních filmů¹⁷ Nafion+SiO₂.

Nežádoucí vlastností senzorů je hystereze odezvy, související s rychlostí výměny vody mezi polymerem a analyzovaným plynem. Bylo zjištěno, že hysterezi lze potlačit použitím bifunkčních polymerů v nichž je nahrazena část silně kyselých hydrofilních skupin (SO₃⁻ H⁺) skupinami slabě kyse-

Tabulka III

Příklady polymerů testovaných v kapacitních senzorech pro stanovení relativní vlhkosti

Typ polymeru	Poznámky	Cit.
Poly(methylmetakrylát) (PMMA)	PMMA prokřížený s divinylbenzenem či některými estery kyseliny dimethakrylové. Závislost kapacity na <i>RH</i> (10–99 %) je lineární, malá pozorovaná hystereze odezvy je dána malým množstvím adsorbované vody (ve srovnání se senzory založenými na derivátech celulosy ⁸¹), viz též ⁸² .	21
Poly(ethylentereftalát)	senzor s elektrodami přímo napařenými na film (50 μm silný) byl použit jako frekvenci určující kondenzátor v elektronickém oscilátoru (555). Lineární závislost frekvence na <i>RH</i> (12–97 %); změna frekvence v uvedeném oboru <i>RH</i> byla asi 3kHz.	24
Poly(vinylcinnamát)	studován vliv stupně prokřížení polymeru na sorpci vody i na sorpci par organických látek (alkoholy, aceton). Adsorpce vody (a odtud i citlivost senzoru) roste se stupněm prokřížení do ca 95 %. Stupeň prokřížení, při němž dochází k největší sorpci par organických látek závisí na velikosti jejich molekul.	83
Poly(vinylbenzoát) Poly(vinylmethakrylát) Poly(vinylkrotonát) Poly(vinylcinnamát)	polymery tvořící prokřížené struktury, poly(vinylmetakrylát) a poly(vinylcrotonát), jsou pro kapacitní <i>RH</i> senzory vhodnější. Jsou rovněž odolnější vůči rozměrovým změnám při expozici prostředí obsahující páry organických látek (acetonu). Podíl kapacity při <i>RH</i> 90 a 0 % byl asi 1,35; stacionární hodnoty při změně <i>RH</i> je dosaženo za asi 30 s, teplotní koeficient byl 0,1 % <i>RH</i> /°C, hystereze max. 2 % <i>RH</i> .	84
Polyimidy	testovány různé formy oligomerů a polymerů odvozených od polyimidu; viz též ⁸⁵⁻⁸⁷ ; v cit. ⁸⁶ jsou porovnávány vlastnosti senzorů s prokříženým polyimidem, fluorovaným polyimidem a PMMA.	88
Fluorované polyimidy	stabilní polymerní materiál pro <i>RH</i> senzory, hystereze 0,5 % <i>RH</i> , rychlost dosažení 90 % stac. stavu 30 s, teplotní koeficient 0,1 % <i>RH</i> /°C, lineární závislost odezvy na <i>RH</i> v oboru 10–90 %, dlouhodobá stálost parametrů, ca ± 2 % <i>RH</i> /1000 hodin; viz též ⁸⁶ .	89
Polysulfon	lineární závislost kapacity na <i>RH</i> (10–90 %), hystereze 0,5 % <i>RH</i> , rychlost odezvy při vzrůstu i poklesu <i>RH</i> 30 s, teplotní koeficient (10–40 °C) 0,1 % <i>RH</i> /°C, dlouhodobě stabilní parametry.	90

lymi (COO⁻H⁺), které mají menší tendenci zadržovat absorbovanou vodu ve struktuře polymeru vodíkovými vazbami¹⁸. V případě Nafionu bylo zjištěno¹⁹, že voda při vzrůstu *RH* plynné fáze vstupuje do Nafionu mnohem rychleji než z něj při snížení *RH* vystupuje. To rovněž může vést k hysterezi odezvy, pokud je měření provedeno před dosažením rovnovážného obsahu vody v polymeru.

Kapacitní senzory

V kapacitních senzorech je polymer dielektrikem kondenzátoru. Využívá se zde polymerů spíše hydrofobních (větší obsah vody v polymeru může vést k vytváření klastrů molekul vody projevujících se hysterezí odezvy^{20,21}), mechanicky rigidních (rozměrová nestálost se projevuje velkou teplotní závislostí a časovou nestabilitou odezvy), jejichž relativní permitivita je ve srovnání s permitivitou vody malá. Proto již malé množství vody adsorbované na povrchu či ve struktuře polymeru výrazně změní jeho permitivitu a tím se změní i kapacita kondenzátoru. Množství adsorbované vody závisí na *RH* analyzovaného prostředí, proto je i změna kapacity úměrná *RH*; závislost kapacity na *RH* je u těchto senzorů v podstatě lineární.

Typické polymery používané v kapacitních senzorech jsou

odvozeny od polyimidu nebo derivátů celulosy (relativní permitivita polymerů je asi 3–6, relativní permitivita vody je asi 78); přehled dalších polymerů testovaných v kapacitních senzorech je v tabulce III. Struktura polymeru by měla zajistit dostatečně velký povrch na němž může být voda adsorbována. Ke zvětšení povrchu se osvědčily metody, při nichž je v polymeru vytvořena síť mikrotrhlinek širokých řádově desetin μm (cit.^{22,23}). Zvětšení povrchu se příznivě projevuje na rychlosti výměny vody mezi polymerem a analyzovaným plynem a odtud na statických i dynamických vlastnostech senzoru, tj. zvyšuje se citlivost detekce, rychlost odezvy a snižuje hystereze.

Typické struktury kapacitních senzorů jsou na obr. 1b, c. V senzoru na obr. 1b je na inertním substrátu vytvořena dělená (spodní) elektroda (např. platinová), na ní je film polymeru silný řádově jednotky μm a na jeho povrch je napařena (horní) společná elektroda (např. zlatá). Tloušťka této elektrody je, podobně jako v případě impedančních senzorů, malá, aby umožňovala výměnu vodní páry mezi analyzovaným plynem a polymerem (lze ji považovat za mikroporézní). Toto uspořádání představuje dva kondenzátory v sérii a je výhodné z toho důvodu, že eliminuje problémy s přívodním kontaktem k horní mikroporézní elektrodě. V senzoru na obr. 1c jsou elektrody napařené na dvě protilehlé strany polymerní membrány silné řádově desetin až setin mm (sandwich-type senzor). Změna kapacity se měří při frekvencích řádu stovek

kHz, bývá řádově desetiny až jednotky $pF/\%RH$ (je tedy třeba dbát na správné připojení senzoru k měřicímu přístroji, protože kapacita přivodů značně ovlivňuje odezvu).

Ve srovnání s impedančními senzory vlhkosti jsou kapacitní senzory snáze přizpůsobitelné mikroelektronickým strukturám. V nejjednodušším případě mohou být zapojeny jako externí kondenzátor řídicí frekvenci integrovaného oscilátoru²⁴ (např. v běžném typu 555) nebo lze přímo k jejich přípravě využít řady technologických postupů běžných při výrobě integrovaných obvodů. Kapacitní senzory lze vytvářet na křemíkovém čipu včetně např. zaintegrované diody pro měření teploty. Polymery používané v kapacitních senzorech mohou být použity rovněž jako chemicky citlivé vrstvy na řídicí elektrodě tranzistoru řízeného polem, viz práce²⁵ (polyimid), sdělení²⁶ (cellulose acetate butyrate) a citace^{5,27}.

Senzory založené na elektrolýze (ampérometrické senzory)

Stanovení vlhkosti v těchto senzorech je založeno na Faradayově zákoně elektrolýzy. Voda je absorbována ve filmu hydrofilního polymeru: $H_2O(\text{plyn}) \rightleftharpoons H_2O(\text{polymer})$, který je v kontaktu s dvěma elektrodami; příslušnou rovnováhu charakterizuje konstanta $k(\text{abs})$. Je-li na elektrody vloženo potřebné napětí, je absorbovaná voda elektrolyticky rozložena: $H_2O(\text{polymer}) \rightarrow H_2 + 1/2 O_2$; rychlost elektrolýzy lze charakterizovat konstantou $k(\text{el})$. Mírou obsahu vlhkosti je velikost elektrolýtického proudu. Pokud je na elektrody vloženo dostatečně vysoké stejnosměrné napětí, tak aby $k(\text{el}) > k(\text{abs})$, je elektrolýtický proud řízen rychlostí vstupu vody do polymeru a ta je za dané teploty přímo úměrná obsahu vody v analyzovaném plynu.

Senzory tohoto typu, v nichž je na místě polymeru film oxidu fosforečného, byly popsány již před lety^{28,29} a jsou doposud používány pro měření velmi nízkých úrovní vlhkosti. Jsou velmi citlivé, ale v prostředích s vyšší vlhkostí mají krátkou životnost. Náhradou filmu P_2O_5 filmem polymerů typu Nafionu³⁰ byl problém se stálostí senzoru vyřešen, avšak za cenu ztráty citlivosti. V práci³¹ byl popsán senzor s kompozitním polymerem tvořeným směsí Nafionu a P_2O_5 (či H_3PO_4), který kombinuje výhody obou materiálů – nízký detekční limit (jednotky ppm vody) a stálost v prostředích o vyšší RH . Se stanovením vlhkosti interferují páry nižších alkoholů natolik, že senzoru by bylo možno použít jako detektoru při separaci směsi alkoholů plynovou chromatografií³⁰.

Kromě Nafionu se v těchto senzorech testují i jiné polyfluorosulfonované ionexy odvozené např. od 1,1,2,2-tetrafluor-2-((trifluorethenyl)oxy)ethansulfonové kyseliny firmy Dow Chemical Co., USA, které mají nižší ekvivalentovou hmotnost (od 600) než Nafion (od 1100) a jsou tudíž hydrofilnější.

Příklad konstrukčního uspořádání ampérometrického senzoru vlhkosti je na obr. 2. Základem je zde injekční jehla z nerezové oceli s upraveným koncem, jejíž vnější stěny jsou chráněny teflonovou trubičkou. Středem jehly, izolovaně od stěn, prochází platinový drátek. Čelní plocha tohoto systému je zabroušena do roviny a elektrody jsou překryty filmem polymeru. Jehla je v senzoru katodou, platinový drátek anodou. Protože film polymeru má poměrně velký odpor ($M\Omega$), bývá napětí na elektrodách řádu desítek voltů, aby byl úbytek napětí na tomto odporu vykompenzován.

Uvedené senzory lze použít i pro stanovení vody v různých rozpouštědlech (aceton, acetonitril, diethylether, toluen, hexan, dichlormethan, benzen) pokud je polyfluorosulfonovaný polymer ochráněn před přímým stykem s rozpouštědlem překrytím vhodným ochranným polymerem, který však umožňuje transport vody. Testovány byly kompozitní polymery na bázi poly(vinylalkoholu) a derivátů celulosy³².

Senzory založené na měření změn mechanických vlastností

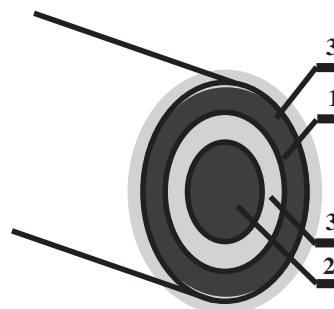
Jsou-li v polymeru, např. v hydroxyethylcelulose³³ či poly(vinylalkoholu)³⁴, rozptýlena vodivá zrnka (zpravidla uhlíková), pak v důsledku rozměrových změn polymeru při změně obsahu vody, dochází ke změně ohmického odporu mezi vodivými zrnky (princip uhlíkového mikrofonu); jde o tzv. swelling-type senzory. Jejich nevýhodou je značná hystereze odezvy, ale na druhé straně odezva je málo závislá na teplotě a k měření lze použít stejnosměrný proud. Tyto senzory nachází použití v meteorologii.

V uvedených senzorech je sice informačním signálem změna elektronové vodivosti, ale nikoli vodivosti polymeru samého, ale elektronového vodiče, který je s polymerem v kontaktu. Jde tedy o senzory využívající ke stanovení RH mechanických, nikoli elektrických vlastností polymeru. Polymery s vlastní elektronovou vodivostí (odvozené od např. polyacetyleny, polyanilinu atd.), které se rovněž pro použití v senzorech vlhkosti testují, nejsou do tohoto přehledu zahrnuty.

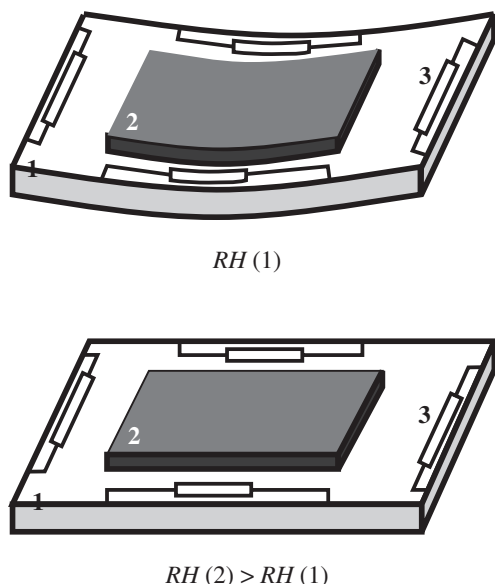
Mechanických (rozměrových) změn v polymerech způsobených změnou vlhkosti je dále využíváno v piezorezistorových senzorech. Film polymeru (např. polyimidu) je nanesen na pružné křemíkové membráně na níž jsou vytvořeny piezorezistory. Mechanické napětí způsobené deformací filmu polymeru je přenášeno na membránu a snímáno jako změna odporu piezorezistorů^{35,36}, viz obr. 3. Tyto senzory, podobně jako senzory kapacitní a senzory založené na měření změn hmotnosti (viz dále) je možno vyrábět ve formě kompatibilní s integrovanou elektronikou.

Senzory založené na měření změn hmotnosti

Vstup vody do polymeru mění nejen jeho elektrické a mechanické vlastnosti, ale změny i jeho hmotnost. Změny hmot-



Obr. 2. Příklad řešení ampérometrického senzoru vlhkosti; 1 – injekční jehla (katoda), 2 – Pt drátek (anoda), 3 – PTFE trubička. Čelo senzoru je překryto filmem polymeru. Podle³⁴

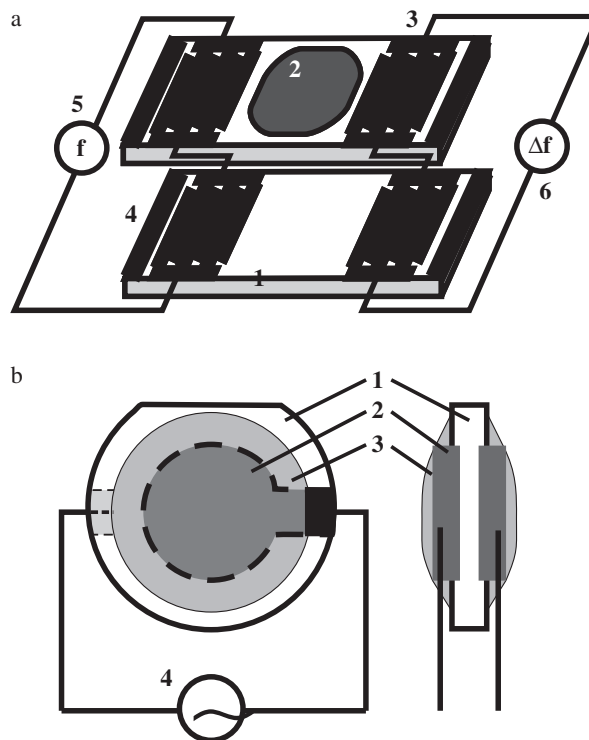


Obr. 3. Princip piezorezistorového senzoru *RH*; 1 – pružná membrána, 2 – film polymeru (polyimid), 3 – piezorezistory (při měření jsou zapojeny např. ve větvích Wheatstoneova můstku)

nosti jsou snímány piezoelektrickými senzory. Piezoelektrickým senzorem je piezoelektrikum, např. výbrus křemenného krystalu, pokrytý filmem polymeru. V uspořádání známém jako CPC – coated piezoelectric crystal (nebo QCM – quartz crystal microbalance, případně BAW – bulk acoustic wave sensor) se změna hmotnosti filmu polymeru projeví změnou rezonanční frekvence krystalu. V uspořádání známém jako SAW – surface acoustic wave, se mění frekvence povrchového vlnění postupujícího po povrchu piezoelektrika od vysílacích elektrod k elektrodám přijímacím. Tyto senzory mají řadu velice příznivých vlastností, např. jsou malé, levné, velice citlivé (změny frekvence lze měřit s vysokou přesností), mají velký dynamický rozsah, lze je vytvářet (především SAW senzory) metodami používanými při výrobě mikroelektronických obvodů a principiálně je lze zintegrovat do křemíkového čipu i s obslužnou elektronikou. Posledně jmenovaná vlastnost je významná, protože piezoelektrické senzory jsou používány pro detekci mnoha plynů a par různých látek a jsou častými komponentami multisenzorových systémů známých jako elektronický nos³⁷⁻³⁹. Změna *RH* deformuje obraz odezev těchto senzorů, takže v souboru senzorů bývá jeden určen pro měření *RH* analyzovaného plynu; pro přípravu všech senzorů v souboru tak lze použít stejné technologie.

Konstrukční uspořádání hmotnostních senzorů *RH* je na obr. 4, jde o uspořádání obdobné, jako při detekci par jiných látek. Frekvence oscilátoru jsou řádu jednotek až stovek MHz, změny frekvence způsobené změnou hmotnosti polymeru jdou řádově do jednotek kHz; spolehlivě lze měřit změny frekvence řádu desetin Hz. SAW senzory umožňují použít vyšších frekvencí, což je z hlediska detekčních limitů příznivější, protože změna frekvence na jednotkovou změnu hmotnosti je přímo úměrná frekvenci oscilátoru.

Jako příklad CPC senzorů *RH* je možno uvést senzor s chemicky modifikovaným nitrovaným polystyrenem (citlivost detekce 40 Hzi/% *RH*)⁴⁰, senzor s Langmuirovým-Blod-



Obr. 4. Senzory *RH* založené na měření změn hmotnosti; a – dvojitce SAW senzorů, senzor *RH* je opatřen filmem polymeru, referenční senzor je od analyzovaného prostředí izolován; 1 – piezoelektrický substrát, 2 – film polymeru, 3 – vysílací a přijímací elektrody (IDT – interdigital transducers), 4 – akustický absorbér, 5 – oscilátor–vysílač, 6 – přijímač rozdílové frekvence; b – BAW senzor; 1 – křemenný výbrus, 2 – elektrody, 3 – film polymeru, 4 – oscilátor a měřič frekvence

getové filmem palmitoyl celulosy⁴¹, senzory s filmy vytvářenými plazmovou polymerací řady monomerů, acetonitrilu, dinitrilu kyseliny ftalové či malonové, hexamethydisiloxanu (citlivost jednotky až desítky Hzi/% *RH*)⁴². Jako příklad SAW senzoru lze uvést dvojitý senzor pro současné stanovení⁴³ CO₂ a *RH*. Systém pro detekci vlhkosti obsahoval metodou spin-coated vytvořený film (40 nm) poly(vinylpyrrolidonu), systém pro detekci CO₂ film (370 nm) polyimidu. Vhodným chemometrickým zpracováním odezev z obou systémů bylo možno současně stanovit *RH* (10–60 %) a obsah CO₂ (0,03–97 %). Dalšími polymery používanými v SAW senzorech byly např. polyimid⁴⁴, poly(fenylacetylen)⁴⁵, poly(ethylenimin)⁴⁶. Výrazného zlepšení vlastností senzoru (rozšíření oboru *RH* na 0 až 100 %) bylo dosaženo vytvořením filmu kovu mezi piezoelektrickým výbrusem a polymerní vrstvou⁴⁷. Z uvedených příkladů je patrná rozmanitost materiálů testovaných pro stanovení obsahu vlhkosti i spektrum metod používaných k vytváření jejich filmů na piezoelektrickém substrátu.

Optické senzory

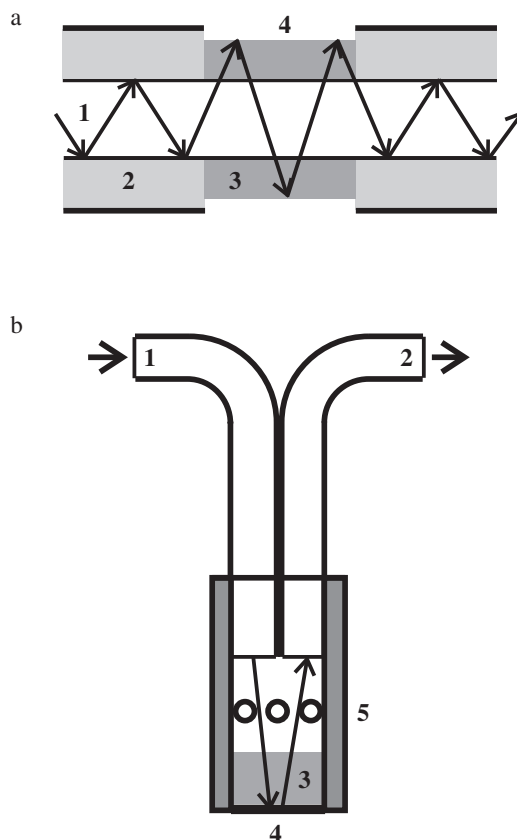
V optických senzorech *RH* jsou tuhé polymery využívány jako hydrofilní matrice látek, jejichž optické vlastnosti se mění se změnou vlhkosti. Klasickým příkladem jsou senzory, v nichž je využíváno známé změny zbarvení chloridu kobalt-

natého; CoCl_2 byl imobilizován v želatině⁴⁸, poly(vinylpyrolidonu)⁴⁹ či v celuloze a v jejích derivátech⁵⁰. Reverzibilní reakce vody s trifluoroacetofenonem imobilizovaným v poly(vinylchloridu), která je spojena se změnou absorpčního spektra, byla využita v práci⁵¹. K měření *RH* bylo využito i reverzibilní změny optické propustnosti samotné hydroxypropylcelulosy⁵². Změna obsahu vody v polymeru při změně *RH* v některých případech mění jeho solvatochromní vlastnosti, což se projevuje změnou optických vlastností barviv, tvořících s polymerem kompozit. Typickým příkladem je kompozit Nafion–methylenová modř^{53–56}; při hodnotách *RH* blízkých nule je kompozit žlutý, s rostoucí vlhkostí přibývá modré formy barviva. Dalším příkladem je kompozit Reichardtova barviva (používaného k indikaci přítomnosti vody v organických rozpouštědlech) s poly(methylmetakrylátem) nebo poly(ethylenoxidem)^{57,58}. K optickému zjišťování *RH* je využíváno i vlivu molekul vody na fluorescenci některých látek. Např. intenzita fluorescence rhodaminových barviv v kompozitu s želatinou⁵⁹ nebo hydroxypropylcelulosou^{60,61} klesá s rostoucím obsahem vody v kompozitu, naopak, intenzita fluorescence metalochromního indikátoru methylcalceinu v poly(ethylenoxidu) či v kyselině polyakrylové s růstem *RH* roste⁶². Další příklady lze nalézt v práci⁶³.

Optické senzory, v nichž je záření od zdroje k analyzovanému místu a odtud k detektoru záření vedeno optickými vlákny, tzv. optody (nebo optrody), jsou často používány pro detekci látek v kapalném i plynném prostředí a lze je použít též pro měření relativní vlhkosti^{48,49,53,56,57,59,63}. Častá jsou dvě základní uspořádání optického senzoru. Kompozit polymer–aktivní látka (CoCl_2 , barvivo), může být nanášen přímo na část optického vlákna, která je zbavena ochranného obalu (obr. 5a). Při vhodně zvolených parametrech experimentu nedochází k totálnímu odrazu světla na rozhraní vlákno – kompozit, ale až na rozhraní kompozit – analyzovaný plyn, takže procházející záření je modulováno optickými změnami, k nimž dochází v kompozitu jako důsledek změny *RH* analyzovaného plynu. V druhém uspořádání (obr. 5b) je jedním optickým vláknem přiváděno záření od zdroje k filmu kompozitu, který je nanášen na reflexní podložku. Záření se odráží od reflexní podložky, přičemž dvakrát prochází kompozitem a druhým vláknem je vedeno k detektoru záření.

V senzorech s optickými vlákny je výhodné, aby ke změně optických vlastností kompozitu docházelo ve viditelné (případně blízké infračervené oblasti), kdy lze použít levných optických vláken z plastických hmot, instrumentace je nenáročná a používaná barviva jsou chemicky stálá; UV zářením se většinou rozkládají. V těchto oblastech záření lze jako zdrojů použít světloemittující diody. Potřebná instrumentace je v tomto případě velice jednoduchá, takže lze detegovat změny optických vlastností kompozitu současně při několika vlnových délkách a získané signály vhodným chemometrickým způsobem zpracovat, např. použít je jako vstupní signály umělých neuronových sítí (ANN – artificial neuron network). Takto bylo dosaženo podstatného zlepšení vlastností senzoru *RH* s kompozitem Nafion–methylenová modř⁵⁶.

Kromě klasických optických vláken bylo pro stanovení vlhkosti využito i planárních světlovodů (IOW – integrated optical waveguide). Vrstva planárního světlovodivého materiálu byla pokryta filmem erythrosinu B imobilizovaného v polysiloxanu. V přítomnosti vodní páry se mění optické vlastnosti rozhraní světlovodič/film indikátoru tak, že se mění



Obr. 5. Senzory *RH* s optickými vlákny; a – senzor s aktivní vrstvou přímo na optickém vlákně; 1 – jádro optického vlákna, 2 – izolace, 3 – kompozit polymer – aktivní látka, 4 – analyzované prostředí; b – senzor v reflexním uspořádání; 1 – přívod od zdroje záření, 2 – výstup k detektoru záření, 3 – polymer s aktivní látkou, 4 – reflexní podložka, 5 – optická izolace detekčního prostoru s otvory umožňujícími vstup analyzovaného plynu

intenzita světla procházejícího světlovodičem. Změnu intenzity záření lze korelovat s *RH* analyzovaného plynu⁴⁵. Výhodou tohoto uspořádání je relativně velká plocha senzoru exponovaná analyzovanému prostředí (řádově cm^2), takže analyt se do aktivní vrstvy dostává z většího objemu analyzovaného plynu a stanovení je tak citlivé.

Závěr

Stále rostoucí význam polymerů nejrůznějších druhů používaných v senzorech vlhkosti (a nejen v nich) je nepochybný, důvody byly zmíněny na různých místech v tomto článku. Polymery jsou tvárným materiálem, jejich vlastnosti lze určovat jak výběrem základních komponent, monomerů, tak i způsobem polymerace a dalším zpracováním, např. tepelným. Perspektivními materiály jsou rovněž kompozity organických a anorganických látek, jimž byla, pokud jde o senzory vlhkosti, doposud věnována malá pozornost. Není proto divu, že polymery jsou v problematice senzorů materiálem oblíbeným a hledání jejich nových typů, které by umožňovaly připravovat senzory s vlastnostmi stále více se blížícími těm požadovaným, není prakticky v žádném ohledu limitováno.

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR při řešení úkolů výzkumného záměru č. J13/98: 113100002.

LITERATURA

1. Fexa J., Široký K.: *Měření vlhkosti*. SNTL, Praha 1983.
2. Váňa J.: *Analyzátory plynů a kapalin*, kap. 23. SNTL, Praha 1984.
3. Mitchell J., Smith D. M.: *Aquametry*. Wiley, New York 1977.
4. Yamazoe N., Shimizu Y.: *Sens. Actuators* 10, 379 (1986).
5. Arai H., Seiyama T., v knize: *Sensors. A Comprehensive Survey* (Göppel W., Hesse J., Zemel J. N., ed.). VCH, Weinheim 1989.
6. Michell A. K., v knize: *Techniques and Mechanisms in Gas Sensing* (Moseley P. T., Norris J. O. W., Williams D. E., ed.). Adam Hilger, Bristol 1991.
7. Sakai Y., Sadaoka Y., Matsuguchi M.: *Sens. Actuators*, B 35–36, 85 (1996).
8. Opekar F.: *Chem. Listy* 90, 916 (1996).
9. Opekar F., Štulík K.: *Anal. Chim. Acta* 385, 151 (1999).
10. Opekar F.: *Chem. Listy* 79, 703 (1985); 87, 396 (1993).
11. Sakai Y.: *Sens. Actuators*, B 13–14, 82 (1993).
12. Sakai Y., Sadaoka Y., Fukumoto H.: *Sens. Actuators* 13, 243 (1988).
13. Eisenberg A., Yeager H. L. (ed.): *Perfluorinated Ionomer Membranes*, ACS Symp. Ser. No. 180. ACS, Washington D.C. 1982.
14. Wang H., Feng C. D., Sun S. L., Segre C. U., Stetter J.: *Sens. Actuators*, B 40, 211 (1997).
15. Sakai Y., Sadaoka Y., Ikeuchi K.: *Sens. Actuators* 9, 125 (1986).
16. Sakai Y., Sadaoka Y., Matsuguchi M., Kanakura Y., Tamura M.: *J. Electrochem. Soc.* 138, 2474 (1991).
17. Feng C. D., Sun S. L., Wang H., Serge C. U., Stetter J.: *Sens. Actuators*, B 40, 217 (1997).
18. Huang P. H.: *Sens. Actuators* 13, 329 (1988).
19. Opekar F., Svozil D.: *J. Electroanal. Chem.* 385, 269 (1995).
20. Matsuguchi M., Umeda S., Sadaoka Y., Sakai Y.: *Sens. Actuators*, B 49, 179 (1998).
21. Matsuguchi M., Sadaoka Y., Sakai Y., Kuroiwa T., Ito A.: *J. Electrochem. Soc.* 138, 1862 (1991).
22. Delapierre G., Grange H., Chambaz B., Destannes L.: *Sens. Actuators* 4, 97 (1983).
23. Park Ch. B., Lee Y. H., Yi S. B.: *Sens. Actuators*, B 13–14, 86 (1993).
24. Pérez J. M., Freyre C.: *Sens. Actuators*, B 42, 27 (1997).
25. Bolthausen T., Azeredo Leme C., O'Leary P.: *Sens. Actuators*, B 15–16, 75 (1993).
26. Hijikigawa M.: *Proc. 2nd Int. Meeting on Chemical Sensors, Bordeaux 1986*, str. 101.
27. Parameswaran M., Baltes H. P., Brett M. J., Fraser D. E., Robinson A. M.: *Sens. Actuators* 15, 325 (1988).
28. Keidel F. A.: *Anal. Chem.* 31, 2043 (1959).
29. Cole L. G., Czuhra M., Mosley R. W., Sawyer D. T.: *Anal. Chem.* 31, 2048 (1959).
30. Huang H., Dasgupta P. K.: *Anal. Chem.* 62, 1935 (1990).
31. Huang H., Dasgupta P. K., Ronchinsky S.: *Anal. Chem.* 63, 1570 (1991).
32. Huang H., Dasgupta P. K.: *Anal. Chem.* 64, 2406 (1992).
33. Stine S. L.: *Humidity Moisture* 1, 436 (1965).
34. Barkauskas J.: *Talanta* 44, 1107 (1997).
35. Boltshauser T., Häberli A., Baltes H.: *Sens. Mater.* 5, 125 (1993).
36. Buchhold R., Nakladal A., Gerlach G., Neumann P.: *Sens. Actuators*, B 53, 1 (1998).
37. Gardner J. W., Bartlett P. N.: *Sens. Actuators*, B 18–19, 211 (1994).
38. Barkó G., Hlavay J.: *Talanta* 44, 2237 (1997).
39. Zellers E. T., Han M. W.: *Anal. Chem.* 68, 2409 (1996).
40. Neshkova M., Petrova R., Petrov V.: *Anal. Chim. Acta* 332, 93 (1996).
41. Kusano H., Kimura S., Kitagawa M., Kobayashi H.: *Thin Solid Films* 295, 53 (1997).
42. Radeva E., Bobev K., Spassov L.: *Sens. Actuators*, B 8, 21 (1992).
43. Hoyt A. E., Ricco A. J., Bartholomew J. W., Osbourn G. C.: *Anal. Chem.* 70, 2137 (1998).
44. Nieuwenhuizen M. S., Nederlof A. J.: *Sens. Actuators*, B 2, 97 (1990).
45. Skrdla P. J., Saavedra S. S., Armstrong N. R., Mendes S. B., Peyghambarian N.: *Anal. Chem.* 71, 1332 (1999).
46. Caliendo C., Verona E., D'Amico A., Furlani A., Iucci G., Russo M. V.: *Sens. Actuators*, B 15–16, 288 (1993).
47. Tashtoush N. M., Cheeke J. N., Eddy N.: *Sens. Actuators*, B 49, 218 (1998).
48. Russell A. P., Fletcher K. S.: *Anal. Chim. Acta* 170, 209 (1985).
49. Ballantine D. S., Wohltjen H.: *Anal. Chem.* 58, 2883 (1986).
50. Boltinghouse F., Abel K.: *Anal. Chem.* 61, 1863 (1989).
51. Wang K., Seiler K., Haug J. P., Lehman B., West S., Hartman K., Simon W.: *Anal. Chem.* 63, 970 (1991).
52. Otsuki S., Adachi K.: *Anal. Sci.* 9, 299 (1993).
53. Sadaoka Y., Matsuguchi M., Sakai Y., Murata Y.: *Sens. Actuators*, B 7, 443 (1992).
54. Sadaoka Y., Matsuguchi M., Sakai Y., Murata Y.: *J. Mater. Sci.* 27, 5095 (1992).
55. Brook T. E., Narayanaswamy R.: *Sens. Actuators*, B 51, 77 (1998).
56. Brook T. E., Taib M. N., Narayanaswamy R.: *Sens. Actuators*, B 38–39, 272 (1997).
57. Sadaoka Y., Sakai Y., Murata Y.: *Talanta* 39, 1675 (1992).
58. Sadaoka Y., Matsuguchi M., Sakai Y., Murata Y.: *Chem. Lett.* 1992, 53.
59. Choi M. F., Tse O. L.: *Anal. Chim. Acta* 378, 127 (1999).
60. Otsuki S., Adachi K.: *Bunseki Kagaku* 41, 639 (1992).
61. Otsuki S., Adachi K., Taguchi T.: *Sens. Actuators*, B 53, 91 (1998).
62. Sadaoka Y., Sakai Y., Wang X.: *J. Mater. Sci.* 29, 883 (1994).
63. Posch H. E., Wolfbeis O. S.: *Sens. Actuators* 15, 77 (1988).
64. Sakai Y., Sadaoka Y., Matsuguchi M.: *J. Electrochem. Soc.* 136, 171 (1989).
65. Sakai Y., Sadaoka M., Matsuguchi M., Rao V. L.: *J. Mater. Sci.* 24, 101 (1989).
66. Sakai Y., Matsuguchi M., Sadaoka Y., Hirayama K.: *J. Electrochem. Soc.* 140, 432 (1993).
67. Kleinfeld E. R., Ferguson G. S.: *Chem. Mater.* 7, 2327 (1995).

68. Rauen K. L., Smith D. A., Heineman W. R., Johnson J., Seguin R., Stonghton P.: *Sens. Actuators, B* 17, 61 (1993).
69. Ogura K., Shiigi H., Nakayama M.: *J. Electrochem. Soc.* 143, 2925 (1996).
70. Ogura K., Shiigi H., Nakayama M., Kuratani K.: *Denki Kagaku* 64, 1327 (1996).
71. Shiigi H., Nakayama M., Ogura K.: *Nippon Kagaku Kaishi* 1997, 847.
72. Ogura K., Saino M., Nakayama M., Shiigi H.: *J. Mater. Chem.* 7, 2363 (1997).
73. Ogura K., Kokura M., Nakayama M.: *J. Electrochem. Soc.* 142, L152 (1995).
74. Yoshimura K., Hozumi K., Sawai M., Tatsuta T., Tsuji O.: *Kobunshi Ronbunshu* 52, 427 (1995).
75. Yang M. J., Sun H. M., Casalboremiceli G., Camaioni N., Mari C. M.: *Synth. Met.* 81, 65 (1996).
76. Yang M. R., Chen K. S.: *Sens. Actuators, B* 49, 240 (1998).
77. Sakai Y., Rao V. L., Sadaoka Y., Matsuguchi M.: *Polym. Bull.* 18, 501 (1987).
78. Sakai Y., Sadaoka Y., Matsuguchi M., Moriga N., Shimada M.: *Sens. Actuators* 16, 359 (1989).
79. Pfeifer K. B., Hughes R. C., Jenkins M. W., Schneider T. W.: *J. Electrochem. Soc.* 146, 794 (1999).
80. Sakai Y., Sadaoka Y., Matsuguchi M., Sakai H.: *Sens. Actuators, B* 24–25, 689 (1995).
81. Sadaoka Y., Matsuguchi M., Sakai Y., Takahashi K.: *J. Mater. Sci. Lett.* 7, 121 (1988).
82. Roman C., Bodea O., Prodan N., Levi A., Cordos E., Manovicu I.: *Sens. Actuators, B* 24–25, 710 (1995).
83. Matsuguchi M., Shinmoto M., Sadaoka Y., Kuroiwa T., Sakai Y.: *Sens. Actuators, B* 34, 349 (1996).
84. Matsuguchi M., Sadaoka Y., Nuwa Y., Shinmoto M., Sakai Y.: *J. Electrochem. Soc.* 141, 614 (1994).
85. Parameswaran M., Baltes H. P., Brett M. J., Fraser D. E., Robinson A. M.: *Sens. Actuators* 15, 325 (1988).
86. Matsuguchi M., Kuroiwa T., Miyagishi T., Suzuki S., Ogura T., Sakai Y.: *Sens. Actuators, B* 52, 53 (1998).
87. Jaafar M. A. S., Ralsten A. R. K., Denton D. D.: *Sens. Mater.* 3, 111 (1991).
88. Matsuguchi M., Sadaoka Y., Nosaka K., Ishibashi M., Sakai Y., Kuroiwa T., Ito A.: *J. Electrochem. Soc.* 140, 825 (1993).
89. Kuroiwa T., Hayashi T., Ito A., Matsuguchi M., Sadaoka Y., Sakai Y.: *Sens. Actuators, B* 13–14, 89 (1993).
90. Kuroiwa T., Miyagishi T., Ito A., Matsuguchi M., Sadaoka Y., Sakai Y.: *Sens. Actuators, B* 24–25, 692 (1995).

P. Hrnčířová and F. Opekar (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*):
Sensors with Solid Polymers for Determination of Relative Humidity of Gases

Relative humidity sensors in which various kinds of solid polymers are used as humidity-sensitive materials are reviewed. Sensors based on various operation principles, namely measuring impedance, capacitance, optical, weight and dimensional changes and on amperometry are discussed.

DERIVATIZAČNÉ REAKCIE V KAPILÁRNEJ ELEKTROFORÉZE AMINOKYSELÍN

PETER MIKUŠ a DUŠAN KANIANSKY

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: pmikus@fns.uniba.sk

Došlo dňa 11. X.1999

Kľúčové slová: aminokyseliny, derivatizácia, kapilárna elektroforéza

Obsah

1. Úvod
2. Charakterizácia a zhodnotenie derivatizačných metód
 - 2.1. Tvorba izoindolov
 - 2.2. Tvorba tiokarbamyl/tiohydantoin derivátov
 - 2.3. Tvorba sulfonamidov
 - 2.4. Tvorba amidov
 - 2.5. Tvorba uretánov
 - 2.6. Tvorba *N*-aryl aminokyselín
 - 2.7. Menej používané derivatizačné reakcie
3. Záver

1. Úvod

Zwitterionický charakter, ale najmä absencia chromofórov, fluorofórov, alebo elektroforóv v molekulách väčšiny aminokyselín¹ (AA), ktoré by umožnili ich citlivú a selektívnu detekciu, majú za následok, že AA sa technikami kapilárnej elektroforézy (CE) analyzujú prevažne vo forme derivátov (viď napríklad prehľadné práce z posledného obdobia²⁻⁷). Výber derivatizačnej reakcie, vhodnej CE techniky (kapilárna zónová elektroforéza (CZE), micelárna elektrokinetická chromatografia (MEKC), kapilárna elektrochromatografia (CEC), kapilárna izotachoforéza (CITP)) a spôsobu detekcie (predkolónová, pokolónová, alebo spojená s reakciou priamo v kolóne) sú vzájomne úzko previazané.

Derivatizácia AA priamo v CE kolóne (in-column derivatizácia^{4,5,8-11}) je veľmi atraktívna (derivatizácia a separácia prebiehajú súčasne, jednoduché experimentálne usporiadanie a znížené nároky na manipuláciu so vzorkou). Na druhej strane, reprodukovateľnosť derivatizácie realizovanej týmto spôsobom je ovplyvnená injektážou vzorky a činidla, aplikovaným napätím, reakčným časom a inými menej závažnými faktormi^{9,11}. Derivatizácia v on-line kombinácii s CE separáciou je prakticky nevyhnutná v monitoringu rýchlych zmien AA vo vzorkách odobratých zo živých organizmov¹².

V tejto práci je venovaná pozornosť derivatizačným reakciám AA najmä z hľadiska reakčných podmienok, chemickej povahy vznikajúcich derivátov a ich detekcie naväzujúcej na CE separáciu.

2. Charakterizácia derivatizačných reakcií a metód

Prevažná časť derivatizačných činidiel používaných v CE aminokyselín (tabuľka I) poskytuje deriváty, v ktorých je príslušná funkčná skupina naviazaná na aminoskupinu AA. Tým zaniká zwitterionický charakter väčšiny AA a deriváty s voľnou karboxylovou skupinou sú separovateľné v anionickom režime. V menšej miere sa v CE aminokyselín využívajú derivatizačné reakcie, ktorých sa zúčastňuje karboxylová skupina AA (vznik esterov) a reakcie vedúce k vzniku elektroneutrálnych derivátov (tiohydantoin deriváty). Pre pokolónovú detekciu môžu byť aplikované aj činidlá tvoriace s rôznymi AA identický produkt.

2.1. Tvorba izoindolov

V CE aminokyselín sa najčastejšie využívajú derivatizačné reakcie AA poskytujúce izoindoly (schéma (1) na obr. 1). Najčastejšie využívaným derivatizačným činidlom patriacim do tejto skupiny je dialdehyd kyseliny *o*-ftalovej (OPA). OPA pri laboratórnej teplote, v zásaditom prostredí a v prítomnosti tiolu reaguje prakticky okamžite s primárnymi AA (tabuľka II), za vzniku 1-alkyltio-2-alkyl-substituovaných izoindolov¹³. Reakciu sprevádza len obmedzená tvorba detekciu rušiacich interferentov a preto má predpoklady na využitie k derivatizácii AA priamo v separačnej kapiláre^{8,9,11,14} v spojení s veľmi citlivou fluorescenčnou alebo elektrochemickou detekciou.

Nižšia stabilita derivátov, tvorba zmesných a viacnásobne derivatizovaných produktov a nepoužiteľnosť k detekcii sekundárnych AA (cit.^{13,15}) sú obmedzujúce faktory použitia OPA v CE. K zvýšeniu stability vznikajúcich produktov sa využívajú nukleofily alternatívne k 2-merkaptoetanolu (kyselina 3-merkaptopropiónová, *N*-acetyl-L-cysteín, Boc-L-cysteín, *N*-acetyl-D-penicilamín, *N*-izobutyryl-L-cysteín, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-tio- β -D-glukopyranóza, HSO₃⁻, CN⁻)^{11,15-17}. Riešením je aj náhrada OPA novými činidlami (naftalén-2,3-dikarboxyaldehyd (NDA); 3-(4-karboxybenzoyl)-2-chinolín-karboxyaldehyd)¹⁸⁻²⁰.

2.2. Tvorba tiokarbamyl/tiohydantoin derivátov

Skupina činidiel poskytujúca tiokarbamyl a následne tiohydantoin deriváty AA (schéma (2) na obr. 1) má v molekule reaktívnu izotiokyanátovú funkčnú skupinu. Činidlá reagujú nielen s voľnou aminoskupinou, ale aj s OH⁻ iónmi, pričom rýchlostné konštanty oboch reakcií sú podobné^{21,22}. Dôsledkom tohoto sú relatívne dlhé reakčné časy a praktická využiteľnosť len v prípadoch, ak vzorka obsahuje AA v relatívne vysokých koncentráciách²³. Aj keď je pracovný postup charakteristický pre túto skupinu derivatizačných činidiel dosť zdĺhavý, v prípade derivatizácie optických izomérov môže byť jednoduchší a rýchlejší ako pri použití činidiel prináležiacich do iných skupín^{24,25}. Na rozdiel od činidiel tvoriacich s AA izo-

Tabuľka I

Derivatizačné činidlá používané v CE analýze aminokyselín

Charakteristika reakcie	Derivatizačné činidlo ^a
Tvorba izoindolov	OPA ⁹ , NDA ¹⁹ , CBQCA ²⁰ , IDA ¹⁴
Tvorba tiokarbamyl/tiohydantoin derivátov	PITC ³¹ , DABITC ⁷⁴ , FITC ²² , GITC ²⁴ , NPITC ⁷⁵ , SNEIT ²⁵ , SAMBI ²⁵ , PAPITC ³⁵ , ILITC ⁷⁶ , DBD-NCS ³² , PDITC ⁷⁷ , CDITC ⁷⁸ , AITC ²⁶ , BITC ²⁶ , BEITC ²⁶ , PEITC ²⁶ , TCITC ²⁷ , TRITC ²⁹ , NBD-PyNCS ⁷⁹
Tvorba sulfonamidov	Dns-Cl ³⁴ , Dbs-Cl ⁸⁰ , BANS-Cl ³⁵
Tvorba amidov	
(i) Štiepenie sukcinimidyl esteru	SINC ⁴² , SET ⁴³ , DCCS ⁴³ , SEDC ⁴⁰ , SETC ²⁷ , NAS ³⁵ , AQC ⁴¹ , SEP ⁴⁴ , CFSE ³⁹
(ii) Reakcia acyl – halogenidu	DNB-Cl ⁴⁷ , ARC-Cl ⁴⁵ , CRA-Cl ⁴⁶ , CRP-Cl ⁴⁵
(iii) Reakcia anhydridu	DBT ⁵¹ , DAT ⁵¹ , AKC ⁸¹
Tvorba uretánov	FMOCCl ⁵² , FLECCl ⁵³ , AECCl ⁸² , APOCCl ⁸³
Tvorba <i>N</i> -aryl aminokyselín	DNFB ⁶⁵ , DNFB-L-Ala ⁸⁴ , NBD-F ⁶⁴ , FDNDEA ⁶⁰ , TNBS ⁶²
Iné derivatizačné reakcie	fluorescamin ⁶⁶ , MDF ³⁵ , DTNB ⁶⁹ , pyridoxal ³⁵ , PQQ ⁶⁸ , HLTE ⁶⁷ , alkoholy (estery AA) ⁷² , Cu ²⁺ chelát ⁷⁰ , <i>N</i> - <i>terc</i> -butyloxykarbonyl deriváty ⁷³

^a Zoznam použitých skratiek

indoly môže byť pracovný postup komplikovaný aj potrebou izolovať nadbytok činidla a vedľajšie reakčné produkty^{22,26}. Na druhej strane, reaktivitu izotiokyanátovej skupiny charakterizuje dobrá selektivita k primárnym a sekundárnym aminoskupinám (fenolické hydroxyly ani imidazolové skupiny AA nereagujú). Izotiokyanáty do molekúl AA vnášajú fluorofóry (fluoresceín, tetrametylrodamin), ktoré majú vysoké molárne absorptivity a vysoké kvantové výťažky fluorescencie aj v porovnaní s derivátmi takých činidiel ako sú OPA, NDA, alebo danzyl (Dns)-Cl. Detekčné limity AA derivatizovaných fluoresceín izotiokyanátom²⁸ a tetrametylrodamin izotiokyanátom²⁹ sú na úrovni 10⁻²¹ mol (10⁻¹² mol.l⁻¹). Spojenie takejto extrémnej detekčnej citlivosti s vysokou selektivitou dáva predpoklady pre ich využitie v ultrastopovej analýze AA aj v zložitých biologických matriaciach³⁰. Prínajmenšom dve z činidiel využívajúcich tvorbu tiohydantoin derivátov majú osobitné postavenie v rámci celého súboru derivatizačných metód pre AA a peptidy. Sú to fenyl izotiokyanát³¹ (PITC) a 7-[(*N,N*-dimetylamino)sulfonyl]-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl izotiokyanát³², ktoré umožňujú spoľahlivú sekvenčnú analýzu proteínov a peptidov (Edmanov sekvenčný postup). Druhé zo spomínaných činidiel je alternatívou k PITC a jeho prednosťou je tvorba intenzívne fluoreskujúcich derivátov.

2.3. Tvorba sulfonamidov

Tvorbu sulfonamidov charakterizuje reakčná schéma (3) na obr. 1. Deriváty AA sú vo všeobecnosti stabilné a v CE dobre detegovateľné^{33,34}. Derivatizačný postup je jednoduchší a rýchlejší (hoci v niektorých prípadoch sú požadované vyššie teploty), napríklad v porovnaní s prípravou tiohydantoin derivátov³⁵. Potreba odstrániť potenciálne interferenty (nadbytok činidla a jeho hydrolytické produkty) však zostáva³⁶, pretože treba uvažovať riziko spontánnej reakcie nadbytku činidla (napríklad Dns-Cl) s AA derivátmi za vzniku fluoreskujúceho amidu (Dns-amidu). Nevýhodou je nižšia reakčná selektivita sulfonylchloridov. Tieto, okrem primárnym a sekundárnym aminoskupín, reagujú aj s fenolickými hydroxy- a imidazolovými skupinami AA, pričom reakčné výťažky veľmi závisia

od koncentrácie činidla. V kontexte s tvorbou sulfonamidov je potrebné poznamenať, že danzylácia je jedinou bežnou derivatizačnou reakciou, ktorá je vhodná na spoľahlivú detekciu a stanovenie cystínu³⁷.

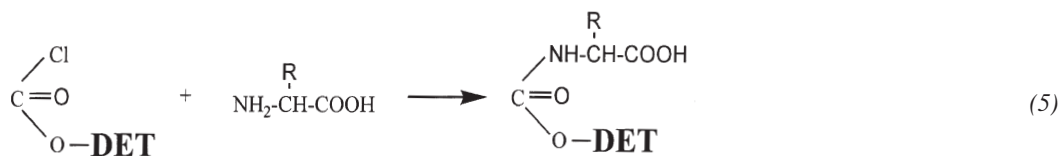
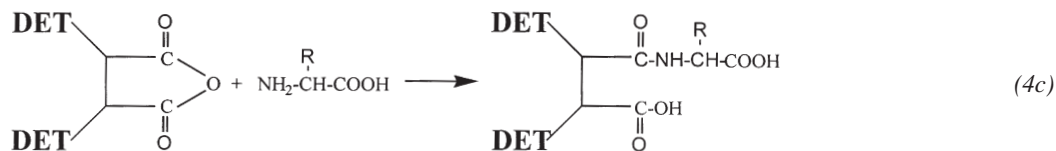
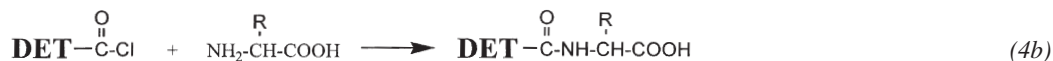
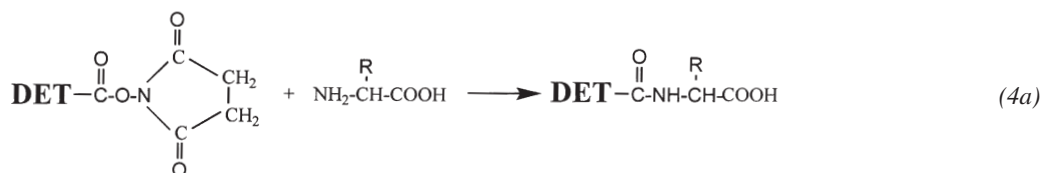
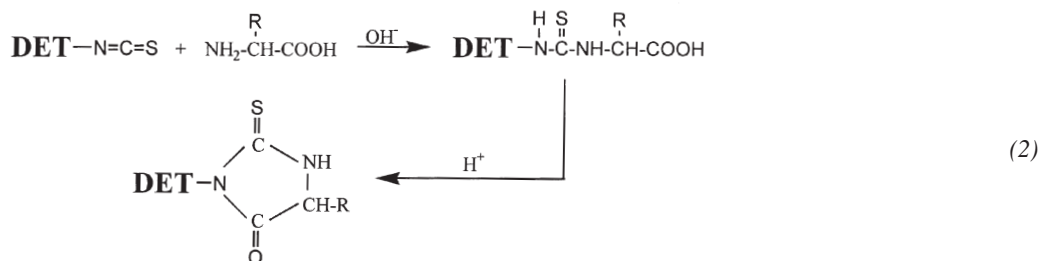
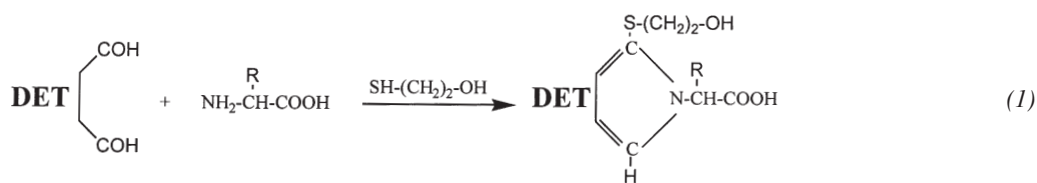
2.4. Tvorba amidov

Deriváty AA vyznačujúce sa amidickou väzbou AA na činidlo sú veľmi stabilné³⁸ a ich príprava je obvykle jednoduchá. V literatúre bola opísaná príprava amidov prinajmenšom tromi spôsobmi: (i) štiepením sukcinimidyl esteru v molekule činidla pri reakcii s AA, (ii) reakciou acyl-halogenidu a (iii) reakciou esteru s AA.

Činidlá s reaktívnou sukcinimidyl esterovou funkčnou skupinou sú najčastejšie využívané látky viažúce fluorofór na AA amidickou väzbou (schéma (4a) na obr. 1). Ich hydrolytická stabilita je daná povahou fluorofóru naviazaného na ester a napríklad, sukcinimidyl estery trikarbocyanínových farbív hydrolyzujú veľmi ľahko, kým ich izotiokyanáty sú podstatne stabilnejšie²⁷. V prípade fluoresceínu je situácia obrátená³⁹. Vo všeobecnosti je pre sukcinimidyl estery a ich AA deriváty charakteristická hydrolyza pri vyšších hodnotách pH (cit.⁴⁰). Na druhej strane, ich reakčné rýchlosti s aminoskupinami sú o viac ako jeden dekadický poriadok vyššie v porovnaní s korešpondujúcimi izotiokyanátmi (napríklad v prípade fluoresceínu) a tieto činidlá derivatizujú AA obsiahnuté vo vzorke aj na nanomolárnej koncentračnej úrovni³⁹ (o tri dekadické poriadky nižšie koncentrácie v porovnaní s príslušnými izotiokyanátmi⁴⁰). Niektoré činidlá tejto skupiny sa vyznačujú prakticky okamžitou reakciou s AA (6-aminochinolylyl-*N*-hydroxysukcinimidoyl karbamát⁴¹ a sukcinimido α -naftylkarbamát⁴²). Celkový derivatizačný postup s uvedenými činidlami je jednoduchý, pretože produkty rýchlo hydrolyzujúceho nadbytku činidla (vzhľadom na ich nízku fluorescenciu) nie je potrebné z reakčnej zmesi odstraňovať. Na druhej strane, interferencie hydrolytických produktov sú významné pre väčšinu ostatných derivatizačných reakcií prináležiacich do tejto skupiny^{40,43}. Prostredníctvom sukcinimidyl esteru sa za miernych reakčných podmienok vnášajú do molekúl AA veľmi

citlivo detegovateľné fluorofóry (cyanínové^{27,40}, pyronínové⁴⁴, tiazínové⁴³, rodamínové a fluoresceínové³⁹ farbivá).

Deriváty vznikajúce reakciou acylhalogenidu s AA (schéma (4b) na obr. 1) sa vyznačujú veľmi dobrou stabilitou. De-



Obr. 1. Skupinové reakčné schémy charakterizujúce derivatizačné reakcie aminokyselín v CE. (1) Tvorba izoindolov; (2) tvorba tiokarbamyl/tiohydantoin derivátov; (3) tvorba sulfonamidov; (4) tvorba amidov: a) štiepením sukcinimidyl esteru v činidle, b) reakciou acyl-halogenidu, c) reakciou anhydridu; (5) tvorba uretánov; (6) tvorba *N*-aryl aminokyselín. DET = detekčne aktívna časť molekuly

Tabuľka II

Charakterizácia derivatizačných reakcií najčastejšie používaných v CE aminokyselín

Činidlo	Rýchlosť ^a	Teplota ^b	Derivatizačný režim ^c	Derivatizácia 2°AA ^d	Stabilita derivátu ^e
OPA	+++	lab	pre, post, in	–	+
NDA	++	lab	pre	–	+ / ++
CBQCA	++	lab	pre, in	–	++
PITC	++ ^f ; + ^g	lab/+	pre	+	++
FITC	++ ^f ; + ^g		pre	+	++
Dns-Cl	++	lab/+	pre	+	+++ / ++++
Dbn-Cl	++	+	pre	+	+++ / +++
AQC	+++	lab	pre	+	++ / +
SEDC	++ / ++++	lab	pre	+	++ / +
FMOC-Cl	+++	lab	pre	+	+++
AEOC-Cl	+++	lab	pre	+	+++
DNFB	++	lab	pre	+	+++ / ++
NBD-F	+++		pre, post	+	+++
Fluorescamin	+++	+	pre, post, in	–	++

^a Škála rýchlosti reakcie: +++ = sekundy až minúty, ++ = desiatky minút až hodina, + = viac ako hodina; ^b reakčná teplota: + = zvýšená, lab = laboratórna; ^c derivatizácia: pre = predkolónová, post = pokolónová, in = priamo v kolóne; ^d reakcia so sekundárnymi AA: + = činidlo reaguje, – = činidlo nereaguje; ^e stabilita derivátov v roztoku: +++ = dlhodobá (dni), ++ = krátkodobá (hodiny), + = nízka (minúty); ^f tiokarbamyl; ^g tiohydantoín

tekčná citlivosť novšie pripravených fluorogénnych derivátov^{45,46} a UV žiarenie absorbujúcich dinitrobenzoyl derivátov⁴⁷ (DNB) je len priemerná. V prípade DNB je pozoruhodná derivatizácia činidlom naviazaným na pevný polymérny nosič⁴⁸. Tento spôsob derivatizácie môže byť významným prínosom v celkovom zjednodušení pracovného postupu, pretože eliminuje purifikáciu reakčnej zmesi.

Zdlhavý a náročný pracovný postup (reakcia v nevodnom prostredí⁴⁹⁻⁵¹) môže byť dôvodom, prečo sa na prípravu amidických derivátov AA používajú anhydridy len zriedkavo (schéma (4c) na obr. 1).

2.5. Tvorba uretánov

Skupinu činidiel, ktoré reagujú s AA za vzniku uretánov (schéma (5) na obr. 1) charakterizuje prakticky okamžitá reakcia a veľmi mierne reakčné podmienky^{52,53}. Najznámejším činidlom patriacim do tejto skupiny je 9-fluorenylmetylchloroformát (FMOC-Cl). Výťažok reakcie pre toto činidlo je konštantný v širokom intervale molárneho pomeru činidla k analytu⁵⁴, pričom detekčná citlivosť derivátov vo fluorescenčnom režime optickej detekcie je podobná akú majú izoindoly. Citlivosť v absorpčnom režime je vyššia a napríklad absorptivita antracénového fluorofóru 2-(9-antryl)etyl chloroformátu (AEOC-Cl) pri vlnovej dĺžke jeho absorpčného maxima (256 nm) je až 180000 l.mol⁻¹.cm⁻¹ (cit.⁵⁵) (pravdepodobne najcitlivejšia UV absorbná fotometrická detekcia AA). Na rozdiel od izoindolov, uretány sú vytvárané reakciou primárnych aj sekundárnych AA. Táto skutočnosť bola využitá pri selektívnom stanovení sekundárnych AA vedľa primárnych kombináciou OPA a FMOC-Cl (cit.⁵⁶). Ďalším významným rozdielom v porovnaní s izoindolmi je mimoriadna stabilita uretánov. Uvedené vlastnosti podmieňujú široké praktické využitie tohto derivatizačného prístupu^{52,56}. Jeho najväčšia

nevýhoda súvisí s tendenciou nadbytku činidla vytvárať hydrolytické produkty interferujúce v detekcii. Nadbytok činidla môže v niektorých prípadoch spontánne reagovať s derivátmi AA a so svojim hydrolytickým produktom v reakčnej zmesi^{57,58}. Preto v pracovnom postupe musí byť zahrnuté odstránenie interferentov extrakciou, alebo reakciou nadbytku činidla s vhodným aminom⁵⁴. Požiadavky na minimálnu koncentráciu analytu vo vzorke⁵⁹ (10⁻⁷ mol.l⁻¹) a nižšia selektivita reakcie (reakcia s imidazolom histidínu a s fenolickým hydroxylom tyrozínu) sú ďalšie, avšak aj pre väčšinu derivatizačných metód typické obmedzenia.

2.6. Tvorba N-aryl aminokyselín

Aromatická nukleofilná substitúcia (schéma (6) na obr. 1) je klasickou reakčnou schémou v derivatizácii AA. Činidlá patriace do tejto skupiny sú charakterizované vysokou stabilitou produktov⁶⁰ a reakčnou rýchlosťou ktorá ich predurčuje k použitiu len v predkolónovom derivatizačnom režime. Špecifita derivatizačnej reakcie môže závisieť od stupňa substitúcie aromatického systému činidla (napríklad, 2,4-dinitrofluorbenzén⁶¹ (DNFB) na rozdiel od 2,4,6-trinitrobenzén-sulfónovej kyseliny⁶² (TNBS) reaguje okrem tiolových aj s imidazolovými skupinami a fenolickými hydroxylmi AA). Osobitné postavenie DNFB v rámci tejto skupiny je dané jeho schopnosťou štiepiť koncovú AA v proteínoch a peptidoch⁶³. Optická a elektrochemická detekcia produktov „klasických“ činidiel tejto skupiny (DNFB a TNBS) je selektívna, ale málo citlivá v porovnaní s fluorescenčnou detekciou AA vo forme ich izoindolov, uretánov alebo amidov ak sú fluorofórnymi cianín, rodamín alebo fluoresceín.

7-Fluoro-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazol⁶⁴ (NBD-F) je vhodnou alternatívou k DNFB a TNBS, pretože okrem vysokej detekčnej selektivity a citlivosti intenzívne fluoreskujúcich

Tabuľka III
 Detekcia v CE najčastejšie využívaných derivátov aminokyselín

Činidlo	Detekčná technika ^a	Citlivosť ^b	Selektivita ^c	DI ^d
OPA	FD (325–350 nm), AD (UV), ED	+++,+/+,++	++,+/+,++	–
NDA	FD (442–488 nm), AD (420 nm), ED	+++,+/+,++	+++/+,+/+,+++	– ^e
CBQCA	FD (442 nm)	+++/>++	+++/>++	–
PITC	AD (UV), ED	+,+/+	+,++	+
FITC	FD (490 nm)	+++	+++/>++	+
Dns-Cl	FD, AD (325 nm)	++,+/+	++,+/+	+
Dbs-Cl	AD (458 nm)	++/>+	++/>+++	+
AQC	FD, AD (UV)	++,+/+	++,+/+	–
SEDC	FD (667 nm)	+++	+++	+
FMOC-Cl	FD, AD (248–265 nm)	++/>+++/>+/+	+++/>+	+
AMOC-Cl	FD, AD (256–386 nm)	+++/>++/>+++/>++	+++/>++	+
DNFB	AD (UV, VIS), ED	+,++	++/>+++/>++	+
NBD-F	FD (464–488 nm)	++	+++	–
Fluorescamin	FD (780 nm)	+++	+++	+ ^f

^a FD – fluorescenčná, AD – absorpčná, ED – elektrochemická detekcia; ^b škála citlivosti detekcie: +++ = amol-ymol, ++ = fmol, + = pmol; ^c škála selektivity detekcie: +++ = vysoká, ++ = dobrá, + = nízka; ^d detekčné interferencie (DI): – = nevýznamné, + = významné v dôsledku nadbytku činidla a/alebo tvorby vedľajších reakčných produktov; ^e žltý precipitát; ^f laktóny

AA derivátov umožňuje aj jednoduchý a rýchly pracovný postup pre pred- a pokolónový derivatizačný režim, nakoľko samotné činidlo nefluoreskuje. Výhodou vnesenia málo objemného substituenta do molekuly AA (napríklad tvorba *N*-aryl AA) sú dobré elektroforetické vlastnosti derivátov⁶⁵.

2.7. Menej používané derivatizačné reakcie

V tejto časti sú diskutované derivatizačné reakcie, ktoré neprináležia do vyššie uvedených skupín a sú používané v spojení s CE separáciami AA len sporadicky.

Fluorescamin sa v CE aminokyselín nepoužíval pre jeho nevýhody (nereaguje so sekundárnymi AA, pracovný postup musí zohľadňovať nestabilitu činidla a jeho nízku rozpustnosť vo vode, vznik vedľajších produktov, ako aj požiadavku na zvýšenú teplotu)³⁵. Použitím nových detekčných prístupov (lasery s vysokou intenzitou svetelného toku) však boli spoznané prednosti tohto činidla⁶⁶ (mimoriadne vysoká detekčná citlivosť a selektivita v dôsledku neobvyklej vlnovej dĺžky použitej v excitácii (viď tabuľka III) a derivatizácie AA obsiahnutých vo vzorkách aj na veľmi nízkej koncentračnej úrovni).

Z ďalších činidiel si zasluhuje pozornosť 2-metoxy-2,4-difenyl-3-(2*H*)-furanón (MDF), ktorý na rozdiel od svojich derivátov AA nefluoreskuje³⁵. Veľmi špecifické určenie má reakcia pyridoxalu s NaBT₃, ktorou sa pripravujú deriváty detegovateľné extrémne selektívnou rádiometrickou detekciou³⁵. Na druhej strane, hydrochinóny⁶⁷ a chinóny (a ich substituované analógy⁶⁸) môžu v analýze AA kombinovať výhody elektrochemickej aj optickej detekcie.

Riešenie praktických úloh často vyžaduje vysokú reakčnú selektivitu činidla. V tomto ohľade je príkladom 5,5'-ditio-bis[2-nitrobenzoová kyselina] (DTNB), ktorá umožňuje špecifickú detekciu tio-AA (cit.⁶⁹). Osobitným prípadom je použitie kovových iónov k veľmi selektívnej detekcii AA. Bolo zistené, že AA tvoriace s Cu(II) stabilné cheláty (napríklad

histidín) môžu byť v tejto forme aj veľmi selektívne detegované⁷⁰.

CE separácie esterov AA sa spájajú s využitím negatívne nabitých chirálnych selektorov, ako sú deriváty cyklodextrínov⁷¹ a crown étery⁷². *N*-*tert*-butyloxykarbonyl deriváty AA (prekurzory v syntéze peptidov) boli pripravené za účelom štúdií rozdielov interakcií N-blokovaných a natívných AA s teicoplaninom⁷³.

3. Záver

Derivatizačné činidlá a postupy v súčasnosti študované v spojení s analýzou AA technikami CE vychádzajú najmä z praxe venovaných kvapalinovej chromatografii AA. Ich implementácia do CE vyžaduje obvykle len menšiu modifikáciu syntetických postupov. Na druhej strane CE ponúka do analýzy AA isté výhody súvisiace, napríklad s vysokou separačnou účinnosťou CZE a MEKC a zníženými nárokmi na množstvo analyzovanej vzorky a derivatizačného činidla. Škála derivatizačných činidiel používaných v CE sa však v porovnaní s HPLC významnejšie nezúžila. Je to dané tým, že každá z derivatizačných reakcií má svoje špecifiká a doposiaľ nebolo nájdené činidlo, ktoré by splnilo všetky, často rozporné, analytické požiadavky. Napríklad, tvorba izoindolov má prednosť v rýchlosti reakcie a v minime interferencií spojených s prítomnosťou činidla v reakčnej zmesi. Na druhej strane táto skupina činidiel reaguje výlučne s primárnymi AA. Niektoré z izotiokyanátov (napríklad PITC) sú aplikovateľné pri určovaní sekvencie AA v proteínoch a peptidoch použitím CE aj keď zo všeobecného pohľadu nepredstavujú skupinu vhodnú pre univerzálne využitie (zdĺhavý derivatizačný postup, požiadavka kladená na veľkosť vzorky, interferencie činidla, derivatizácia amino aj karboxylovej funkčnej skupiny AA). Tvorba uretánov spĺňa mnohé z požiadaviek „ideálnej“ derivatizačnej metódy pre AA. Interferencie pochádzajúce od

nadbytku činidla a nižšia reakčná selektivita limitujú jeho aplikovateľnosť. AEOC-deriváty AA môžeme pravdepodobne považovať za alternatívu vedúcu k najcitlivejšej detekcii AA bežnými fotometrickými technikami založenými na absorpcii svetla. Na druhej strane, niektoré derivatizačné činidlá (DNB-Cl) poskytujú deriváty AA, ktorých detekčné vlastnosti sa navzájom líšia (absorpčné maximá primárnych a sekundárnych DNB-derivátov sú vzájomne posunuté o 26 nm). Touto cestou sa dá vniešť do detekcie AA prvok selektivity. Sukcinimidyl estery sú vhodné na vnašovanie fluorofórov do molekúl AA, ktoré vedú k ich extrémne citlivej detekcii. Fluorescamín eliminuje nedostatok drivej väčšiny derivatizačných postupov, ktorým sú nároky na relatívne veľké množstvo derivatizovanej vzorky. Iné z derivatizačných činidiel, DTNB, má potenciálne významné aplikačné možnosti v selektívnej detekcii tio-AA, zatiaľ čo reakcia AA s Dns-Cl je v súčasnosti pravdepodobne jedinou bežnou derivatizačnou reakciou, ktorá umožňuje spoľahlivú detekciu a stanovenie cystínu. Dinitrofenyl deriváty majú veľmi dobré elektroforetické vlastnosti a syntéza umožňuje prípravu analyticky dobre definovaných produktov. Rádioaktívne značenie v spojení s použitím pyridoxalu umožňuje vysoko citlivú a extrémne selektívnu rádiometrickú detekciu AA. Z uvedeného je zreteľná potreba používania väčšieho počtu derivatizačných činidiel a postupov v CE aminokyselín, ale aj výzva na vývoj funkčne cieľených činidiel.

Táto práca bola finančne podporená Slovenskou grantovou agentúrou pre vedu (projekt No. 1/4138/97).

Zoznam použitých skratiek pre derivatizačné činidlá

AEOC-Cl	2-(9-antryl)etyl chloroformát
AITC	alylizotiokyanát
AKC	anhydrid kyseliny citrakónovej
APOC-Cl	(+)/(–)-1-(9-antryl)-2-propyl chloroformát
AQC	6-aminochinolyl- <i>N</i> -hydroxysukcinimidoyl karbamát
ARC-Cl	akridón- <i>N</i> -acetyl chlorid
BANS-Cl	5-di- <i>n</i> -butylaminonaftalén-1-sulfonyl chlorid
BEITC	but-3-enyl izotiokyanát
BITC	benzyl izotiokyanát
CBQCA	3-(4-karboxybenzoyl)-2-chinolín-karboxyaldehyd
CDITC	(1 <i>S</i> /1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> /2 <i>R</i>)- <i>N</i> -[(2-izotiokyanato)cyklohexyl]-6-metoxy-4-chinolinylamid
CFSE	5-karboxyfluoresceín sukcinimidyl ester
CRA-Cl	karbazol-9-yl-acetyl chlorid
CRP-Cl	karbazol-9-yl-propionyl chlorid
DABITC	dimetylaminoazobenzén izotiokyanát
DAT	(+)- <i>O</i> , <i>O</i> '-diacetylanhydrid kyseliny L-vínnej
DBD-NCS	7-[(<i>N,N</i> -dimetylamino)sulfonyl]-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl izotiokyanát
Dbs-Cl	4-dimetylaminoazobenzén-4-sulfonyl chlorid
DBT	(+)- <i>O</i> , <i>O</i> '-dibenzoylanhydrid kyseliny L-vínnej
DCCS	sukcinimidyl ester 7-(dietylamino)kumarín-3-karboxylová kyselina
DNB-Cl	3,5-dinitrobenzoyl chlorid
DNFB	2,4-dinitrofluórbenzén

DNFB-L-Ala	1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alanín
Dns-Cl	5-dimetylamino-naftalén-1-sulfonyl chlorid
DTNB	5,5'-ditiobis[2-nitrobenzoová kyselina]
FDNDEA	<i>N,N</i> -dietyl-2,4-dinitro-5-fluoroanilín
FITC	fluoresceín izotiokyanát
FLEC-Cl	(+)/(–)-1-(9-fluorenyl)etyl chloroformát
Fmoc-Cl	9-fluorenylmetyl chloroformát
GITC	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-glukopyranozyl izotiokyanát
HLTE	<i>gamma</i> -laktón tetrahydropranyl éter
IDA	1-metoxycarbonylindolizín-3,5-dikarboxyaldehyd
ILITC	izoluminol izotiokyanát
MDF	2-metoxy-2,4-difenyl-3-(2 <i>H</i>)-furanón
NAS	<i>N</i> -acetoxysukcinimid
NBD-F	7-fluoro-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazol
NBD-PyNCS	<i>R</i> -(–)/ <i>S</i> -(+)-4-(3-izotiokyanatopyrolidín-1-yl)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol
NDA	naftalén-2,3-dikarboxyaldehyd
NPITC	4-nitrofenyl izotiokyanát
OPA	dialdehyd kyseliny <i>o</i> -ftalovej
PAPITC	<i>p</i> -fenylazofenyl izotiokyanát
PDITC	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)- <i>N</i> -[(2-izotiokyanato)-cyklohexyl]-pivalinoyl]amid
PEITC	fenyletyl izotiokyanát
PITC	fenyl izotiokyanát
PQQ	redoxný koenzým pyrolochinolín chinón
SAMBI	(<i>S</i>)-1-fenyletylizotiokyanát
SEDC	sukcinimidyl ester dikarbocyanín
SEP	sukcinimidyl ester pyronín
SET	sukcinimidyl ester tiazín
SETC	sukcinimidyl ester trikarbocyanín
SINC	sukcinimido α-naftylkarbamát
SNEIT	(<i>S</i>)-1-(1-naftyl)etyl izotiokyanát
TCITC	trikarbocyanín izotiokyanát
TNBS	2,4,6-trinitrobenzénsulfónová kyselina
TRITC	tetrametylrodamin izotiokyanát

LITERATÚRA

- Hunt S., v knihe: *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids* (Barrett G. C., ed.), str. 376. Chapman and Hall, London 1985.
- Armstrong D. W., Rundlett K. L., Chen J. R.: *Chirality* 6, 496 (1994).
- Armstrong D. W., Gasper M. P., Rundlett K. L.: *J. Chromatogr. A* 689, 285 (1995).
- Bardelmeijer H. A., Lingeman H., deRuiter C., Underberg W. J. M.: *J. Chromatogr. A* 807, 3 (1998).
- Bardelmeijer H. A., Waterval J. C. M., Lingeman H., Vanthof R., Bult A., Underberg W. J. M.: *Electrophoresis* 18, 2214 (1997).
- Krull I. S., Strong R., Sosic Z., Cho B. Y., Beale S. C., Wang C. C., Cohen S.: *J. Chromatogr. B* 699, 173 (1997).
- Smith J. T.: *Electrophoresis* 18, 2377 (1997).
- Oguri S., Yokoi K., Motohase Y.: *J. Chromatogr. A* 787, 253 (1997).
- Taga A., Sugimura M., Honda S.: *J. Chromatogr. A* 802, 243 (1998).
- Thompson J. E., Vickroy T. W., Kennedy R. T.: *Anal. Chem.* 71, 2379 (1999).

11. Tivesten A., Folestad S.: *Electrophoresis* 18, 970 (1997).
12. Hernandez L., Escalona J., Verdeguer P., Guzman N. A.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 2149 (1993).
13. Coque M. C. G. A., Hernández M. J. M., Camanas R. M. V., Fernández C. M.: *Anal. Biochem.* 178, 1 (1989).
14. Oguri S., Fujiyoshi T., Miki Y.: *Analyst* 121, 1683 (1996).
15. Molnarperl I., Vasanits A.: *J. Chromatogr. A* 835, 73 (1999).
16. Tivesten A., Lundqvist A., Folestad S.: *Chromatographia* 44, 623 (1997).
17. de Montigny P., Stobaugh J. F., Givens R. S., Carlson R. G., Srinivasachar K., Sternson L. A., Higuchi T.: *Anal. Chem.* 59, 1096 (1987).
18. Robert F., Bert L., Parrot S., Denoroy L., Stoppini L., Renaud B.: *J. Chromatogr. A* 817, 195 (1998).
19. Swanek F. D., Anderson B. B., Ewing A. G.: *J. Microcolumn Sep.* 10, 185 (1998).
20. Liu J., Hsieh Y. Z., Wiesler D., Novotny M.: *Anal. Chem.* 63, 408 (1991).
21. Drobnic L., Podhradský D., Augustin J.: *The Chemistry of Cyanates and their Thio Derivatives*, zv. 2, kapitola 22. Wiley, Chichester 1977.
22. Feng L., Mitchell M. E.: *J. Chromatogr. A* 832, 211 (1999).
23. Cheng Y. F., Dovichi N. J.: *Science* 242, 562 (1988).
24. Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M.: *J. Microcolumn Sep.* 2, 234 (1990).
25. Bonfichi R., Dallanoce C., Lociuoro S., Spada A.: *J. Chromatogr. A* 707, 355 (1995).
26. Bjerregaard C., Moller P., Sorensen H., Sorensen J. C., Sorensen S.: *J. Chromatogr. A* 836, 115 (1999).
27. Flanagan J. H., Khan S. H., Menchen S., Soper S. A., Hammer R. P.: *Bioconjugate Chem.* 8, 751 (1997).
28. Wu S. O., Dovichi N. J.: *Talanta* 39, 173 (1992).
29. Zhao J. Y., Chen D. Y., Dovichi N. J.: *J. Chromatogr.* 608, 117 (1992).
30. Britzmckibbin P., Vo H. C., Macgillivray R. T. A., Chen D. D. Y.: *Anal. Chem.* 71, 1633 (1999).
31. Walk T. B., Sussmuth R., Kempter C., Gnau V., Jack R. W., Jung G.: *Biopolymers* 49, 329 (1999).
32. Huang Y., Matsunaga H., Toriba A., Santa T., Fukushima T., Imai K.: *Anal. Biochem.* 270, 257 (1999).
33. Skočir E., Prosek M., Strazisar M., Golob T., Plestenjak A. M.: *J. Microcolumn Sep.* 9, 451 (1997).
34. Su S. C., Yu P. C., Liu C. H., Shiau H. W., Lee S. C., Chou S. S.: *J. Food Drug Anal.* 6, 455 (1998).
35. Knapp D. H.: *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. Wiley, New York 1979.
36. Martín P., Polo C., Cabezudo M. D., Dabrio M. V.: *J. Liq. Chromatogr.* 7, 539 (1984).
37. Furst P., Pollack L., Graser T. A., Godel H., Stehle P.: *J. Chromatogr.* 449, 557 (1990).
38. Banks P. R., Paquette D. M.: *Bioconjugate Chem.* 6, 447 (1995).
39. Lau S. K., Zaccardo F., Little M., Banks P.: *J. Chromatogr. A* 809, 203 (1998).
40. Mank A. J. G., Yeung E. S.: *J. Chromatogr. A* 708, 309 (1995).
41. Liu H. J., Sanuda Pena M. C., Harvey White J. D., Kalra S., Cohen S. A.: *J. Chromatogr. A* 828, 383 (1998).
42. Iwaki K., Nimura N., Hiraga Y., Kinoshita T., Takeda K., Ogura H.: *J. Chromatogr.* 407, 273 (1987).
43. Higashijima T., Fuchigami T., Imasaka T., Ishibashi N.: *Anal. Chem.* 64, 711 (1992).
44. Fuchigami T., Imasaka T., Shiga M.: *Anal. Chim. Acta* 282, 209 (1993).
45. Fan X. J., You J. M., Kang J. W., Ou Q. Y., Zhu Q. C.: *Anal. Chim. Acta* 367, 81 (1998).
46. You Y. M., Sun H. T., Lao W. J., Ou Q. Y.: *Anal. Chim. Acta* 382, 51 (1999).
47. Gahm K. H., Stalcup A. M.: *Anal. Chem.* 67, 19 (1995).
48. Bourque A. J., Krull I. S.: *J. Chromatogr.* 537, 123 (1991).
49. Schutzner W., Fanali S., Rizzi A., Kenndler E.: *J. Chromatogr.* 639, 375 (1993).
50. Lindner W., Leitner C., Uray G.: *J. Chromatogr.* 316, 605 (1984).
51. Schutzner W., Caponecchi G., Fanali S., Rizzi A., Kenndler E.: *Electrophoresis* 15, 769 (1994).
52. Melucci D., Xie M., Reschiglian P., Torsi G.: *Chromatographia* 49, 317 (1999).
53. Wan H., Andersson P. E., Engström A., Blomberg L. G.: *J. Chromatogr. A* 704, 179 (1995).
54. Malmer M. F., Schroeder L. A.: *J. Chromatogr.* 514, 227 (1990).
55. Engstrom A., Anersson P. E., Josefsson B., Pfeffer W. D.: *Anal. Chem.* 67, 3018 (1995).
56. Chan K. C., Janini G. M., Muschik G. M., Issaq H. J.: *J. Chromatogr.* 622, 269 (1993).
57. Godel H.: *Dizertačná práca*. Univerzita Hohenheim, Stuttgart 1986.
58. Faulkner A. J., Veening H., Becker H. D.: *Anal. Chem.* 63, 292 (1991).
59. Chan K. C., Janini G. M., Muschik G. M., Issaq H. J.: *J. Chromatogr. A* 653, 93 (1993).
60. Fermo I., Rubino F. M., Bolzacchini E., Arcelloni C., Paroni R., Bonini P. A.: *J. Chromatogr.* 433, 53 (1988).
61. Van der Horst F. A. L., Holthuis J. J. M.: *J. Chromatogr.* 426, 267 (1988).
62. Caudill W. L., Wightman R. M.: *Anal. Chim. Acta* 141, 269 (1982).
63. Sanger F.: *Biochem. J.* 39, 507 (1945).
64. Ruyters H., Vanderwal S.: *J. Liq. Chromatogr.* 17, 1883 (1994).
65. Pietrzyk D. J., Chen S., Chanthawat B.: *J. Chromatogr. A* 775, 327 (1997).
66. Wei J., Gostkowski M. L., Gordon M. J., Shear J. B.: *Anal. Chem.* 70, 3470 (1998).
67. Rose M. J., Lunte S. M., Carlson R. G., Stobaugh J. F.: *Anal. Chem.* 71, 2221 (1999).
68. Esaka Y., Yamaguchi Y., Kano K., Goto M.: *J. Chromatogr. A* 652, 225 (1993).
69. Jenke D. R., Brown D. S.: *Anal. Chem.* 59, 1509 (1987).
70. Kaniansky D., Zelenský I.: *J. Chromatogr.* 638, 225 (1993).
71. Kitae T., Nakayama T., Kano K.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1998, 207.
72. Verleysen K., Sandra P.: *J. Microcolumn Sep.* 11, 37 (1999).
73. Tesařová E., Bosáková Z., Pacáková V.: *J. Chromatogr. A* 838, 121 (1999).
74. Waldron K. C., Wu S. L., Earle C. W., Harke H. R., Dovichi N. J.: *Electrophoresis* 11, 777 (1990).

75. Cohen S. A.: *J. Chromatogr.* 512, 283 (1990).
76. Hashimoto M., Tsukagoshi K., Nakajima R., Kondo K.: *J. Chromatogr. A* 832, 191 (1999).
77. Kleidernigg O. P., Lindner W.: *Chromatographia* 44, 465 (1997).
78. Kleidernigg O. P., Lindner W.: *J. Chromatogr. A* 795, 251 (1998).
79. Liu Y. M., Schneider M., Sticha C. M., Toyooka T., Sweedler J. V.: *J. Chromatogr. A* 800, 345 (1998).
80. Seidel B. S., Faubel W.: *J. Chromatogr. A* 817, 223 (1998).
81. Holloway C. J.: *J. Chromatogr.* 390, 97 (1987).
82. Wan H., Blomberg L. G.: *Electrophoresis* 17, 1938 (1996).
83. Thorsen G., Engstrom A., Josefsson B.: *J. Chromatogr. A* 786, 347 (1997).
84. Tran A. D., Blanc T., Leopold E. J.: *J. Chromatogr.* 516, 241 (1990).

P. Mikuš and D. Kaniánsky (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Derivatization Reactions in Capillary Electrophoresis of Amino Acids**

The article deals with derivatization reactions employed in capillary electrophoresis (CE) of amino acids (AA). Cur-

rently preferred reactions are classified into seven groups according to their reaction mechanisms and schemes. Many of them were originally developed for liquid chromatography of AA and their implementation in CE usually require minor modifications of the working conditions depending on specificities of the process. So far, more than fifty derivatization reactions of AA have been reported in the literature in the context of CE. This apparently reflects not only different reactivities of AA with different derivatization agents but also different envisaged applications of CE. Therefore, in some instances, requirements for high reaction rates determine the choice (e.g., post-column derivatizations of AA, *in vivo* monitoring of AA in microdialysates from biological processes). On the other hand, a need for the detection of amol-zmol amounts of AA may be often better met by the reactions characterized by lower reaction rates. Some of the derivatization agents provide very selective detections of a specific class of AA, e.g., detection of sulfanyl amino acids based on their reactions with 2,2'-dinitro-5,5'-disulfonyl-dibenzoic acid. So far, only a limited number of the derivatization reactions is applicable in the AA sequenations of peptides and proteins by CE. Here, phenyl isothiocyanate, 7-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl isothiocyanate and 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene appear to have a prominent position.

PURINOVÉ 8-*O*- A 8-*S*-CYKLONUKLEOSIDY – SYNTÉZA A VLASTNOSTI

ZLATKO JANEBA

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: janeba@uochb.cas.cz

Došlo dne 5.VIII. 1999

Klíčová slova: nukleosidy, nukleotidy, acyklické analogy nukleosidů, cyklizace

Obsah

1. Úvod
2. Purinové *O*-cyklonukleosidy
3. Purinové *S*-cyklonukleosidy
4. Purinové *Se*-cyklonukleosidy
5. Reakce purinových cyklonukleosidů
6. Transformace purinové báze v cyklonukleosidech
7. Fyzikální vlastnosti purinových cyklonukleosidů
8. Acyklické analogy purinových cyklonukleosidů a cyklonukleotidů
9. Polynukleotidy obsahující purinové cyklonukleosidy

1. Úvod

V oblasti chemie nukleosidů zaujímají význačné místo purinové deriváty modifikované v poloze C-8. Některé z nich mají významné biologické účinky¹, např. 8-aminoadenosin vykazuje výraznou inhibiči nádorových buněk sarkomu 180 a rezistenci vůči adenosindeaminase². 8-Aminoderiváty purinových nukleosidů přitahují zájem z důvodu jejich strukturální podobnosti se saxitoxinem, paralytickým toxinem vyskytujícím se u mořských obrněnek (*Dinophyceae*)^{3,4}. 8-Aminoderiváty guaninu významně inhibují purinnukleosidfosforylasu, klíčový enzym katabolismu purinů^{5,6}. 8-Merkapto-guanosin má výrazné imunomodulační účinky, 7-alkyl-8-oxoguanosin (loxoribin) je studován pro svůj aktivizační vliv na proliferaci B-lymfocytů a aktivaci přirozených zabíječů (NK-buněk)^{7,8}.

Cyklonukleosidy se liší od běžných nukleosidů tím, že kromě glykosidické vazby navíc mají kovalentní vazbu (buď přímo vycházející z uhlíkového atomu nebo přes atom jiný, např. kyslík) mezi uhlíkovým atomem 2', 3' nebo 5' cukerné části a uhlíkem nebo dusíkem purinového (popř. pyrimidinového) skeletu.

Na tomto místě je potřeba zmínit se o nomenklatuře 8-cyklonukleosidů. Tak např. 8,5'-*O*-cykloadenosin (*I*, obr. 1), což je triviální název, může být pojmenován jako 8,5'-anhydro-9-(β-D-ribofuranosyl)-8-hydroxyadenin, nebo také (8*R*)-4-amino-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-8*R*,11*c*-epioxido-<1,3>oxazocino-

<3,2-*ec*,10*c*-diol. Z důvodu přehlednosti a srozumitelnosti používám v této práci směsí triviálního názvosloví a názvosloví odvozeného od cukrů, běžně používaného v chemii nukleových kyselin.

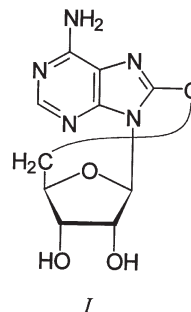
První cyklonukleosid byl připraven roku 1951 Lordem Toddem a jeho kolegy⁹. Následně se cyklonukleosidy staly středem zájmu výzkumu mnoha světových pracovišť. Obecně jsou považovány za univerzální meziproducty při přípravě biologicky důležitých nukleosidů a pro svou rigidní strukturu také za velmi vhodný nástroj pro jejich konformační studie.

Cílem této práce je podat přehled o syntéze a využití cyklonukleosidů a jejich derivátů. Zaměřil jsem se pouze na purinové 8-cyklonukleosidy, které obsahují v poloze C-8 atom skupiny VI A periodické soustavy prvků, tj. kyslík, síru, popř. selen. Nezabývám se zde purinovými 8-*N*-cyklonukleosidy, jejichž chemie je také dosti bohatá (možnost další substituce na atomu dusíku *N*-cyklonukleosidu)¹⁰⁻¹⁵. Dále se nezabývám 8-*C*-cyklonukleosidy, u nichž je atom uhlíku cukerné části vázán přímo k uhlíku C-8 purinové báze¹⁶⁻²¹.

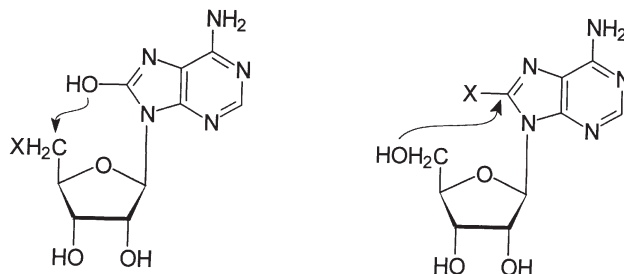
2. Purinové *O*-cyklonukleosidy

Sloučeniny, které zapadají do této kategorie zahrnují 8,2'-, 8,3'- a 8,5'-cyklonukleosidy odvozené od adenosinu, guanosinu a inosinu (popř. dalších derivátů purinu).

Obecně může k tvorbě *O*-cyklonukleosidu dojít dvěma způsoby (obr. 2). Buď hydroxyskupina na bázi v poloze C-8 atakuje elektrofilní uhlík cukerné části molekuly, nebo naopak hydroxyskupina na cukru atakuje elektrofilní uhlík báze.



Obr. 1.



Obr. 2.

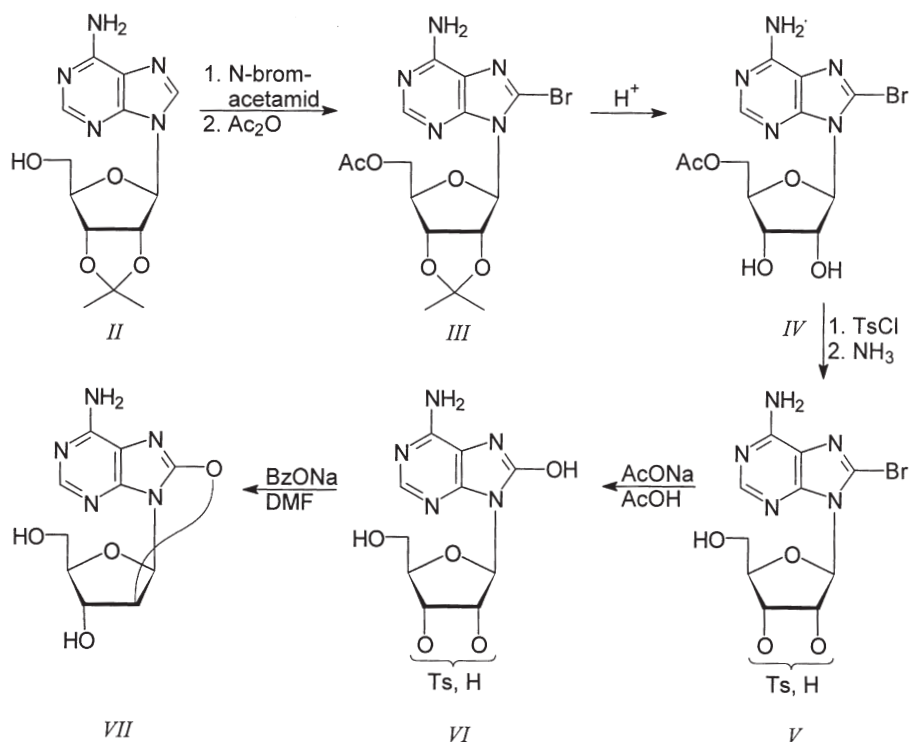


Schéma 1

VII

VI

V

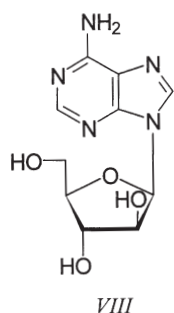


Schéma 2

VIII

IX

Významnou osobností chemie nukleosidů a nukleotidů je Japonec Morio Ikehara, který se také zabýval přípravou a chemickými i fyzikálními vlastnostmi cyklonukleosidů²². Jeho pracovní skupina v roce 1966 připravila 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadenin²³ (VII), první purinový cyklonukleosid obsahující O-anhydro vazbu (schéma 1). 2',3'-O-Isopropylidenadenosin (II) byl bromován N-bromacetamidem v chloroformu²⁴, a po acetylaci, kyselém odstranění isopropylidenové funkce, tosylaci a následné deacetylaci, byl bromderivát V převeden na hydroxyderivát VI reakcí s octanem sodným v kyselině octové²⁵. Cyklonukleosid VII byl získán zahříváním 8-hydroxyderivátu VI s benzoátem sodným v DMF (cit.²⁶).

Obecně je tedy při syntéze cyklonukleosidů prvním krokem halogenace (převážně bromace) nukleosidu. Bromace může být provedena u derivátů guanosinu bromem v kyselině octové v přítomnosti octanu sodného²⁴, u derivátů adenosinu N-bromacetamidem v chloroformu²⁴, nebo, v případě obou purinových nukleosidů směsí brom-dioxan v přítomnosti uhličitanu vápenatého^{27,28}. Výtěžek bromace byl

podstatně zvýšen použitím vodného acetátového pufru^{29,30}.

Chloraci purinových nukleosidů do polohy 8 lze provést za použití tetrabutylammonium jodtetrachloridu³¹ nebo *tert*-butylhypochloritu³², ačkoliv výtěžky jsou nízké. Lepšího výsledku bylo dosaženo použitím *m*-chlorperoxybenzoové kyseliny v DMF nebo DMA v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové³³. Chlor derivát IX velmi snadno podléhá intramolekulární cyklizaci na 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadenin (VII) v přítomnosti báze nebo i adsorpcí na silikagel a následnou elucí (schéma 2).

8-Hydroxyadenosin, jako výchozí látka pro intramolekulární cyklizaci, může být připraven reakcí 8-bromadenosinu s octanem sodným v kyselině octové²⁵ nebo v acetanhydridu³⁴.

Pro počáteční potíže s cyklizací 8-hydroxy-9-(3-O-tosyl-β-D-ribofuranosyl)adeninu z důvodu velké sterické distorze²³ byl jako výchozí látka použit derivát 2'-deoxyadenosinu³⁴. Jako dobře odstupující skupiny na cukerné části molekuly mohou být použity např. triisopropylbenzensulfonyl^{35,36}, *p*-methylbenzensulfonyl (tosyl)^{28,37,38}, cyklické karbonáty (2',3'-

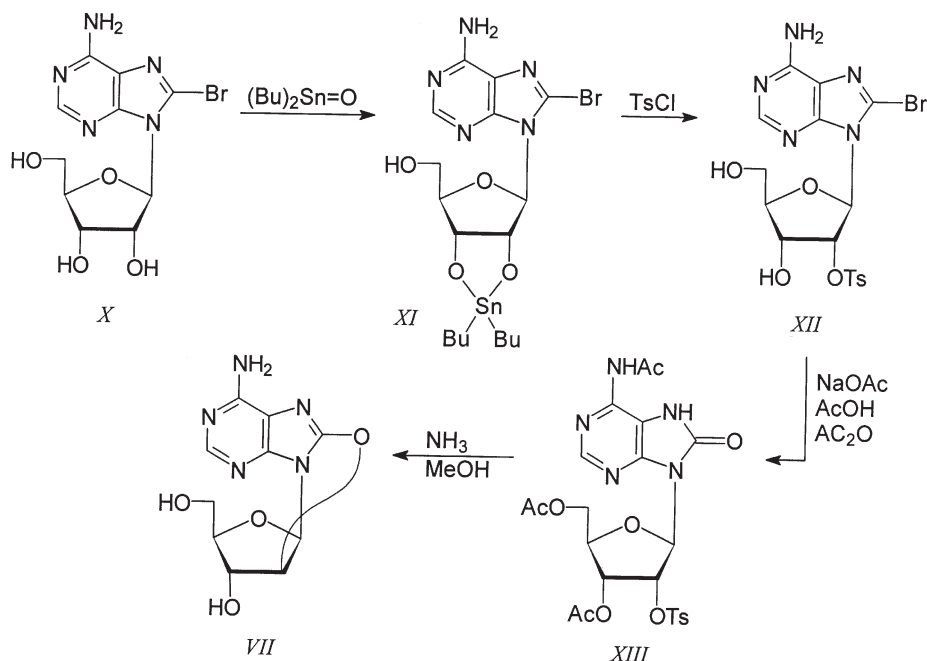


Schéma 3

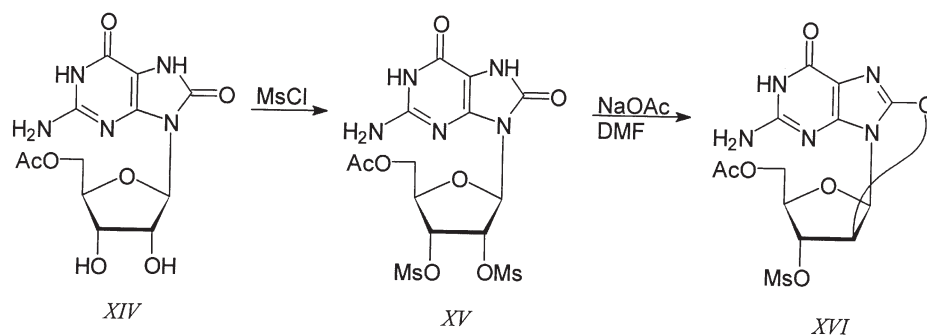


Schéma 4

-karbonát)^{39,40}. 8-Bromadenosin (*X*) (popř. 8-bromguanosin) může být tosylován na 2'-hydroxyly přes 2',3'-*O*-dibutylcín derivát *XI* (schéma 3) (cit.⁴¹). Následná cyklizace derivátu *XIII* na cyklo nukleosid *VII* probíhá působením báze (např. hydroxidem sodným, amoniakem). Stejně lze tosylovat i 8-bromderivát 5'-deoxyadenosinu na směs 2'-tosyl- a 3'-tosylderivátu⁴².

Při reakci 8-brom-9-(2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-arabinofuranosyl)adeninu s poměrně bazickým nukleofilem, jako je methoxid sodný a amoniak, dochází k intramolekulární výměně bromu za vzniku 8,2'-anhydro-8-hydroxy-9-(β -D-arabinofuranosyl)adeninu⁴³. Je-li k reakci použito méně bazických nukleofilů, např. thio-močoviny nebo azidu sodného, dojde k přímé výměně bromu za nukleofil za vzniku 8-thio- popř. 8-azidoderivátu. V případě 8-brom-9-(2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-xylofuranosyl)adeninu dojde k přímé substituci atomu bromu příslušným nukleofilem (neutrálním i bazickým) aniž by došlo k intramolekulární reakci za vzniku 8,3'-cyklo nukleosidu.

Syntéza prvního *O*-cyklo nukleosidu guanosinu byla popsána v roce 1967 Ikeharou⁴⁴. Z 9-(5-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-8-hydroxyguaninu (*XIV*) byl připraven 2',3'-di-*O*-mesylderivát *XV*, který zahříváním na 100 °C v DMF s octanem

sodným poskytl derivát 8,2'-*O*-cykloguanosinu *XVI* (schéma 4). Z toho lze usuzovat, že 2'-*O*-mesylskupina podléhá cyklizaci snadněji než ta v poloze C-3'. Při pokusu získat tímto postupem derivát 8,5'-cykloguanosinu byl zahříváním 8-hydroxy-2',3'-*O*-isopropyliden-5'-*O*-mesylguanosu získán *N*³,5'-cyklo nukleosid.

Jednoduchým způsobem přípravy 8,5'-*O*-cykloadenosinu (*I*) je cyklizace bromderivátu *XVII* hydridem sodným v bezvodém dioxanu^{45,46} nebo kyanidem draselným v DMF (cit.⁴⁷) a následně deblokování cukerné části 1 M vodným roztokem kyseliny sírové (schéma 5). Stejně lze cyklizovat 8-brom-2',3'-*O*-isopropylideninosin a 8-brom-2',3'-*O*-isopropylidenguanosin⁴⁸. Pokus o cyklizaci nechráněného 8-bromadenosinu (*X*) stejným způsobem však nebyl úspěšný⁴⁹.

V roce 1992 byla japonskými autory popsána elegantní metoda přípravy derivátu 8,5'-*O*-cykloadenosinu *XVIII* oxidativní cyklizací 2',3'-*O*-isopropylidenadenosinu (*II*) s octanem olovičitým (schéma 5) (cit.⁵⁰). Kromě octanu olovičitého⁵¹ mohou být k cyklizaci použita další oxidační činidla, jako chlorid měďnatý⁵², *N*-halogensukcinimid⁵³ nebo ozařování 400 W vysokotlakou rtuťovou lampou (> 355 nm) v přítomnosti pyrimido[5,4-*g*]pteridintetraon *N*-oxidu^{54,55}. Tato intra-

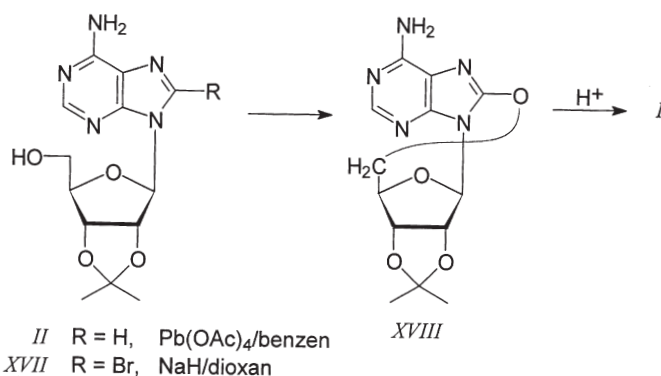


Schéma 5

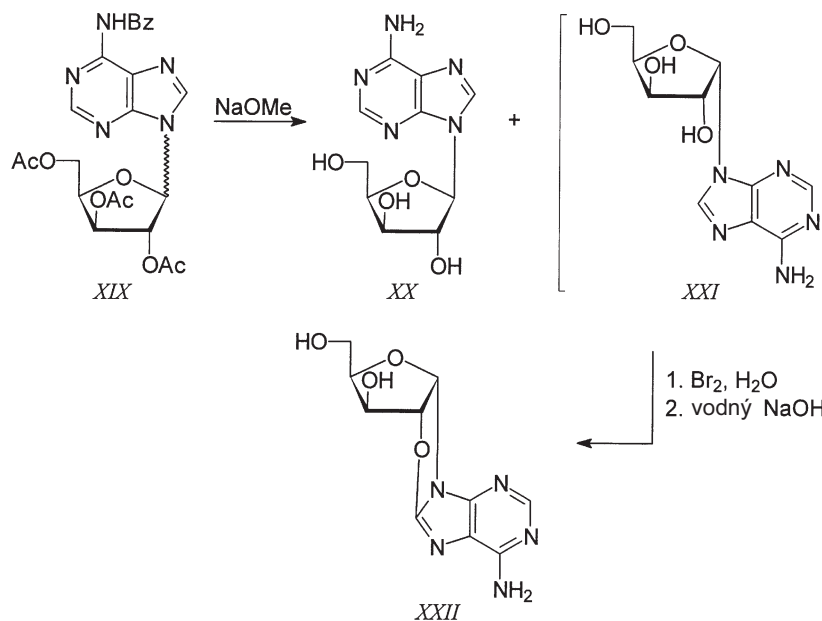


Schéma 6

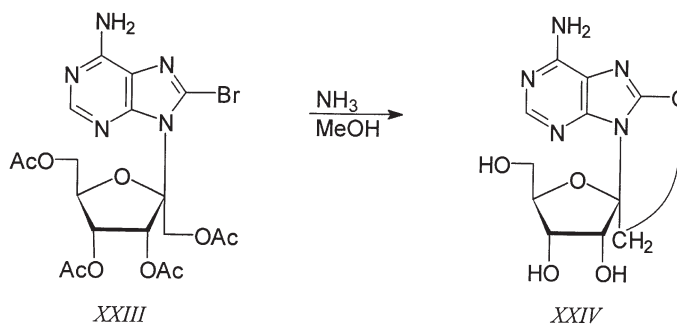


Schéma 7

molekulární reakce poskytuje novou metodu pro chemickou modifikaci derivátů adenosinu.

Pro hladkou konverzi 2',3'-*O*-isopropylidenadenosinu (*II*) na derivát cykloadenosinu *XVIII* je potřeba použít 1,2 ekvivalentu octanu olovičitého. Výtěžek reakce provedené v refluxujícím suchém benzenu pod argonem byl 93 %. Nechráněný adenosin za stejných podmínek neposkytl cyklický produkt. Dále je zřejmý vliv *N*⁶-substituentu na průběh reakce. Snadnost oxidativní cyklizace klesá v řadě 2',3'-*O*-isopropyliden-derivátů *N*⁶-benzoyladenosinu, adenosinu, *N*⁶-methyladenosi-

nu a *N*⁶,*N*⁶-dimethyladenosinu. Výrazný substituční efekt *N*⁶-benzoylskupiny je vysvětlován zvýšením nukleofility dusíku *N*⁷ v imidazolovém kruhu a tím jeho větší koordinační schopnosti vůči olovičitému iontu, jehož koordinace v *N*⁷-poloze je prvním krokem oxidativní cyklizace.

V roce 1968 byla popsána syntéza α -cyklonukleosidu 8,2'-anhydro-8-hydroxy-9-(α -D-xylofuranosyl)adeninu (*XXII*) (cit.⁵⁶), vycházející z 9-(α -D-xylofuranosyl)adeninu (*XXI*), bromací a cyklizací pomocí hydridu sodného (schéma 6) (cit.⁵⁷).

Přes odpovídající 8-bromderivát *XXIII* byl připraven 8,1'-

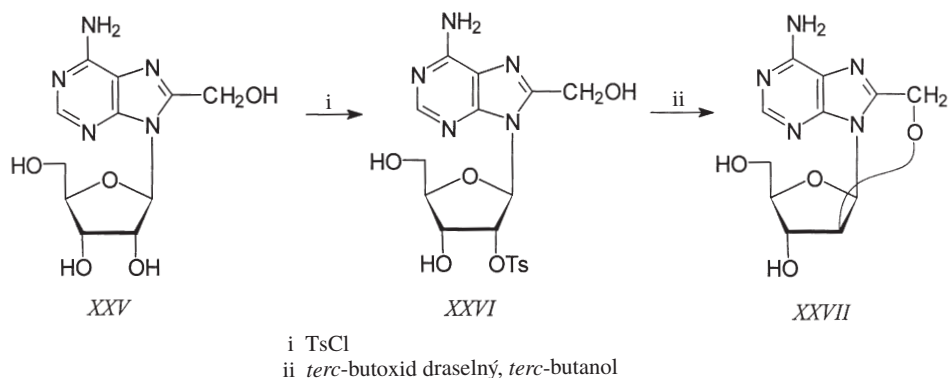


Schéma 8

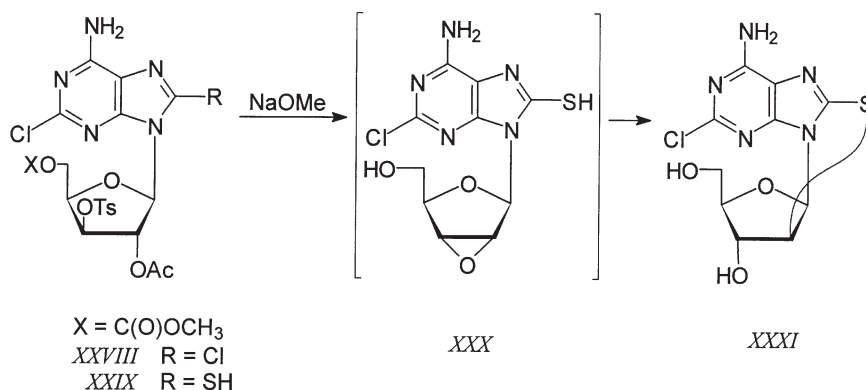


Schéma 9

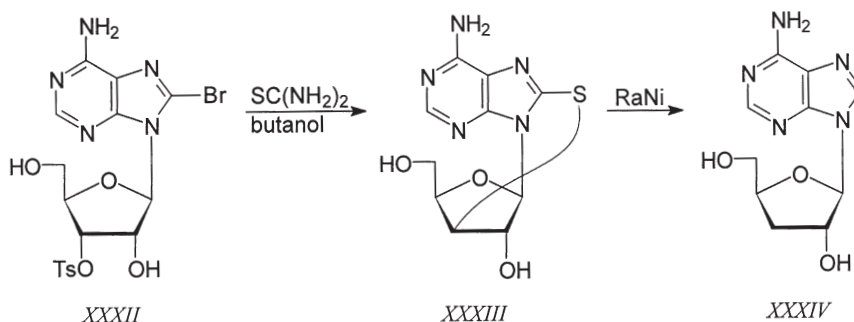


Schéma 10

-anhydro-8-hydroxy-9-(2- β -D-psik ofuranosyl)adenin (XXIV), což je v podstatě typ 8,1'-cyklonukleosidu (schéma 7) (cit.⁵⁸).

O-Cyklonukleosidy odvozené od hypoxanthinu a 6-merkaptopurinu lze kromě derivatizace odpovídajících cykloadenosinů připravit cyklizací příslušných 2'- nebo 3'-TPS-derivátů (2,4,6-triisopropylbenzensulfonylderivátů) 8-hydroxynukleosidů v přítomnosti báze⁵⁹.

Reakcí 8-hydroxymethyl derivátu XXVI s *tert*-butoxidem draselným ve směsi *tert*-butanolu a DMF byl připraven 8,2'-anhydro-9-(β -D-arabinofuranosyl)-8-hydroxymethyladenin (XXVII, schéma 8) (cit.⁶⁰).

V poslední době byly připraveny anhydroderiváty odvozené od karbocyklických analogů purinových a pyrimidinových nukleosidů⁶¹. Dále byly připraveny cyklonukleosidy, u nichž je pyrimidinový kruh purinového skeletu nahrazen substituo- vaným benzenovým jádrem⁶².

3. Purinové *S*-cyklonukleosidy

S-cyklonukleosidy purinových bází jsou významnými pre- kursory v syntéze nukleosidových analogů a především deoxy- nukleosidů desulfurací Raneyovým niklem.

První cyklonukleosid tohoto typu byl připraven v roce 1963, a to také (jako v př. prvního *O*-cyklonukleosidu) v Ja- ponsku⁶³. Kondenzace báze a cukru Davollovou metodou⁶⁴ poskytla derivát XXVIII, který byl převeden na 8-thioderivát XXIX reakcí s thiomocovinou v *n*-butanolu (schéma 9). 8,2'- -Anhydro-9-(β -D-arabinofuranosyl)-2-chlor-8-merkptoadenin (XXXI) byl připraven z thioderivátu XXIX za refluxu v me- thanolu v přítomnosti methoxidu sodného. Desulfurace 8,2'- -*S*-cyklonukleosidu XXXI Raneyovým niklem a následná hy- drogenace nad palladiem na uhlí poskytla 2'-deoxyadenosin⁶⁵.

Tosylací 5'-*O*-acetyl-8-bromadenosinu byly po deacetyla-

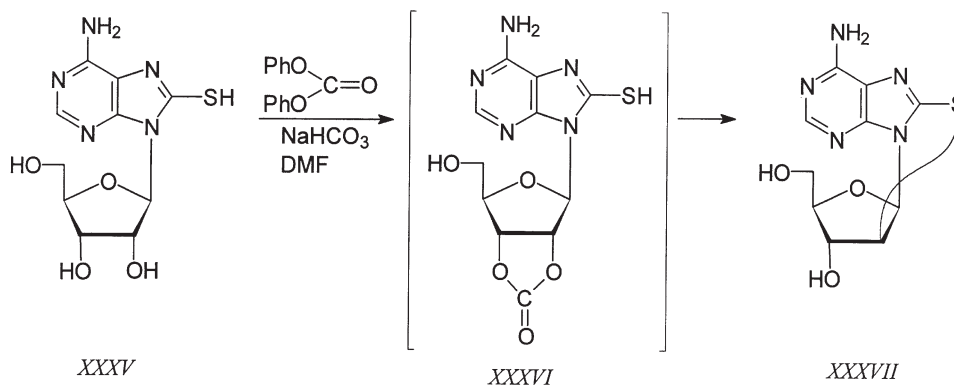


Schéma 11

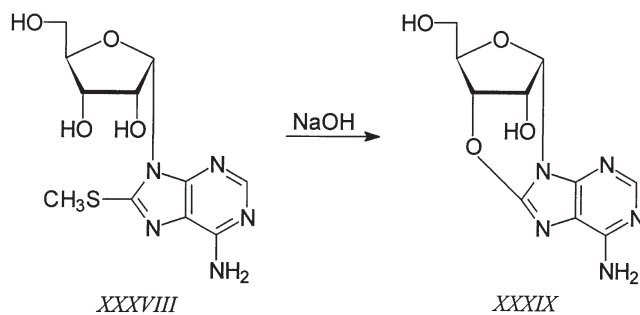


Schéma 12

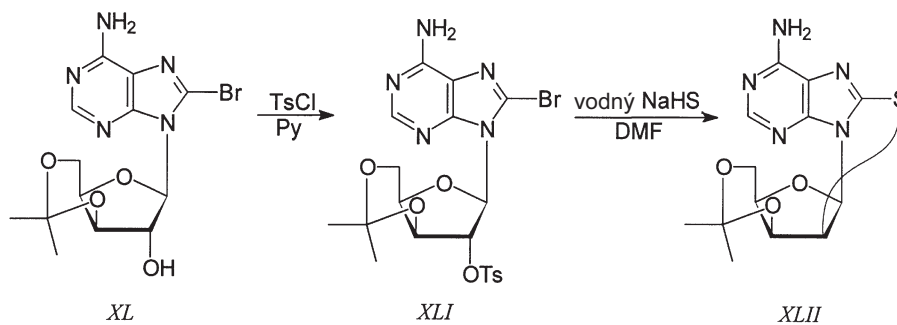


Schéma 13

ci a dělení získány 2'-*O*-tosyl-, 3'-*O*-tosyl- a 2',3'-di-*O*-tosyl-derivát 8-bromadenosinu⁶⁶. Reakce 3'-*O*-tosyl-derivátu XXXIII s thiočovinou v butanolu (popř. s hydrogensulfidem sodným v DMF (cit.⁶⁷)) poskytla derivát XXXIII a následná desulfurace 3'-deoxyadenosin (Kordycepin, XXXIV, schéma 10), v případě 2'-*O*-tosyl- a 2',3'-di-*O*-tosyl-derivátu byl získán 2'-deoxyadenosin. Vyjde-li se z derivátu 5'-deoxyadenosinu, lze takto připravit 2',5'-dideoxyadenosin a 3',5'-dideoxyadenosin⁴². Jako dobře odstupující skupinu lze také použít 2,4,6-triisopropylbenzensulfonyl (TPS)⁶⁸. Ta byla použita i v případě cyklizací *N*⁶-dimethyl-derivátů adenosinu³⁶.

K syntéze *S*-cyklonukleosidů lze použít také cyklické 2',3'-karbonáty. 8-Merkaptoadenosin (XXXV) poskytne zahříváním s difenylkarbonátem a hydrogenuhličitanem sodným v DMF 8,2'-*S*-cykloadenosin (XXXVII, schéma 11) (cit.³⁹), nebo lze nejprve připravit cyklický 2',3'-karbonát 8-bromadenosinu a ten následně cyklizovat thiočovinou v butanolu⁶⁹. Stejně lze postupovat i v případě 2',3'-*O*-sulfinyl-derivátů 8-bromadenosinu⁷⁰.

Difenylkarbonát, jako cyklizační činidlo, byl použit k cy-

klizaci dalších nukleosidů, obsahujících jako purinovou bázi 8-merkaptoguanin, 6,8-dimerkaptopurin, 2-amino-6,8-dimerkaptopurin, 8-merkaptoxanthin a 8-merkaptopyoxanthin⁷¹⁻⁷³.

8-Methylthio-derivát α -ribosidu XXXVIII poskytl působením methoxidu sodného nebo hydroxidu sodného 8,3'-cyklonukleosid XXXIX za odštěpení methanthiolu (schéma 12). Příslušné β -ribosidy za totožných podmínek cyklonukleosidy netvoří⁷⁴.

Bromací a následným chráněním 9-(β -D-xylofuranosyl)-adeninu byl připraven 3',5'-*O*-isopropylidenderivát XL, který po tosylovaní poskytl reakcí s hydrogensulfidem sodným 8,2'-anhydro-9-(3,5-*O*-isopropylideno- β -D-xylofuranosyl)-8-merkaptadenin (XLII, schéma 13) (cit.⁵⁷).

Adenosin 5'-monofosfát (AMP) a jeho 8-bromderivát XLIII jsou v alkalickém prostředí přednostně tosylovány do 2' polohy^{75,76}. V případě bromderivátu XLIII lze tosylování a následnou reakcí se sirovdítkem v pyridinu, popř. s hydrogensulfidem sodným ve směsi voda-DMF připravit 8,2'-*S*-cyklonukleotid XLV, po jehož desulfuraci se získá 2'-deoxyadenosin 5'-monofosfát (XLVI, schéma 14).

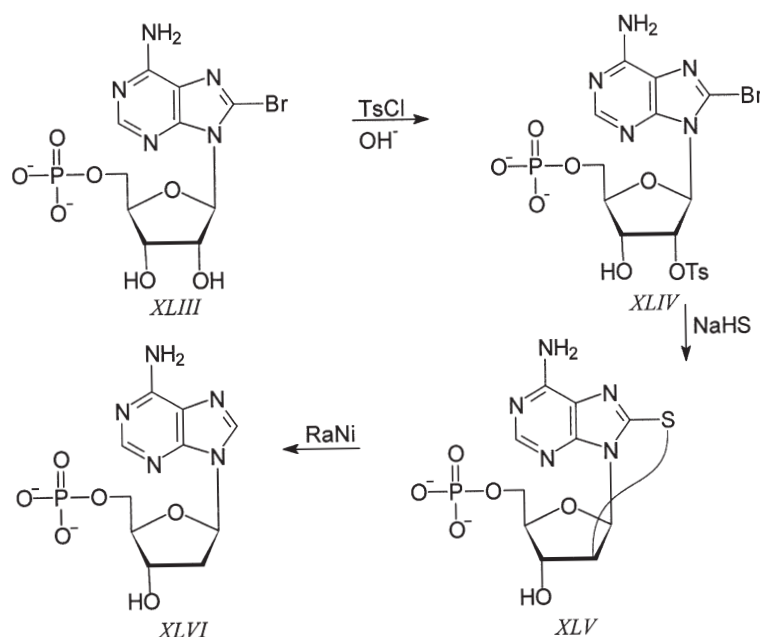


Schéma 14

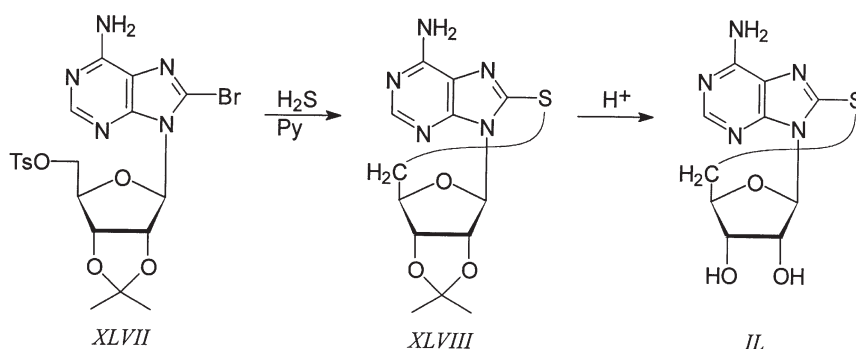


Schéma 15

Podobným způsobem byl připraven 5'-deoxyguanosin²⁷. 8-Bromguanosin byl mesylchloridem v pyridinu převeden na 2',5'-di-*O*-mesylderivát, ten reakcí s thiomocovinou poskytl 8,5'-*S*-cyklonukleosid, který po desulfuraci Raneyovým niklem a po alkalickém štěpení 2'-mesylové skupiny dal 5'-deoxyguanosin. Vhodnější výchozí látkou pro cyklizaci se jeví 8-brom-2',3'-*O*-isopropylidenguanosin⁷⁷.

Z 8-brom-9-(2-mesitylsulfonyl- β -D-ribofuranosyl)guaninu lze reakcí s hydrogensulfidem sodným připravit příslušný 8,2'-*S*-cyklonukleosid a jeho následnou desulfurací 2'-deoxyguanosin⁷⁸.

Pro přípravu 8,5'-*S*-cykloadenosinu (*IL*) byl jako výchozí látka připraven 8-bromderivát *XLVII* (schéma 15) (cit.⁷⁹). Ten byl rozpuštěn v pyridinu a sirovodík byl probubláván tímto roztokem za laboratorní teploty. Získaný cyklonukleosid *XLVIII* poskytl zahříváním v 98 % kyselině mravenčí 8,5'-*S*-cykloadenosin (*IL*), jehož desulfurací byl připraven 5'-deoxyadenosin. K cyklizaci lze použít také směs pyridinu a vodného roztoku hydrogensulfidu sodného za chlazení⁸⁰. Také lze nejprve reakcí brom derivátu *XVII* s hydrogensulfidem sodným v ethanolu připravit 8-merkaptoderivát, který následně za podmínek tosylování poskytne příslušný cyklický derivát *XLVIII* (cit.⁸¹).

8,5'-*S*-Cyklonukleosidy je možno také připravit tak, že se nejprve vytvoří 8,5'-*S*-anhydro vazba reakcí 8-merkptoadenosinu (*L*), resp. jeho sodné nebo draselné soli s vhodně chráněným cukrem (např. derivát *LI*), a teprve pak se vytvoří *N*⁹-glykosidická vazba^{82,83}. Takto byl připraven i cyklonukleosid *LIV* (schéma 16). Tímto postupem se zamezí vzniku *N*³,5'-cyklických derivátů adeninu, které se jinak tvoří poměrně snadno^{9,44,84,85}.

Obecně může být hydroxylová skupina nahrazena širokou řadou nukleofilů za podmínek reakce dle Mitsunobu⁸⁶. 8,5'-Anhydro-9-(2,3-*O*-isopropyliden- β -D-ribofuranosyl)-8-merkptoadenosin (*XLVIII*, 68 %) byl připraven přikapáním 1 ekvivalentu trifenylofosfinu a diethylazodicarboxylátu (DEAD) v suchém DMF k roztoku 8-merkptoderivátu *LV* v DMF (schéma 17) (cit.⁸⁷). Jelikož aminy za těchto podmínek tvoří *N*-fosfinosfa- λ^5 -azeny (cit.⁸⁸), reaguje vzniklý cyklonukleosid následně s přebytkem trifenylofosfinu na *N*-[8,5'-anhydro-2',3'-*O*-isopropyliden-8-merkptopurin-6-yl]trifenylofosfa- λ^5 -azen (*LVI*). Ten vzniká ve vysokém výtěžku (87 %), použijí-li se 2 ekvivalenty trifenylofosfinu a diethylazodicarboxylátu.

8,2'-*S*-Cykloadenosin (*XXXVII*) lze připravit reakcí 3',5'-*O*-(tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)derivátu *LVII* s trifenylofosfinem a diethylazodicarboxylátem (DEAD) v THF za pod-

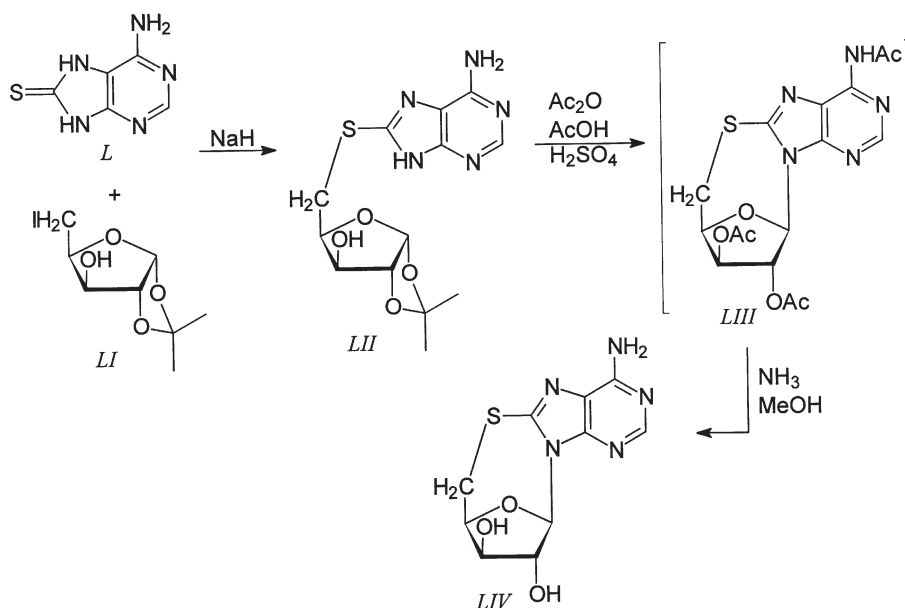
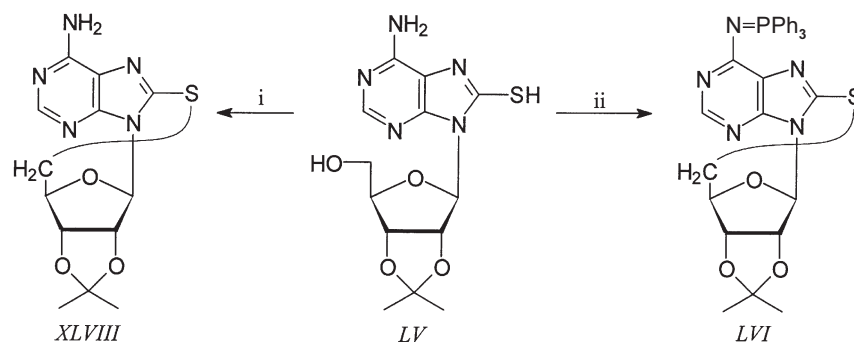


Schéma 16



i DEAD a PPh₃ (1 ekvivalent), DMF
ii DEAD a PPh₃ (2 ekvivalent), DMF

Schéma 17

mínek dle Mitsunoba⁸⁹ a následným odchráněním tetrabutylammonium fluoridem (TBAF) (schéma 18) (cit.⁸⁹).

4. Purinové *Se*-cyklonukleosidy

Chemie purinů substituovaných v poloze 8 atomem selenu není příliš bohatá. Přes analogické prvky chemie síry a selenu je třeba se sloučeninami obsahujícími selen zacházet velmi opatrně z důvodu jejich značné toxicity. Jako první cyklonukleosid obsahující atom selenu byl připraven 2,2'-cyklo-2-selenocytidin⁹⁰.

8-Selenoadenosin (*LIX*) může být připraven reakcí 8-bromderivátu *X* s diselenidem sodným Na₂Se₂ v ethanolu v přítomnosti ethoxidu sodného⁹¹ nebo se selenomocovinou v absolutním ethanolu (schéma 19) (cit.⁹²). 8-Selenoadenosin (*LIX*) reakcí s 2-acetoxyisobutyrylchloridem v acetonitrilu za laboratorní teploty a následnou reakcí s methanolickým roztokem chlorovodíku poskytl 8,2'-*Se*-cykloadenosin (*LX*) v 54 % výťažku⁹².

5. Reakce purinových nukleosidů

Jak již z výše uvedeného částečně vyplynulo, cyklonukleosidy mohou být výhodně použity jako meziproducty k přípravě různě modifikovaných derivátů nukleosidů a nukleotidů, např. transformace ribonukleosidů na deoxynukleosidy nebo arabinonukleosidy atd.

S-Cyklonukleosidy mohou být snadno desulfurovány použitím Raneyova niklu na odpovídající deoxynukleosidy⁹³. Na základě těchto pozorování byl vysloven i předpoklad o možné transformaci ribonukleosidů na příslušné deoxyderiváty v živých buňkách⁹⁴.

Desulfurace tedy poskytuje alternativní syntézu přírodního antibiotika Kordycepinu (3'-deoxyadenosinu, *XXXIV*) (cit.^{68,95,96}), připraveného několika jinými postupy⁹⁷⁻¹⁰⁰.

Použije-li se jako výchozí látka 2'-deoxyadenosin, lze připravit 8,3'-*S*-cykloderivát, který po desulfuraci poskytne 2',3'-dideoxyadenosin²⁸. Reakce lze provádět i s adenosin-5'-monofosfátem⁷⁵.

Purinové *S*-cyklonukleosidy jsou stále vůči mírně kyselým

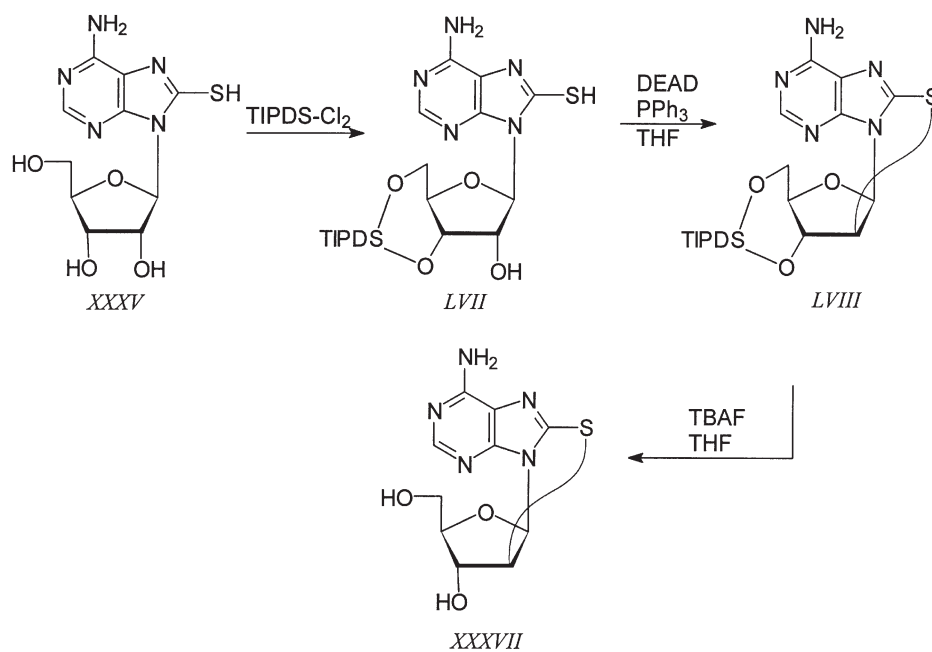


Schéma 18

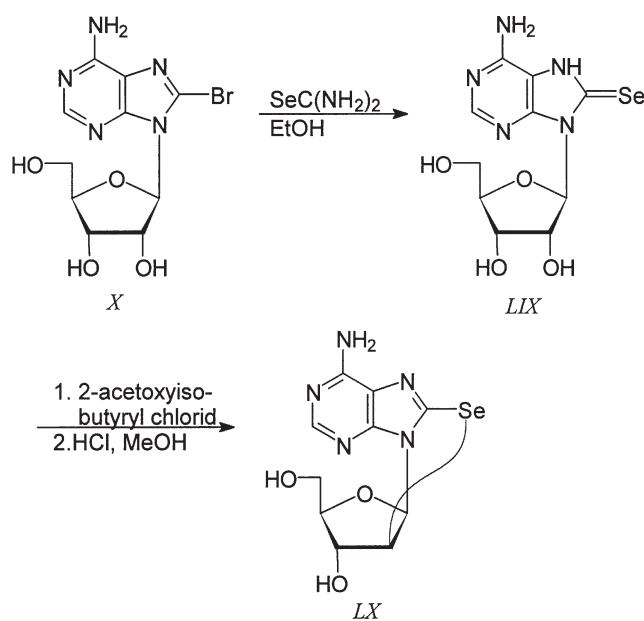


Schéma 19

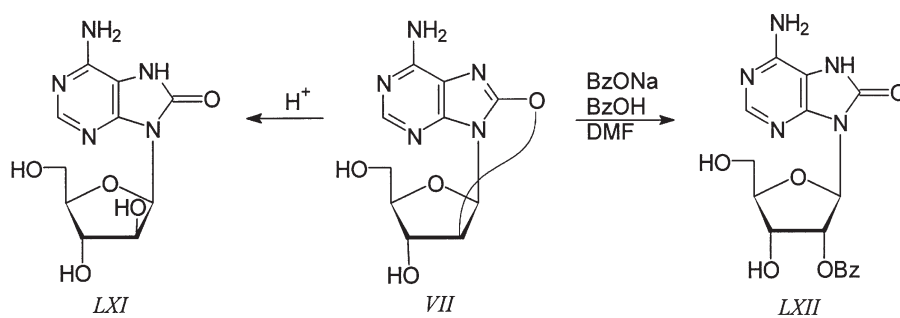


Schéma 20

i bazické hydrolyze^{65,96,101}, kdežto silná kyselá nebo bazická hydrolyza vede ke štěpení jak *S*-anhydro vazby, tak i glykosidické

vazby, popř. i k destrukci purinového kruhu. Naproti tomu ke štěpení *O*-anhydro vazby purinových nukleosidů

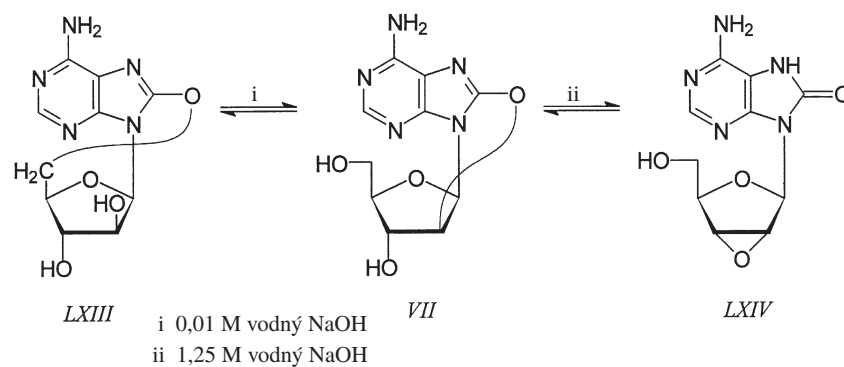


Schéma 21

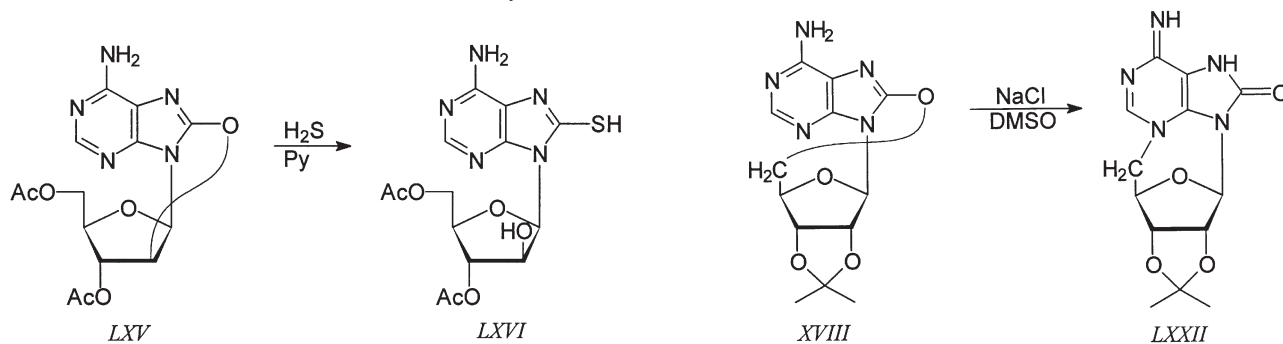


Schéma 22

Schéma 24

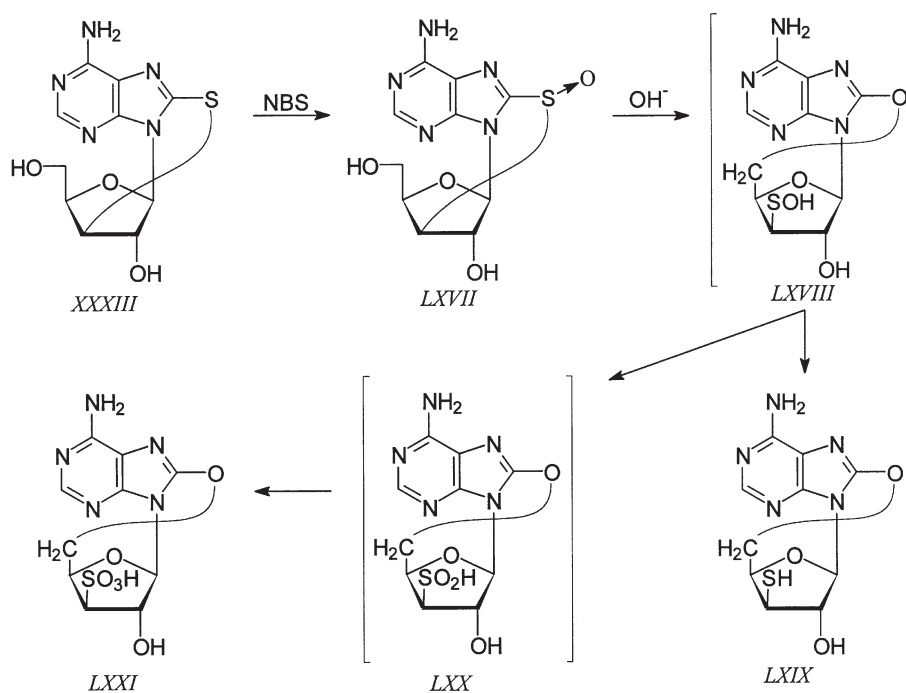


Schéma 23

dochází snadno za mírných podmínek^{17,22,25,27}. Např. kyselá hydrolyza 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadeninu (*VII*) poskytne 8-hydroxyderivát arabinofuranosyladeninu *LXI*, reakcí s benzoátem sodným v DMF se získá derivát 8-hydroxyadenosinu (*LXII*, schéma 20). Tedy kyselá katalyzovaná reakce zachovává konfiguraci na C-2' uhlíku,

atakem benzoátovým aniontem dochází k inverzi konfigurace.

V případě *S*- a *N*-cyklonukleosidů dochází při kyselá hydrolyze převážně ke štěpení *N*-glykosidické vazby, zatímco u *O*-cyklonukleosidů jsou štěpení *N*-glykosidické vazby a 5',8'-anhydro vazby reakcemi konkurenčními¹⁰².

Zahříváním 8,2'- (*VII*) nebo 8,5'-anhydro-9-(β-D-arabino-

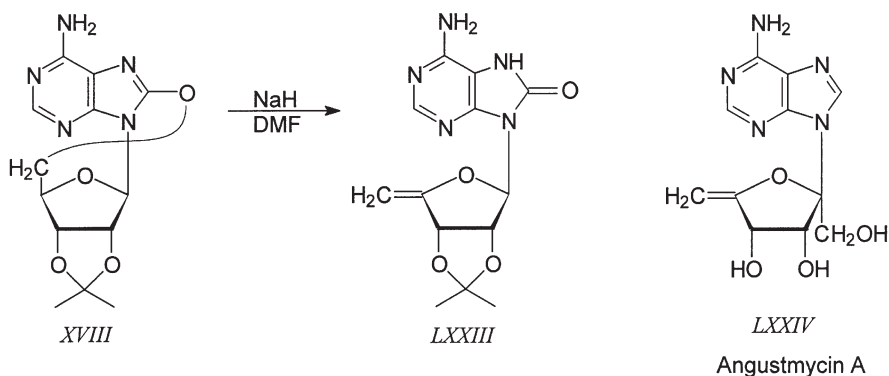


Schéma 25

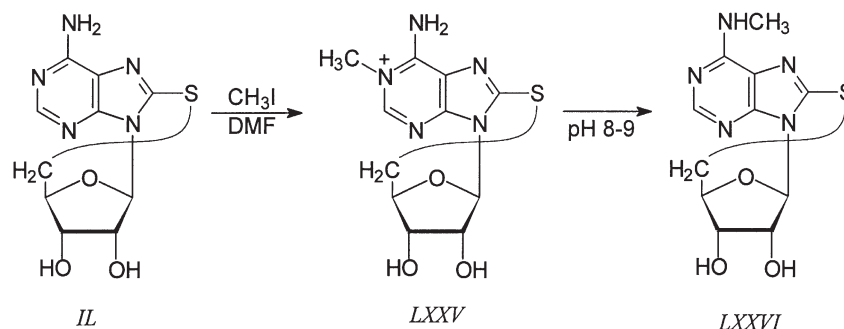


Schéma 26

furanosyl)-8-hydroxyadeninu (*LXIII*) ve vodném 0,01 M roztoku hydroxidu sodného dochází k vytvoření rovnovážné směsi obou, tj. směsi 8,2'- a 8,5'-cyklonukleosidů (*VII:LXIII*, 3:2, schéma 21) (cit.¹⁰³). 8,2'-Cykloadenosin (*VII*) působením 1,25 M roztoku hydroxidu sodného ve směsi DMSO a voda poskytuje 2',3'-anhydroderivát *LXIV* (cit.¹⁰⁴). Za mírně alkalických podmínek lze opět získat výchozí 8,2'-cykloadenosin (*VII*).

Při zahřívání ochráněného 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadeninu *LXV* v pyridinu s přebytkem sirovoříku byl připraven 8-merkaptoderivát arabinofuranosyladeninu *LXVI* (schéma 22) (cit.¹⁰⁵), při jeho zahřívání v směsi pyridinu a kapalného amoniaku v autoklávu vzniká směs 8-amino-9-(β-D-arabinofuranosyl)adeninu a 8,5'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadeninu^{106,107}. 8,2'- a 8,3'-*O*-Cyklonukleosidy adeninu mohou být tosylovány na 5'-hydroxyly a tyto tosylderiváty poskytnou zahříváním s hydrogensulfidem sodným v DMF příslušné 8,5'-*S*-cyklonukleosidy¹⁰⁸.

Je-li 8,2'-*O*-cykloadenosin zahříván s různými aminy popř. s hydrazinem, poskytne příslušné 8-amino, popř. 8-hydrazino deriváty 9-(β-D-arabinofuranosyl)adeninu^{38,109}.

Byla také popsána přeměna *S*- na *O*-cyklonukleosid, konkrétně 8,3'-anhydro-8-merkapt-9-(β-D-xylofuranosyl)adeninu (*XXXIII*) na 8,5'-*O*-cyklonukleosidy *LXIX* a *LXXI* přes sulfoxidový meziprodukt *LXVII* (schéma 23) (cit.¹¹⁰). Oxidace cyklonukleosidů na cyklické 8-sulfoxidy se provádí *N*-bromsukcinimidem nebo kyselinou peroxymravenčí¹¹¹. Štěpení *S*-anhydro vazby cyklonukleosidu může také probíhat přes sulfoniový meziprodukt¹¹².

Při zahřívání ochráněného 8,5'-*O*-cykloadenosinu *XVIII* s chloridem sodným v DMSO na 130–140 °C pod dusíkem dojde k přesmyku na *N*³,5'-cyklonukleosid *LXXII* (schéma 24) (cit.⁸⁵).

Reakce 8,5'-anhydro-8-hydroxy-9-(2,3-*O*-isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)adeninu (*XVIII*) s přebytkem hydridu sodného v DMF poskytne sloučeninu *LXXIII* (schéma 25), která obsahuje exocyklickou dvojnou vazbu²². Tato sloučenina se strukturně podobá antibiotiku angustmycinu A (decoyinin, *LXXIV*) (cit.^{113,114}).

Podobně jako byly při tvorbě internukleotidové vazby použity pyrimidinové cyklonukleosidy¹¹⁵⁻¹¹⁹, bylo v roce 1968 popsáno využití derivátu 8,5'-cyklonukleosidu k přípravě dinukleosidfosfátu⁴⁶. Dochází k ataku nukleosidfosfátového aniontu na uhlík C-5' cyklonukleosidu. Tak byl za refluxu 2',3'-*O*-isopropylidenderivátu 8,5'-*O*-cykloadenosinu s tri-*n*-butylammonium-3'-uridylytem v DMF připraven uridyl-(3'-5')-8-hydroxy-2',3'-*O*-isopropylidenaadenosin.

Metoda pro fosforylaci přirozených ribonukleosidů, vyvinutá v roce 1969 Yoshikawou¹²⁰, byla využita k syntéze 5'-mono a 5'-difosfátů 8,2'-*S*-cyklonukleosidů použitých pro enzymové studie¹²¹. Chemickou fosforylací byly dále připraveny 5'-monofosfáty 8,2'- a 8,3'-*O*-cyklonukleosidů, taktéž použité ke studiu substrátové specifity některých enzymů^{122,123}.

6. Transformace purinové báze v cyklonukleosidech

Reakcí 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxy-6-merkaptopurinu s methyljodidem lze připravit příslušný cyklonukleosid 6-methylmerkaptopurinu a ten desulfurací Raneyovým niklem převést na cyklonukleosid purinu⁵⁹.

Cyklonukleosidy a jejich deriváty mohou být kromě přímé cyklizace připraveny také deaminací příslušných cykloadenosinů kyselinou dusitou v 80 % kyselině octové při 40 °C

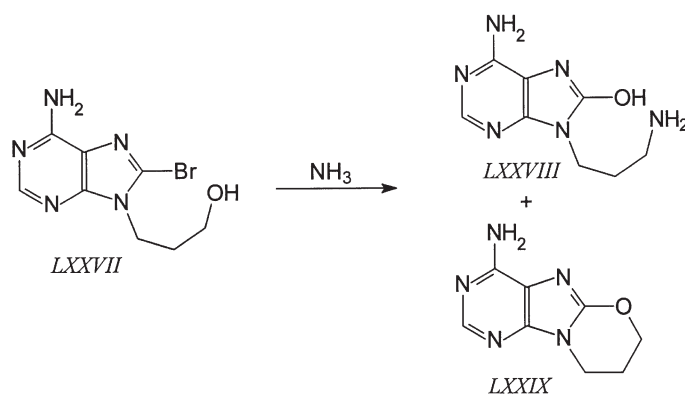


Schéma 27

(cit.^{46,59}). Podobně byly deaminací 8,2'-anhydro-9-(β-D-arybinofuranosyl)-8-merkptoadenin, 8,3'-anhydro-8-merkptoadenin a 8,5'-anhydro-8-merkptoadenin s dusitanem barnatým v kyselině octové získány odpovídající *S*-cykloinosiny. Ty byly dále transformovány na příslušné 8-*S*-cyklonukleosidy 6-merkptopurinribosidu pomocí sulfidu fosforečného v pyridinu¹²⁴, popř. na *S*-cyklonukleosidy odvozené od nebularinu [9-(β-D-ribofuranosyl)purinu] buď cestou zahrnující katalytickou redukci 6-chlorderivátů, nebo oxidativní desulfuraci 6-thioderivátů¹²⁵.

K modifikaci cyklonukleosidů lze využít i Dimrothova přesmyku¹²⁶. 8,5'-*S*-Cykloadenosin (*IL*) byl nejdříve methylován do polohy *N*¹ adeninu přebytkem methyljodidu v DMF za laboratorní teploty a získaný methylderivát *LXXV* za podmínek Dimrothova přesmyku (vodný roztok o pH 8–9) poskytl *N*⁶-methylderivát 8,5'-*S*-cykloadenosinu *LXXVI* (schéma 26) (cit.¹⁰¹).

Oxidací 8,2'-, 8,3'- a 8,5'-*S*-cykloadenosinu kyselinou monoperoxyftalovou byly připraveny příslušné *N*¹-oxidy cykloadenosinu¹²⁷.

7. Fyzikální vlastnosti purinových cyklonukleosidů

Byly studovány chiroptické vlastnosti cyklonukleosidů¹²⁸⁻¹³⁰. U β-cyklonukleosidů odvozených od adeninu vzrůstá hodnota rotační síly v řadě 8,2' < 8,3' < 8,5' - jak u *O*-cyklonukleosidů, tak i u jejich *S*-analogů¹³¹. Všechny tyto látky vykazují v absorpčním maximu pozitivní Cottonův efekt. U α-cyklonukleosidů platí totéž, pokud jde o hodnoty rotační síly, ale Cottonův efekt je negativní.

8,5'-Anhydro-9-(2,3-*O*-isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)-8-merkptoadenin (*XLVIII*) byl krystalován ze směsi butanol–voda a poskytl bezbarvé jehlicovité krystaly, hexagonální, patřící do *P*₆ prostorové grupy¹³². Atom síry je lokalizován na protilehlé straně atomu kyslíku furanosy (na straně 2'- a 3'-vodíkových atomů). Tento *S*-cykloadenosin má také fixovanou *anti* konformaci a torzní úhel cukr – báze je kolem 60°.

Hmotová spektra purinových 8-cyklonukleosidů jsou charakteristická nejen přítomností intenzivního píku molekulového iontu, ale také píků odpovídajících 8-hydroxy- popř. 8-merkptoadenin a jejich protonovaných forem¹³³.

8. Acyklické analogy purinových cyklonukleosidů a cyklonukleotidů

Analogy nukleosidů, které mají cukerný zbytek nahrazen řetězcem nesoucím hydroxylové funkce, tzv. acyklické analogy nukleosidů, přitahují velký zájem proto, že se v této skupině vyskytují sloučeniny s vysokým biologickým účinkem, např. virostatika acyclovir (Zovirax)^{134,135} nebo ganciclovir (Cytovene)¹³⁶. Pro svůj protivirotický účinek i další efekty na proliferujících systémech byl studován další ze skupiny acyklických analogů, 9-(*S*)-(2,3-dihydroxypropyl)adenin (DHPA) (cit.¹³⁷).

Většina nukleofilních reakcí v imidazolovém kruhu adeninové báze substituované bromem v poloze C-8 provedených u derivátů s blokovanými hydroxylovými funkcemi probíhá stejně jako u nukleosidů, tj. se vznikem sloučenin substituovaných v poloze C-8 příslušným nukleofilem. Tak probíhají i reakce s amoniakem za vzniku 8-aminoderivátu. Ukázalo se však, že u látek s volnými hydroxy skupinami má tato reakce anomální průběh. Reakce s amoniakem nebo primárním aminem probíhá za vzniku 8-hydroxyadeninového derivátu nesoucího amino (popř. substituovanou amino) skupinu na postranním řetězci^{138,139}. Tato reakce je spojena se vznikem acyklického analogu nukleosidu, který se otevře nukleofilním útokem ze strany acyklického řetězce a poskytne 8-hydroxyderivát s nukleofilní skupinou na postranním řetězci. Tak byla např. amonolýzou 9-(3-hydroxypropyl)-8-bromadeninu (*LXXVII*) získána směs 8-hydroxyderivátu *LXXVIII* a cyklického derivátu *LXXXIX* (schéma 27) (cit.¹³⁹).

Jako model pro intramolekulární cyklizaci acyklických analogů cyklonukleosidů byla zvolena skupina 9-(2,3,4-trihydroxybutyl)derivátů 8-bromadeninu *LXXXI* (schéma 28), specificky blokovaných v polohách 2 a 3 postranního řetězce tvorbou 1,3-dioxolanu (isopropylidenderivátu). K cyklizacím byla použita různá činidla, jako vodný amoniak, *tert*-butoxid draselný, hydrid sodný a 1,8-diazabicyklo(5,4,0)undec-7-en (DBU) (cit.¹⁴⁰). Podobně jako u nukleosidů lze také přímo cyklizovat 9-(2,3,4-trihydroxybutyl)adeniny *LXXX* pomocí octanu olovičitého v benzenu nebo toluenu⁵⁰. Byly studovány chiroptické vlastnosti všech čtyř opticky aktivních stereoizomerů *LXXXII*.

Pro své farmakochemické účinky byla studována skupina acyklických analogů *S*-cyklonukleosidů, kde atom síry je do polohy 8 purinové báze vázán přes alkylový můstek¹⁴¹.

Bylo připraveno množství derivátů, u nichž je *N*⁹-poloha (popř. *N*⁷) purinové báze spojena s atomem kyslíku, síry nebo

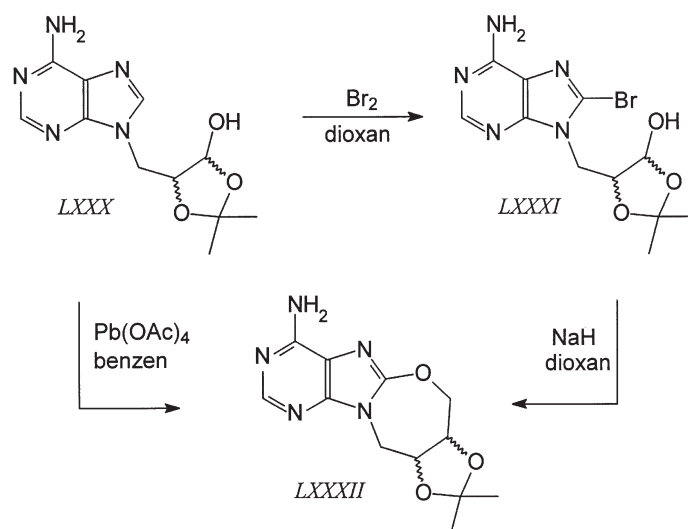


Schéma 28

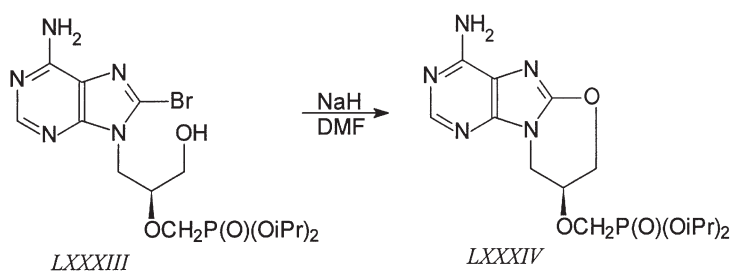


Schéma 29

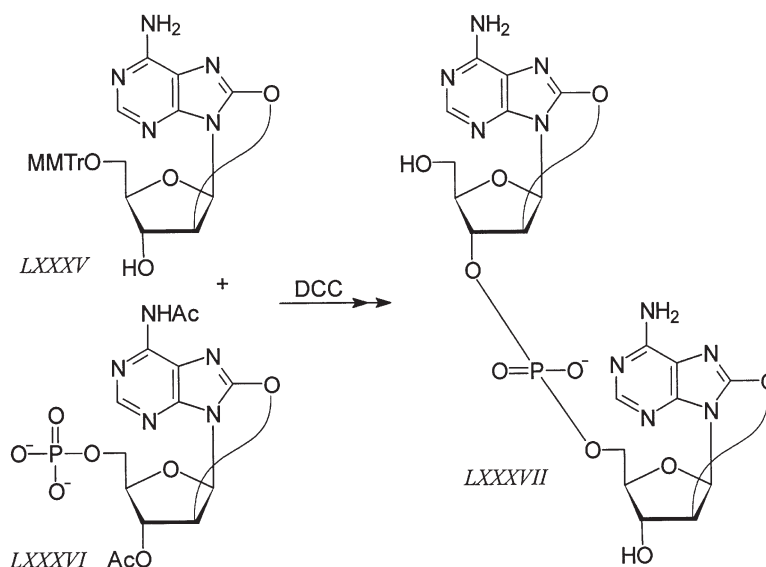


Schéma 30

i dusíku v poloze C-8 spojena alkylem, který nese žádnou hydroxyskupinu^{142-146,8}. Takové sloučeniny však již nelze považovat za analogy nukleosidů v pravém slova smyslu, neboť i případná jediná hydroxyskupina v řadě *O*-cyklických látek je vázána anhydro vazbou.

Bylo připraveno mnoho acyklických analogů nukleotidů. Dvě výrazné skupiny látek byly detailně studovány pro své

antivirové *in vitro* a *in vivo* účinky: *N*-(2-fosfonomethoxyethyl) (PME) a (*S*)-*N*-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl) (HPMP) deriváty heterocyklických bází^{147,148}. Z diisopropylesteru (*S*)-8-brom-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)adeninu LXXXIII byl reakcí s hydridem sodným v DMF připraven příslušný cyklický HPMPA derivát LXXXIV (schéma 29) (cit.¹⁴⁹).

9. Polynukleotidy obsahující purinové cyklonukleosidy

Podle úmluvy se polynukleotidové sekvence kreslí svým 5'-koncem vlevo, 3'-koncem vpravo. Triplet adenylyl-3',5'-uridylyl-3',5'-guanin může být zkráceně zapsán jako ApUpG (nebo jen AUG) (cit.¹⁵⁰). Strategie chemické syntézy oligonukleotidů je podobná syntéze polypeptidů. Vhodně chráněný nukleotid je připojen k rostoucímu konci oligonukleotidového řetězce, odstraní se chránící skupina a děj se opakuje.

Tak například dinukleosidmonofosfát *O*-cykloadenosinu, 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadeninofosforyl-(3',5')-8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadenin (LXXXVII, zkráceně A^OpA^O, horní index O značí, že se jedná o *O*-cyklonukleosid), byl připraven z 5'-monomethoxytritylderivátu 8,2'-*O*-cykloadenosinu LXXXV a vhodně ochráněného 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadenin-5'-fosfátu LXXXVI za použití *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) jako kondenzačního činidla (schéma 30) (cit.¹⁵¹).

Byla připravena a studována řada dalších dinukleosidfosfátů obsahujících 8,2'-*O*-cykloadenosin¹⁵², 8,2'-*S*-cykloadenosin^{153,154} (jeho desulfurací Ra-Ni lze připravit dinukleosidfosfát odvozený od 2'-deoxyadenosinu¹⁵⁵), dinukleosidfosfáty A^SpU^O a U^OpA^S (horní index S značí, že se jedná o *S*-cyklonukleosid)¹⁵⁶, dinukleosidfosfáty obsahující 8,2'-*S*-cykloadenosin a 8,2'-*S*-cykloinosin¹⁵⁷ a mnoho dalších¹⁵⁸ a byly studovány jejich chemické a fyzikální vlastnosti¹⁵⁹.

Syntetizována byla dále řada trinukleotidů a dalších oligo- a polynukleotidů^{160,169} obsahujících cyklonukleosidy a bylo studováno jejich tvoření komplexů s různými polynukleotidy¹⁶¹⁻¹⁶⁴.

Již bylo zmíněno, že konformace molekuly v purinových cyklonukleosidech je do značné míry fixována. Totéž platí o cyklonukleosidech tvořících součást oligonukleotidového řetězce. To umožňuje studovat vztah mezi konformací a biologickou funkcí. Např. byly připraveny analogy tripletu AUG, který je rozeznáván jako iniciační nebo vnitřní kodon aminokyseliny methioninu při proteosyntéze¹⁶⁵, kde adenosin byl nahrazen 8,2'-*O*-cykloadenosinem¹⁶⁶, 8,5'-*O*-cykloadenosinem¹⁶⁷, 8,2'-*S*-cykloadenosinem, 8,5'-*S*-cykloadenosinem (popř. formycinem a dalšími nukleosidy s modifikovanou adeninovou bází¹⁶⁸). Tyto analogy se liší torzními úhly modifikovaných adeninových bází kolem glykosidické vazby, čehož bylo využito při studiu simulace vazby Met-tRNA k ribosomu¹⁶⁹.

LITERATURA

1. Doskočil J., Holý A.: Collect. Czech. Chem. Commun. 42, 370 (1977).
2. Bloch A., Mihich E., Nichol C. A., Robins R. K., Whistler R. H.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 7, 7 (1966).
3. Rapoport H.: Science 151, 860 (1966).
4. Scheuer P. J.: Acc. Chem. Res. 10, 33 (1977).
5. Shewach D. S., Chern J.-W., Pillote K. E., Townsend L. B., Daddona P. E.: Cancer Research 46, 519 (1986).
6. Sircar J. C., Kostlan C. R., Pinter G. W., Suto M. J., Bobovski T. P., Capiris T., Schwender C. F., Dong M. K., Scott M. E., Bennett M. K.: Agents Action 21, 253 (1987).

7. Bonnet P. A., Robins R. K.: J. Med. Chem. 36, 635 (1993).
8. Reitz A. B., Goodman M. G., Pope A. L., Argentieri D. C., Bell S. C., Burr L. E., Chourmouzis E., Come J., Goodman J. H., Klaubert D. H., Maryanoff B. E., McDonnell M. E., Rampulla M. S., Schott M. R., Chen R.: J. Med. Chem. 37, 3561 (1994).
9. Clark V. M., Todd A. R., Zussman J.: J. Chem. Soc. 1951, 2952.
10. Kaneko M., Shimizu B.: Tetrahedron Lett. 33, 3113 (1971).
11. Ogilvie K. K., Slotin L. A., Westmore J. B., Lin D. C. K.: J. Heterocycl. Chem. 9, 1179 (1972).
12. Sasaki T., Minamoto K., Itoh H.: J. Org. Chem. 43, 2320 (1978).
13. Sasaki T., Minamoto K., Itoh H.: Tetrahedron 36, 3509 (1980).
14. Belmont P., Alarcon K., Demeunynck M., Lhomme J.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 9, 233 (1999).
15. Minamoto K., Fujiki Y., Shiomi N., Uda Y., Sasaki T.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1985, 2337.
16. Harper P. J., Hampton A.: J. Org. Chem. 37, 795 (1972).
17. Duong K. N. V., Gaudemer A., Johnson M. D., Quillivic R., Zylber J.: Tetrahedron Lett. 1975, 2997.
18. Matsuda A.: Nucleic Acid Res., Special Issue 2, s13 (1976).
19. Matsuda A., Tezuka M., Ueda T.: Tetrahedron 34, 2449 (1978).
20. Gani D., Johnson A. W.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1982, 1197.
21. Romieu A., Gasparutto D., Cadet J.: Chem. Res. Toxicol. 12, 412 (1999).
22. Ikehara M.: Acc. Chem. Res. 2, 47 (1969).
23. Ikehara M., Tada H., Muneyama K., Kaneko M.: J. Am. Chem. Soc. 88, 3165 (1966).
24. Holmes R. E., Robins R. K.: J. Am. Chem. Soc. 86, 1242 (1964).
25. Ikehara M., Tada H., Muneyama K.: Chem. Pharm. Bull. 13, 1140 (1965).
26. Ikehara M., Tada H., Kaneko M.: Tetrahedron 24, 3489 (1968).
27. Ikehara M., Muneyama K.: Chem. Pharm. Bull. 13, 639 (1965).
28. Ikehara M., Kaneko M.: Chem. Pharm. Bull. 18, 2441 (1970).
29. Ikehara M., Uesugi S., Kaneko M.: Chem. Commun. 1968, 7.
30. Ikehara M., Kaneko M.: Tetrahedron 26, 4251 (1970).
31. Brentnall H. J., Hutchinsosn D. W.: Tetrahedron Lett. 25, 2595 (1972).
32. Ikehara M., Ogiso Y., Maruyama T.: Chem. Pharm. Bull. 25, 575 (1977).
33. Ryu E. K., MacCoss M.: J. Org. Chem. 46, 2819 (1981).
34. Ikehara M., Kaneko M.: Chem. Pharm. Bull. 15, 1261 (1967).
35. Ikehara M., Kaneko M.: Chem. Pharm. Bull. 18, 2401 (1970).
36. Ikehara M., Morisawa H.: Chem. Pharm. Bull. 19, 2593 (1971).
37. Mian A. M., Harris R., Sidwell R. W., Robins R. K., Khwaja T. A.: J. Med. Chem. 17, 259 (1974).
38. Kaneko M., Kimura M., Nishimura T., Shimizu B.: Chem. Pharm. Bull. 25, 2482 (1977).
39. Ogilvie K. K., Slotin L.: J. Org. Chem. 36, 2556 (1971).
40. Ikehara M., Tezuka S.: Tetrahedron Lett. 12, 1169 (1972).
41. Ikehara M., Maruyama T.: Tetrahedron 31, 1369 (1975).
42. Ikehara M., Miki H., Hasegawa A.: Chem. Pharm. Bull. 27, 2647 (1979).

43. Reist E. J., Calkins D. F., Fisher L. V., Goodman L.: *J. Org. Chem.* 33, 1600 (1968).
44. Ikehara M., Muneyama K.: *J. Org. Chem.* 32, 3039 (1967).
45. Ikehara M., Kaneko M.: *J. Am. Chem. Soc.* 90, 497 (1968).
46. Nagpal K. L., Dhar M. M.: *Tetrahedron Lett.* 1, 47 (1968).
47. Naka T., Honjo M.: *Chem. Pharm. Bull.* 24, 2052 (1976).
48. Srivastava P. C., Nagpal K. L., Dhar M. M.: *Indian J. Chem.* 7, 1 (1969).
49. Ikehara M., Kaneko M., Okano R.: *Tetrahedron* 26, 5675 (1970).
50. Kitade Y., Makino T., Hirota K., Maki Y.: *Nucleosides Nucleotides* 11, 365 (1992).
51. Kameyama K., Sako M., Hirota K., Maki Y.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1984, 1658.
52. Kitade Y., Nakanishi R., Sako M., Hirota K., Maki Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 39, 1902 (1991).
53. Maki Y., Sako M., Saito T., Hirota K.: *Heterocycles* 27, 347 (1988).
54. Sako M., Shimada K., Hirota K., Maki Y.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1986, 1704.
55. Sako M., Makino T., Kitade Y., Hirota K., Maki Y.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1992, 1801.
56. Ikehara M., Kaneko M., Nakahara Y.: *Tetrahedron Lett.* 45, 4707 (1968).
57. Ikehara M., Nakahara Y., Yamada S.: *Chem. Pharm. Bull.* 19, 538 (1971).
58. Zavgorodny S. G.: *Tetrahedron Lett.* 31, 3003 (1981).
59. Ikehara M., Muraoka M.: *Chem. Pharm. Bull.* 24, 672 (1976).
60. Ueda T., Nomoto Y., Matsuda A.: *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3263 (1985).
61. Urata H., Miyagoshi H., Yumoto T., Akagi M.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1999, 1833.
62. Zou R., Drach J. C., Townsend L. B.: *J. Med. Chem.* 40, 811 (1997).
63. Ikehara M., Tada H.: *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2344 (1963).
64. Davoll J., Lowy B. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1650 (1951).
65. Ikehara M., Tada H.: *J. Am. Chem. Soc.* 87, 606 (1965).
66. Ikehara M., Tada H.: *Chem. Pharm. Bull.* 15, 94 (1967).
67. Ikehara M., Maruyama T., Miki H.: *J. Carbohydr. Nucleosides Nucleotides* 4, 409 (1977).
68. Ikehara M., Kaneko M.: *Tetrahedron* 26, 4251 (1970).
69. Ogilvie K. K., Slotin L.: *J. Chem. Soc. D.* 16, 890 (1971).
70. Sowa T., Tsunoda K., Iizuka K., Sako K.: *Ger. Offen.* 2, 351, 555; *Chem. Abstr.* 81, 25909 (1974).
71. Kaneko M., Kimura M., Shimizu B.: *Chem. Pharm. Bull.* 20, 635 (1972).
72. Ogilvie K. K., Slotin L., Westmore J. B., Lin D.: *Can. J. Chem.* 50, 2253 (1972).
73. Ogilvie K. K., Slotin L., Westmore J. B., Lin D.: *J. Heterocyclic Chem.* 9, 1179 (1972).
74. Rokos H., Hakspiel B., Harzer G.: *Nucleic Acid Res., Special Issue 1*, s13 (1975).
75. Ikehara M., Uesugi S.: *Tetrahedron Lett.* 10, 713 (1970).
76. Ikehara M., Uesugi S.: *Tetrahedron* 28, 3687 (1972).
77. Ikehara M., Muneyama K.: *J. Org. Chem.* 32, 3042 (1967).
78. Ogilvie K. K., Slotin L., Westmore J. B., Lin D.: *Can. J. Chem.* 50, 1100 (1972).
79. Ikehara M., Kaneko M., Sagai M.: *Chem. Pharm. Bull.* 16, 1151 (1968).
80. Ikehara M., Kaneko M., Sagai M.: *Tetrahedron* 26, 5757 (1970).
81. Nagpal K. L., Srivastava P. C., Dhar M. M.: *Indian J. Chem.* 9, 183 (1971).
82. Mizuno Y., Kaneko Ch., Oikawa Y., Ikeda T., Itoh T.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4737 (1972).
83. Mizuno Y., Kaneko Ch., Oikawa Y.: *J. Org. Chem.* 39, 1440 (1974).
84. Verheyden J. P. H., Moffatt J. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 2093 (1964).
85. Ikehara M., Tanaka S.: *Tetrahedron Lett.* 6, 497 (1974).
86. Mitsunobu O.: *Synthesis* 1981, 1.
87. Chern J.-W., Kuo Ch.-Ch., Chang M.-J., Liu L.-T.: *Nucleosides Nucleotides* 12, 941 (1993).
88. Bittner S., Assaf Y., Krief P., Pomerantz M., Ziemnicka B. T., Smith C. G.: *J. Org. Chem.* 50, 1712 (1985).
89. Tenenaka K., Tsuji T., Muraoka M.: *Nucleosides Nucleotides* 17, 869 (1998).
90. Wise D. S., Townsend L. B.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 24, 271 (1979).
91. Engels J., Jäger A.: *Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)* 4, 368 (1982).
92. Wise D. S., Milne G. H., Townsend L. B.: *Heterocycles* 15, 345 (1981).
93. Ikehara M., Tada H.: *Chem. Pharm. Bull.* 15, 94 (1967).
94. Ikehara M., Tada H., Nomura A.: *Nature* 202, 900 (1964).
95. Ikehara M., Tada H., v knize: *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry* (Zorbach W. W., Tipson R. S., ed.), sv. I, str. 188. Wiley, New York 1968.
96. Ikehara M., Yano J.: *Nucleic Acids Res.* 1, 1783 (1974).
97. Todd A. R., Ulbricht T. L. V.: *J. Chem. Soc.* 1960, 3275.
98. Lee W. W., Benitez A., Anderson C. D., Goodman L., Baker B. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 83, 1906 (1961).
99. Walton E., Nutt R. F., Jenkins S. R., Holley F. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 2952 (1964).
100. Murray D. H., Prokop J., v knize: *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry* (Zorbach W. W., Tipson R. S., ed.), sv. I, str. 193. Wiley, New York 1968.
101. Ikehara M., Matsuda Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 22, 1313 (1974).
102. Karpeisky A., Zavgorodny S., Hotokka M., Oivanen M., Lönnberg H.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1994, 741.
103. Ikehara M., Kaneko M., Ogiso Y.: *Tetrahedron Lett.* 53, 4673 (1970).
104. Chattopadhyaya J. B., Reese C. B.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 21, 860 (1976).
105. Ikehara M., Maruyama T., Miki H.: *Tetrahedron* 34, 1133 (1978).
106. Ikehara M., Ogiso Y.: *Tetrahedron* 28, 3695 (1972).
107. Kaneko M., Kimura M., Shimizu B., Yano J., Ikehara M.: *Chem. Pharm. Bull.* 25, 1892 (1977).
108. Ikehara M., Ogiso Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 23, 1114 (1975).
109. Chattopadhyaya J. B., Reese C. B.: *Nucleic Acids Res., Spec. Issue 4*, s67 (1978).
110. Ikehara M., Ogiso Y., Matsuda Y., Morii T.: *Tetrahedron Lett.* 31, 2965 (1971).
111. Ikehara M., Ogiso Y., Morii T.: *Tetrahedron* 32, 43 (1976).
112. Ikehara M., Ogiso Y.: *J. Carbohydr. Nucleosides Nucleotides* 2, 121 (1975).
113. Yüntsen H., Yonehara H., Ui H.: *J. Antibiotics* 7, 113 (1954).

114. Hoeksema H., Slomp G. S., van Tamelen E. E.: *Tetrahedron Lett.* 27, 1787 (1964).
115. Zemlička J., Smrt J.: *Tetrahedron Lett.* 31, 2081 (1964).
116. Nagyvary J., Roth J. S.: *Tetrahedron Lett.* 11, 617 (1965).
117. Agarwal K. L., Dhar M. M.: *Tetrahedron Lett.* 1965, 2541.
118. Mizuno Y., Sasaki T., Kanai T., Igarashi H.: *J. Org. Chem.* 30, 1533 (1965).
119. Mizuno Y., Sasaki T.: *Tetrahedron Lett.* 50, 4579 (1965).
120. Yoshikawa M., Kato T., Takenishi T.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 42, 3505 (1969).
121. Ogilvie K. K., Slotin L. A.: *Can. J. Chem.* 51, 2397 (1973).
122. Hampton A., Sasaki T.: *Biochemistry* 12, 2188 (1973).
123. Khwaja T. A., Boswell K. H., Robins R. K., Miller J. P.: *Biochemistry* 14, 4238 (1975).
124. Ikehara M., Muraoka M.: *Chem. Pharm. Bull.* 20, 550 (1972).
125. Ikehara M., Muraoka M.: *J. Carbohydr. Nucleosides Nucleotides* 4, 1 (1977).
126. Fujii T., Itaya T.: *Heterocycles* 48, 359 (1998).
127. Ikehara M., Ogiso Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 23, 2534 (1975).
128. Ikehara M., Kaneko M., Muneyama K., Tanaka H.: *Tetrahedron Lett.* 1967, 3977.
129. Elder D. L., Bunnenberg E., Djerassi C., Ikehara M., Voelter W.: *Tetrahedron Lett.* 10, 727 (1970).
130. Ikehara M., Uesugi S., Yoshida K.: *Biochemistry* 11, 830 (1972).
131. Ikehara M., Kaneko M., Nakahara Y., Yamada S., Uesugi S.: *Chem. Pharm. Bull.* 19, 1381 (1971).
132. Tomita K., Nishida T., Fujiwara T., Ikehara M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1043 (1970).
133. Ikeda M., Tamura Y., Ikehara M.: *J. Heterocyclic Chem.* 7, 1377 (1970).
134. Schaeffer H. J., Beauchamp L., De Miranda P., Elion G. B., Bauer D. J., Collins P.: *Nature* 272, 583 (1978).
135. Chu Ch. K., Cutler S. J.: *J. Heterocycl. Chem.* 23, 289 (1986).
136. Martin J. C., Dvorak Ch. A., Smee D. F., Matthews T. K., Verheyden J. P. H.: *J. Med. Chem.* 26, 759 (1983).
137. De Clercq E., Descamps J., De Somer P.: *Science* 200, 563 (1978).
138. Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 48, 1910 (1983).
139. Holý A., Kohoutová J., Merta A., Votruba I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 51, 459 (1986).
140. Janeba Z., Holý A., Votavová H., Masojídková M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 442 (1996).
141. Hideg K., Hankovszky O., Palosi E., Hajos G., Szporny L.: *Ger. Offen.* 2 429 290; *Chem. Abstr.* 82, 156 307 (1975).
142. Balsiger R. W., Fikes A. L., Johnston T. P., Montgomery J. A.: *J. Org. Chem.* 26, 3446 (1961).
143. Uno H., Irie A., Hino K.: *Chem. Pharm. Bull.* 21, 34 (1973).
144. Hino K., Irie A., Uno H.: *Chem. Pharm. Bull.* 23, 1696 (1975).
145. Maruyama T., Sato Y., Horii T., Shiota H., Nitta K., Shirasaka T., Mitsuya H., Honjo M.: *Chem. Pharm. Bull.* 38, 2719 (1990).
146. Madre M., Geita L., Zhuk R., Koomen G.-J.: *Chin. Pharm. J.* 47, 469 (1995).
147. De Clercq E., Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Rosenberg I., Holý A.: *Antiviral Res.* 8, 261 (1987).
148. Balzarini J., Naesens L., Herdewijn P., Rosenberg I., Holý A., Pauwels R., Baba M., Johns D. G., De Clercq E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 332 (1989).
149. Janeba Z., Holý A.: *XXII. Conference of Organic Chemists on Advances in Organic Chemistry, Častá – Papiernička 1997.*
150. IUPAC–IUB combined commission: *J. Biol. Chem.* 241, 531 (1966).
151. Ikehara M., Uesugi S., Yano J.: *J. Am. Chem. Soc.* 96, 4966 (1974).
152. Ikehara M., Uesugi S., Yano J.: *Nature, New Biol.* 240, 16 (1972).
153. Ikehara M., Uesugi S., Yasumoto M.: *J. Am. Chem. Soc.* 92, 4735 (1970).
154. Ikehara M., Tezuka T.: *Nucleic Acids Res.* 2, 1539 (1975).
155. Uesugi S., Yasumoto M., Ikehara M., Fang K. N., Ts'o P. O. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5480 (1972).
156. Ikehara M., Uesugi S., Shida T.: *Chem. Pharm. Bull.* 28, 189 (1980).
157. Uesugi S., Shida T., Ikehara M.: *Chem. Pharm. Bull.* 28, 3621 (1980).
158. Uesugi S., Yano J., Yano E., Ikehara M.: *J. Am. Chem. Soc.* 99, 2313 (1977).
159. Dhingra M. M., Sarma R. H., Uesugi S., Ikehara M.: *J. Am. Chem. Soc.* 100, 4669 (1978).
160. Ikehara M., Uesugi S.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 9189 (1972).
161. Ikehara M., Tezuka T.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 4055 (1973).
162. Ikehara M., Tezuka T.: *Nucleic Acids Res.* 1, 479 (1974).
163. Ikehara M., Tezuka T.: *Nucleic Acids Res.* 1, 907 (1974).
164. Uesugi S., Tezuka T., Ikehara M.: *J. Am. Chem. Soc.* 98, 969 (1976).
165. Lucas-Lenard J., Lipman F.: *Ann. Rev. Biochem.* 40, 409 (1971).
166. Ikehara M., Nagura T., Ohtsuka E.: *Chem. Pharm. Bull.* 22, 2578 (1974).
167. Ikehara M., Nagura T., Ohtsuka E.: *Chem. Pharm. Bull.* 22, 123 (1974).
168. Uesugi S., Nagura T., Ohtsuka E., Ikehara M.: *Chem. Pharm. Bull.* 24, 1884 (1976).
169. Ohtsuka E., Nagura T., Shimokawa K., Nishikawa S., Ikehara M.: *Biochim. Biophys. Acta* 383, 236 (1975).

Z. Janeba (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*):
Purine 8-O- and 8-S-cyclonucleosides – Synthesis and Properties

8-Cyclonucleosides derived from purine bases can be prepared by a number of reactions starting from appropriately modified nucleosides or their 8-substituted (most frequently bromo, hydroxy and sulfanyl) derivatives. The 8-cyclonucleosides are compounds suitable for studying configurations and conformations of purine nucleosides, also useful as intermediates in the synthesis of many biologically interesting compounds. Although the interest in 8-cyclonucleosides culminated in the sixties and seventies, many papers return to them at present and utilize them in various syntheses.

KOLAGEN – VLASTNOSTI, MODIFIKACE A APLIKACE

PETRA PETERKOVÁ^a a LUBOMÍR LAPČÍK, Jr.^b

^aÚstav fyzikální a spotřební chemie, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, e-mail: peterkova@fch.vutbr.cz, ^bÚstav fyziky a materiálového inženýrství, Fakulta technologická, Vysoké učení technické v Brně, nám. TGM 275, 762 72 Zlín, e-mail: lapcik@zlin.vutbr.cz

Došlo dne 10.VI.1999

Klíčová slova: kolagen, vlastnosti, modifikace, využití

Obsah

1. Úvod
2. Makromolekulární charakter
 - 2.1. Struktura a složení
 - 2.2. Biosyntéza
 - 2.3. Nebílkovinné komponenty
 - 2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti
 - 2.4.1. Polyelektrolytický charakter
 - 2.4.2. Botnání
 - 2.4.3. Denaturace a renaturace
 - 2.4.4. Hydrotermální stabilita
 - 2.4.5. Hydratace kolagenu
 - 2.4.6. Přeměna na želatinu
 - 2.5. Roztok kolagenu
3. Degradace
 - 3.1. Hydrolytická degradace
 - 3.2. Enzymatická degradace
 - 3.3. Oxidační štěpení
4. Chemická modifikace
 - 4.1. Reakce s monofunkčními reagenty
 - 4.1.1. Acylace
 - 4.1.2. Esterifikace
 - 4.1.3. Deaminace
 - 4.1.4. Deguanidinace
 - 4.2. Reakce vedoucí ke tvorbě síťovaného gelu
 - 4.2.1. Aldehydová kondenzace
 - 4.2.2. Oxidace jodistanem
 - 4.3. Reakce se syntetickými polymery – povrchová imobilizace
5. Biomedicínské aplikace

1. Úvod

Kolagen je rozšířen v celé říši živých organismů s výjimkou jednobuněčných a patří mezi technicky nejdůležitější vláknité bílkoviny. Je hlavní složkou pojivových tkání, kterým zajišťuje správnou funkci, zejména v souvislosti s jejich mechanickými vlastnostmi¹. To je dáno jeho specifickou struktu-

rou, charakteristickou vysokým stupněm vnitřní organizace molekul. Kolagen představuje 25–30 % všech bílkovin v těle. Tvoří hlavní organickou složku kůže, kostí, chrupavek, šlach a vaziva. Je rovněž významnou součástí cévních stěn, bazálních membrán a rohovek. Má opěrnou a ochrannou funkci a patří, zejména jako složka mezibuněčné hmoty, ke klíčovým proteinům životních pochodů ve zdravém i v nemocném organismu.

Kolagen je obnovitelnou surovinou a jeho zdroje jsou téměř neomezené. Je proto snaha neustále zdokonalovat preparáty z něho vyráběné a hledat nové možnosti jejich zpracování a využití. Kromě toho, že je kolagen hlavní surovinou kožedělného průmyslu pro výrobu usní (ročně se zpracují asi 4 mil. tun kolagenu²), využívá se v řadě dalších oborů. Přehled využití je uveden v tabulce I. Četné aplikace vyplývají z „fyzilogické blízkosti“ nebo dokonce identity aplikovaného kolagenu s tělesným kolagenem, resorbovatelnosti a schopnosti zadržovat vodu.

2. Makromolekulární charakter

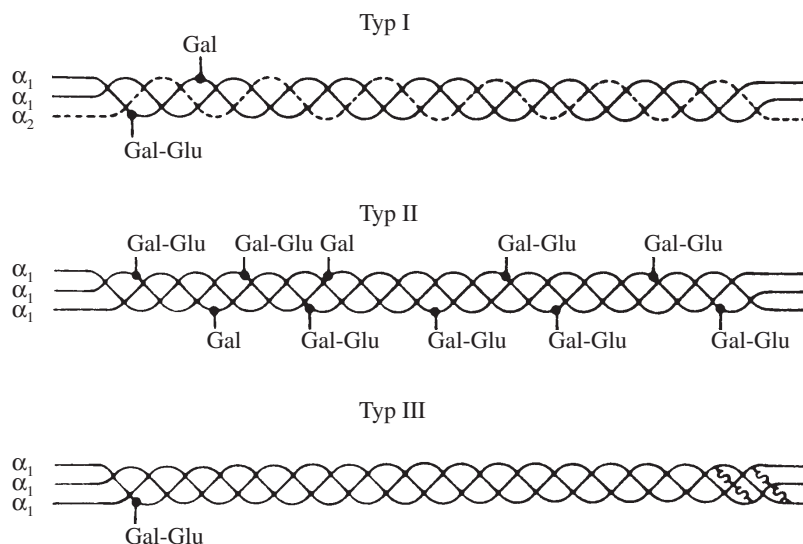
2.1. Struktura a složení

Charakteristickou vlastností molekuly kolagenu je pevnost a trojřetězcová helikální (spirálovitá) struktura. Tři kolagenové polypeptidové makromolekuly, nazývané α -řetězce (z nichž každý obsahuje kolem 1000 aminokyselinových zbytků (AMK) a měří asi 280 nm), se společně stáčejí do pravidelné pravotočivé superšroubovice (obr. 1). Úplná otáčka trojitě spirály obsahuje 30 AMK zbytků. Superšroubovice tak tvoří kolagenovou molekulu s délkou asi 300 nm a průměrem 1,5 nm. α -Řetězce jsou spirálovitě stočeny ve směru od N-kon-

Tabulka I

Strukturální hierarchie kolagenu a přiřazené obory použití

Strukturální rovina	Obor použití / produkty
Pletivo vláken/plocha	výroba usní, krytí ran, náhrada pokožky (kožní implantáty), náhrada cév
Vlákná	střívká z kolagenových past, obalové fólie, membrány, hemostyptika, prášek na rány
Fibrily	biokompatibilní plastové nebo keramické materiály, kostní a čelistní chirurgie
Makromolekuly	nativní kolagen, atelokolagen, desamidokolagen pro kosmetiku a medicínu
Polypeptidy	želatina, klíž, hydrolyzáty kolagenu, expandéry plasmy, kapsule, želatinační prostředky, tensidy, emulgátory, zahušňovačla, krmiva, hnojiva



Obr. 1. Schéma tří typů kolagenu. Je patrné rozdílné zastoupení jednotlivých typů polypeptidových řetězců a různý stupeň glykosylace. Disulfidové síťování je naznačeno jen u typu III (převzato z cit.²⁰ s laskavým svolením Wiley & Sons, Inc., Copyright 1987)

cové skupiny k C-koncové skupině a jsou levotočivé. Molekuly jsou extrémně bohaté na glycin (26 až 28 %) a prolin (nad 15 %). Z prostorových důvodů leží glycinové zbytky uvnitř trojitě spirály (jsou dostatečně malé pro obsazení vnitřního prostoru) a tím umožňují, aby se tři α -řetězce těsně semkly do konečného kolagenového superhelixu. Prolin, díky své kruhové struktuře, umožňuje vytvořit levotočivou konformaci každého α -řetězce, s třemi AMK zbytky na otáčku³. Přehled proteinogenních AMK shrnuje tabulka II.

Polypeptidový řetězec tvoří opakující se jednotky tripeptidů: (Gly-X-Y)_n, kde X a Y jsou jakékoliv AMK, zpravidla je jednou z nich prolin. Oblasti, tvořené AMK s nízkou molární hmotností, je možno považovat za krystalické, vysoce orientované úseky. Naopak oblasti s nashromážděnými výšemolekulárními polárními AMK (např. Asp, Glu, Lys, Arg) nemají přísně uspořádanou stavbu, jsou méně orientované až amorfní. Pro jejich konformační volnost a přítomnost polárních skupin je lze považovat za reaktivní místa kolagenové molekuly⁴. Toto rozložení polárních a nepolárních AMK má vztah k pří-

čnému pruhození kolagenových fibril, pozorovanému elektronovým mikroskopem.

Existuje několik typů kolagenů, navzájem se lišících především složením AMK (tabulka III).

2.2. Biosyntéza

Kolagen je vylučován zejména buňkami pojivových tkání. Samotné kolagenové polypeptidové řetězce jsou syntetizovány na hraniční membráně ribosomů (jednotlivé AMK se spojují do řetězců kondenzací za odštěpení vody) a následně transportovány do buněčné dutiny endoplasmatického retikula³ (ER) jako velké prekursorů, nazývané pro α -řetězce. Tyto prekursorů obsahují jednak krátké aminoluminální „signální peptidy“, nutné pro transport vylučovaných proteinů přes membránu ER, a také další AMK, nazývané propeptidy, vyskytující se na aminovém a karboxylovém konci. V buněčné dutině ER jsou prolin a lysin hydroxylovány na hydroxyprolin (Hyp) a hydroxylysin (Hyl). Každý pro α -řetězec se spojuje se dvěma dalšími prostřednictvím H-vazeb, vzniká trojřoubcová struktura zvaná prokolagen. Vodíková vazba vzniká mezi kyslíkem karboxylové skupiny jedné peptidové vazby a vodíkem iminoskupiny druhé peptidové vazby. Vylučované fibrilární kolageny (kromě typu I) jsou v mimobuněčném prostoru převedeny, odstraněním propeptidů, na kolagenové molekuly. Kolageny jsou vylučovány s nehelikálními prodlouženými na obou koncích⁵. Těmto odštěpitelným částem polypeptidů, extrémně bohatým na aromickou AMK tyrosin, se říká telopeptidy.

4-Hydroxyprolinové a 5-hydroxylysinové zbytky jsou zřídka přítomny v jiných proteinech. Hydroxylové skupiny hydroxyprolinu tvoří meziřetězcové H-vazby pomáhající stabilizovat trojřetězcový helix⁶ (okolnosti zabraňující hydroxylaci prolinu, jako nedostatek kyseliny askorbové, inhibují tvorbu prokolagenu). Z posledních studií však vyplývá, že více než H-můstky má na stabilitu molekuly vliv indukční efekt Hyp v Y-pozici⁷. Hydroxylované lysinové zbytky jsou nezastupitelné při neobvyklé glykosylaci lysinu a jsou rozhodující

Tabulka II

Průměrné zastoupení aminokyselin v kolagenu z hovězích kůží^a

Aminokyselina	Hodnota	Aminokyselina	Hodnota
Hydroxyprolin	116,0	Methionin	6,5
Kyselina asparagová	44,0	Isoleucin	10,0
Threonin	15,0	Leucin	24,0
Serin	36,0	Tyrosin	2,0
Kyselina glutamová	70,0	Fenylalanin	12,0
Prolin	122,0	Hydroxylysin	6,5
Glycin	321,0	Lysin	30,0
Alanin	105,0	Histidin	4,5
Valin	20,0	Arginin	47,0

^a Data vyjádřena jako AMK zbytky/1000 zbytků

Tabulka III
Typy a charakteristika známých kolagenů

Typ	Řetězce	Charakteristika	Výskyt
I	$\alpha_1(\text{I}), \alpha_2(\text{I})$	nejčastější výskyt, málo hydroxylysinu	kosti, šlachy, kůže, zubovina, vazivo, děloha, cévy
I Trimer	$\alpha_1(\text{I})$	vyšší obsah 3- a 4-hydroxyprolinu a 5-hydroxylysinu	nádorové útvary a zanícená ložiska
II	$\alpha_1(\text{II})$	častý výskyt, relativně bohatý na hydroxylysin a karbohydráty	chrupavky, sklivec oka
III	$\alpha_1(\text{III})$	bohatý na hydroxylysin obsahující meziřetězcové disulfidické vazby	kůže, cévy, děloha, retikulin
IV	$\alpha_1(\text{IV}), \alpha_2(\text{IV})$	bohatý na hydroxylysin, obsahuje rozsáhlé globulární regiony	bazální membrány
V	$\alpha_1(\text{V}), \alpha_2(\text{V}), \alpha_3(\text{V})$	stejný jako typ IV	spojovací tkáň
VI	$\alpha_1(\text{VI}), \alpha_2(\text{VI}), \alpha_3(\text{VI})$	mikrofibrily	spojovací tkáň
VII		dlouhé řetězce	zpevňující fibrily
VIII	$\alpha_1(\text{VIII})$	šroubovice zařazené za sebou	některé endotelické buňky
IX	$\alpha_1(\text{IX}), \alpha_2(\text{IX}), \alpha_3(\text{IX})$	vedlejší protein chrupavek, nese glykosaminoglykany	chrupavky
X	$\alpha_1(\text{X})$	krátké řetězce	hypertrofické chrupavky

pro rozsáhlé síťování kolagenových molekul, které se tvoří během shromažďování kolagenu v mimobuněčném prostoru. Zbytky hydroxylysinu s navázanými sacharidy se podílí na tvorbě intra- a intermolekulárního kovalentního příčného síťování².

Kolageny jsou neustále, i když pomalu, degradovány specifickými mimobuněčnými enzymy, tzv. kolagenasami. Po vyloučení jsou propeptidy prokolagenových molekul odstraněny specifickými proteolytickými enzymy mimo buňku. Tyto přeměňují prokolagenové molekuly na molekuly kolagenu, také nazývaného tropokolagen (1,5 nm v průměru), které se spojují v mimobuněčném prostoru za tvorby rozměrnějších kolagenových fibril (10–300 nm v průměru). Hnací silou tvorby fibril je do jisté míry tendence kolagenu k samoseskupování. Propeptidy mají alespoň dvě funkce: 1) usměrňují vnitrobuněčnou tvorbu trojřetězcových kolagenových molekul, 2) protože jsou odstraněny až po sekreci, zabraňují nitrobuněčné tvorbě velkých kolagenových fibril, která by mohla být pro buňku fatální. Při pozorování izolovaných kolagenových fibril v elektronovém mikroskopu se ukazuje těsné uspořádání kolagenových molekul ve fibrilách a posunutí sousedních molekul o 67 nm, což je téměř 1/4 jejich délky. Tak vznikají, mezi po sobě jdoucími molekulami v řadě, mezery⁸ o velikosti 35 nm. Toto uspořádání pravděpodobně zajišťuje agregátům velkou pevnost v tahu. Také rýhovaná struktura kolagenových molekul, viditelná v elektronovém mikroskopu, je dána posunem molekul a vznikem mezer.

Po vytvoření kolagenových fibril v mimobuněčném prostoru následuje jejich vnitřní zpevnění zesíťováním, tj. tvorbou kovalentních vazeb mezi lysinovými zbytky základních kolagenových molekul. Síťování probíhá v několika krocích: 1) lysinové a hydroxylysinové zbytky jsou deaminovány mimobuněčnými enzymy (lysyloxidasami), čímž se zvyšuje reaktivita tvorbou aldehydových skupin, 2) vzniklé aldehydy spontánně reagují s jinými lysinovými, nebo hydroxylysinovými zbytky za tvorby kovalentních vazeb; některé z těchto vazeb jsou nestabilní a dále modifikovány tvoří stabilnější zesíťová-

ní; většinou zesíťování vzniká mezi krátkými nehelikálními konci molekul kolagenu.

Organizace kolagenových fibril v mezibuněčné hmotě je přizpůsobena potřebám tkáně. Fibrily mají různé průměry a jsou v různých tkáních odlišně organizovány. V savčí kůži např. jsou „tkány“ tak, aby odolávaly napětí ve všech směrech. Ve šlachách jsou organizovány do paralelních svazků podél hlavní osy napětí působícího na šlachy³. U dospělé kosti a rohovky vytvářejí pravidelně vrstvené struktury podobné překližce, přičemž jednotlivé vrstvy jsou na sebe kolmé. Pojivové tkáň samy určují velikost a uspořádání kolagenových fibril. Buňky mohou provést expresi jednoho nebo více genů pro různé typy fibrilárních prokolagenových molekul a mohou také regulovat jejich rozmístění po sekreci. Nakonec je stupeň zesíťování kolagenu větší nebo menší podle požadované pevnosti v tahu.

Syntéza kolagenových fibril a jejich shromažďování se dají stručně popsat v následujících krocích: 1) procesy probíhající uvnitř buňky: syntéza pro α -řetězce, hydroxylace a výběr prolinů a lysinů, glykosylace vybraných hydroxylysinů, tvorba trojhelikální formace ze tří pro α -řetězců; 2) sekrece přes plazmatickou membránu: prokolagenová molekula; 3) procesy vně buňky: rozštěpení propeptidů, vznik kolagenových molekul, jejich shromažďování do fibril, agregace kolagenových fibril do kolagenových vláken.

2.3. Nebílkovinné komponenty

Povrch kolagenových fibril hraje důležitou roli ve stavbě a funkci pojivových tkání. Jackson⁶ pozoroval, že chondroitin sulfát a jiné glykosaminoglykany (GAG), vázané solnými můstky nebo vodíkovými vazbami, se podílejí na stabilizaci kolagenu ve šlachách. Vysoce čištěný kolagen i po nedegradující extrakci obsahuje malá množství jednoduchých sacharidů, a to pentos a hexos. Hörmann⁹ zjistil, že hexosou přítomnou v kolagenu rozpustném v kyselém prostředí je glukosa (3,8 jednotek na 1000 AMK zbytků), zatímco v nerozpustném

kolagenu se vyskytuje jak glukosa tak i galaktosa (celkem 3,5 jednotky na kolagenové vlákno). Rozpustné frakce dále obsahují mannosu, fukosu, rhamnosu a ribosu. Sacharidické složky se vážou prostřednictvím hydroxylysinového zbytku.

2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti

2.4.1. Polyelektrolytický charakter

Kolagen, podobně jako i jiné bílkoviny, má charakter amfoterního polyelektrolytu⁴. Jeho iontové reakce probíhají v závislosti na pH prostředí. To znamená, že část skupin postranních řetězců se ionizuje v alkalické a část v kyselé oblasti pH. Náboj kolagenové molekuly se mění se změnou pH; v silně kyselé oblasti má kladný náboj, v silně alkalické oblasti záporný. Izoelektrický bod nativního kolagenu je při pH 7. Mírnými účinky chemikálií se mění v rozsahu pH 4,5 až 8,0. Většina fyzikálně chemických vlastností vykazuje v této oblasti extrémní hodnoty. Jako izoiontový bod je označována hodnota pH, při níž počet protonů připojených ke skupinám $-NH_2$ bílkoviny se rovná počtu protonů oddisociovaných ze skupin $-COOH$. Proto se bílkovina čistí dialýzou, aby neobsahovala žádné jiné ionty. Hodnota pH se potom charakterizuje jako izoiontový bod.

2.4.2. Botnání

Z fyzikálně chemického hlediska patří kolagen k přechodným koloidním soustavám – gelům. Jejich nejdůležitější vlastností je schopnost botnat. Po ponoření do vody vlákno kolagenu omezeně botná (exotermní proces); přitom dochází ke změně objemu, délky a pružnosti vlákna. Část vody obsažené v nabotnaném kolagenu tvoří tzv. botnací voda, kterou lze mechanickým účinkem odstranit, druhou část tvoří voda hydratační, koloidně vázaná, odstranitelná jen sušením.

Z hlediska mechanismu lze rozlišit botnání osmotické (nábojové) a lyotropní. Při osmotickém botnání proniká voda styčnou plochou mezi pevnou látkou a rozpouštědlem následkem gradientu osmotického tlaku. Ten je dán rozdílem koncentrací všech pohyblivých iontů ve vnitřní fázi (gelu) a ve vnější fázi (roztoku). Po určité době se ustaví rovnováha – tzv. Donnanova membránová rovnováha, kdy botnací tlak je právě vykompenzován pevností makromolekulární sítě⁴. Rozrušení stabilizujících vazeb (působením extrémní hodnoty pH nebo lyotropních činidel) snižuje protitlak pevné fáze proti průniku vody a rovnováha se dosáhne při vyšším stupni nabotnání (lyotropní botnání). Sloučeniny způsobující tento druh botnání mají schopnost štěpit vodíkové vazby a v extrémním případě až rozpouštět kolagen.

2.4.3. Denaturace a renaturace

Vlivem některých chemikálií nebo tepelným účinkem ztrácejí bílkoviny své původní nativní vlastnosti – denaturují. Denurací kolagenu vzniká želatina. Orechovič a Spikiter zjistili, že produktem denaturační reakce vodného roztoku tropokolagenu jsou dva štěpy lišící se molekulovou hmotností, a označili je jako komponenty α a β (viz¹⁰). Komponentu β lze dále rozštěpit na dvě komponenty α . Vznikají tedy tři štěpy odpovídající trojitě spirále molekuly kolagenu. Mechanismus denaturace tropokolagenu je dvoustupňový proces. Nejdříve

nastane zborcení trojitě spirály a makromolekula tropokolagenu se stáhne do statistického klubka, v němž jsou jednotlivé řetězce navzájem ještě spojeny. V druhém stupni se tato klubka rozpadávají na tři frakce: frakci α tvořící jeden polypeptidický řetězec původní spirály, frakci β tvořící dva dosud spojené řetězce a frakci γ , kterou tvoří tři řetězce v nezměněné formě statistického klubka. Zůstane-li denaturovaný roztok tropokolagenu stát delší dobu při nízké teplotě, probíhá zčásti proces renaturace, tj. zpětná rekonstrukce spirálové konfigurace.

2.4.4. Hydrotermální stabilita

Při zahřívání kolagenových vláken ve vodě dochází k jejich zkrácení asi o 1/3 vlákna ve směru osy. Tato termická kontrakce je charakterizována teplotou smrštění T_s . Příčinou smrštění je štěpení intermolekulárních příčných vazeb a rovněž intramolekulárních vazeb (kdy nastává denaturace kolagenu), které udržují trojitě spirály v nativním kolagenovém vlákne v nataženém stavu. T_s kolagenu se považuje za tání kolagenu v krystalických oblastech. Rovněž lyotropní činidla, štěpící vodíkové vazby, způsobují kontrakci kolagenového vlákna a snižují hodnoty T_s . K určení stability trojhelikální struktury se využívá obvykle měření teploty T_d , tj. denaturační teploty přechodu kolagen – želatina (viz odst. 2.4.6), který jako fázová přeměna prvního řádu má kladné a výrazné ΔH . Hodnoty obou teplot lze v určitém rozsahu zvýšit zesíťováním kolagenu¹¹; tak např. u kolagenu vyčíněného glutaraldehydem jsou nacházeny hodnoty T_s kolem 70 °C, naproti tomu u nativního kolagenu 37 °C.

2.4.5. Hydratace kolagenu

Proteiny obsahují dva typy hydrofilních center schopných vázat vodu elektrostatickými silami a vodíkovými vazbami: 1) polární skupiny přítomné v bočních řetězcích některých AMK zbytků, 2) dusík a kyslík peptidické vazby¹². Pro udržení fyzikálních vlastností kolagenu je nutná asociace určitého minimálního množství vody, tvořícího přibližně 20 % jeho hmotnosti. V plně hydratovaném stavu kolagenu se uvolňuje pohybové omezení peptidových řetězců profibril, typické pro suchý stav, čímž se vysvětluje elementární funkce vody pro fyzikální vlastnosti proteinu. Vzdálenost mezi sousedními polypeptidovými řetězci suchého kolagenu je 1 nm, hydratací se tato vzdálenost zvyšuje na 1,5 až 1,6 nm.

2.4.6. Přeměna na želatinu

Zahříváním kolagenu ve vodném prostředí vzniká želatina. Z hlediska teoretických představ přeměny kolagenu na želatinu rozeznáváme tři pochody: 1) štěpení příčných kovalentních intermolekulárních vazeb na úrovni kvarterní struktury, 2) denaturace na úrovni terciární struktury, 3) hydrolytické štěpení peptidických vazeb polypeptidových řetězců na molekulární úrovni. Zásah do struktury polypeptidového řetězce má charakter degradace, depolymerace a je jevem nežádoucím: čím méně těchto vazeb je rozštěpeno, tím lepší fyzikálně chemické vlastnosti želatina má.

Typickou vlastností želatiny je přechod sol–gel. Gel želatiny jeví tixotropii, zahřátím na určitou teplotu „taje“ a přechází na sol. Je to přeměna inverzní, nikoli však vratná:



Z hlediska složení AMK je možné želatínu považovat za chemicky velmi čistou formu kolagenu. Jsou odstraněny nevláknité bílkoviny, mukopolysacharidy a tuky¹³. U želatiny připravené alkalicky dochází k poklesu koncentrace argininu, tyrosinu a amidicky vázaného dusíku. Kyselce připravená želatina se proto více blíží AMK složení kolagenu.

2.5. Roztok kolagenu

Již na počátku století bylo zjištěno, že některé kolageny lze rozpustit ve studeném zředěném roztoku kyseliny octové. Fyzikálně chemické studie rozpustných kolagenů (rozptyl světla, osmometrie, viskozimetrie, dvojlom světla) umožnily blíže charakterizovat tropokolagen¹⁴. V dostatečně nízké koncentraci existuje rozpustný kolagen ve zředěných roztocích organických kyselin ve formě protáhlých tenkých tyčinek¹⁵ o délce 280 nm, průměru 1,6 nm a relativní molekulové hmotnosti podle různých autorů od 265 000 do 300 000. Později byla popsána další třída rozpustných kolagenů¹⁵⁻¹⁷ získaných extrakcí ve studených, slabě alkalických roztocích solí nebo neutrálních roztocích solí s hypertonicou a fyziologickou iontovou silou. V nativní formě je možné rozpustit jen agregační formy kolagenu, které ještě neobsahují intermolekulární příčné kovalentní vazby¹. Nerozpustný kolagen z tkání starších jedinců lze rozpustit po předchozí úpravě, při níž se rozštěpí část intermolekulárních příčných vazeb a nastane částečná nebo celková chemická nebo tepelná denaturace. Rozpustnost kolagenu také závisí na stupni zralosti tkáně. Z tkání mladých jedinců je možné rozpustit 10 až 15 % kolagenu; stárnutím vaziva rozpustnost klesá⁴. Poslední výzkumy ukazují, že pro použití kolagenu jako biomateriálu je alkalická úprava účinnější než kyselá, protože pozitivně ovlivňuje termální stabilitu kolagenu a znemožňuje tvorbu fibril při neutrálním pH ve fyziologických podmínkách¹⁸.

3. Degradace

3.1. Hydrolytická degradace

Kolagen v roztoku podléhá progresivní hydrolytické degradaci doprovázené ztrátou mnoha fyzikálních vlastností. Rychlost tohoto procesu je závislá na teplotě, pH systému a v menší míře na vnitřním tlaku roztoku a povaze dalších rozpouštědel, které mohou být přítomny. S teplotou rychlost hydrolyzy roste. Při neutrálním pH postupuje degradace pomaleji, s pohybem na obě strany rychlost roste. Kromě hydrolyzy příčných kovalentních, převážně esterových vazeb, probíhá současně štěpení peptidických vazeb v polypeptidovém řetězci. Při alkalické hydrolyze je toto štěpení mírnější; štěpí se sedmákrát méně peptidů než esterových vazeb⁴. Při kyselé hydrolyze je štěpení obou typů vazeb přibližně stejné.

3.2. Enzymatická degradace

Některé studie ukázaly, že nativní kolagen je vůči působení běžných proteolytických enzymů odolný, s výjimkou ur-

čitých enzymů bakteriálního nebo hmyzího původu, tzv. kolagenas, které specificky štěpí peptidové řetězce nativního kolagenu¹⁹. Patří mezi ně např. enzymy izolované z bakterií *Clostridium perfringens* a *Cl. histolyticum*. Jiná situace však nastává při vyšší teplotě, kdy se v roztoku rozpadá sekundární struktura kolagenu. Každý peptidový řetězec je pak schopen zaujmout větší počet konformací s přibližně stejnou energií a nemá stálou orientaci. Tehdy mohou peptidové segmenty přizpůsobit svou orientaci aktivnímu centru enzymu a stát se tak přístupné téměř všem proteolytickým enzymům. Ty přednostně hydrolyzují vazby s aromatickými zbytky, některé, jako trypsin, štěpí peptidové vazby, estery a amidy¹⁹.

3.3. Oxidační štěpení

Oxidační štěpení je složitější než hydrolytická degradace. Studium vlivu oxidačních činidel, jako je např. peroxid vodíku, jodistan sodný, bromnan sodný a železokyanatan sodný, ukázalo, že se jejich reakce s kolagenem navzájem značně liší. Degradace je založena na ataku příslušného činidla na sacharidy obsažené v kolagenu²². Štěpení kyselinou jodistou je doprovázeno mírným úbytkem volných aminoskupin (van Slykova analýza) a prudkým poklesem obsahu hexosy. Ztráta aminoskupin odpovídá sníženému obsahu hydroxylysinu v kyselce rozpustném kolagenu.

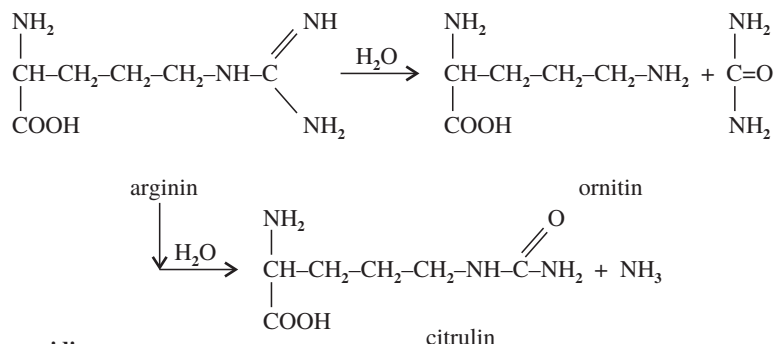
4. Chemická modifikace

S výjimkou reakcí thiolových skupin se k modifikaci vlastností a chování kolagenu používá celá řada reakcí, které je možné rozdělit do následujících kategorií: 1) přímá reakce bočních funkčních skupin s monofunkčními reagenty nebo 2) s polyfunkčními reagenty, vedoucí k polymerizaci; 3) oxidační nebo redukční reakce měnící povahu řetězců (rozštěpení peptidických vazeb nebo odbourání sacharidů asociovaných s kolagenem); 4) omezená enzymatická degradace, která nechává strukturu hlavního řetězce neporušenou. Vyjma těch případů, kdy je degradace žádoucí, jsou reakční podmínky voleny tak, aby hydrolytická degradace během chemické modifikace byla minimální.

4.1. Reakce s monofunkčními reagenty

4.1.1. Acylace

Úplnou acetylací aminoskupin kolagenu acetanhydridem vzniká vícenásobný *N*-acetylderivát a příslušný počet molekul kyseliny octové¹⁹. Reakce je doprovázena částečnou (77 %) acetylací hydroxylových skupin. Úplné acylace lze dosáhnout s použitím směsi anhydridu kyseliny octové a ethylacetátu s přídavkem malého množství kyseliny mravenčí jako katalyzátoru. Selektivní *N*- a *O*-acylace je možná pouze jednostranně. Např. při kompletní *N*-acetylaci želatiny acetanhydridem, při pH 9,5–10,5 ve vodném roztoku při 0 °C, se dosahuje pouze 2 % *O*-acetylace²². Je nutno pamatovat na skutečnost, že po acylaci na bázi anhydrid kyseliny octové – silná kyselina dochází k degradaci hlavního polymerního řetězce. Další možnou vedlejší reakcí je transesterifikace, která následně způsobuje síťování kolagenu.



Obr. 2. Reakční schéma deguanidinace

4.1.2. Esterifikace

Ať už se jedná o esterifikaci dimethylsulfátem, bezvodým methanolem, nebo jinými činidly, je teplota smrštění esterifikovaného kolagenu totožná s hodnotami T_s naměřenými u nativní formy, ale vždy se podstatně mění průběh křivek botnání kolagenu²². Esterifikovaný kolagen na rozdíl od nativní formy nevykazuje v oblasti pH 6–9 minimum, ale prochází maximum. V silně kyselých (pH 2) a silně alkalických (pH 11) oblastech jsou hodnoty T_s shodné. I přes vysokou schopnost botnat zůstává esterifikovaný kolagen nerozpustný a, jak ukazují měření T_s , zachovává si svoji strukturální integritu. To naznačuje, že původní intermolekulární síťování není ovlivněno reakčními podmínkami. Vysoký stupeň nabobtnání po esterifikaci je částečně přisuzován polyelektrolytovému efektu, jelikož síť kolagenových vláken je převedena na kationtovou formu s hustotou náboje nejméně jeden kationtový boční řetězec na každých 10 aminokyselinových zbytků.

4.1.3. Deaminace

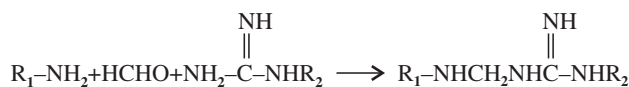
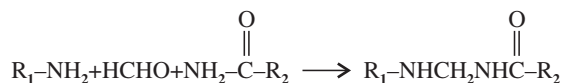
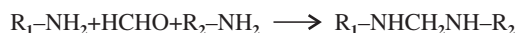
Deaminace vede k přeměně volných aminoskupin na hydroxylové skupiny. Pro dosažení kompletní deaminace se užívá směs obsahující dusitan sodný a ledovou kyselinu octovou⁸. Deaminovaný kolagen si zachovává původní T_s , ale stejně jako u esterifikace se mění křivky botnání. Kyselé botnání je sníženo v míře odpovídající poklesu kladného náboje sítě. V rozmezí pH 4–7 je objem absorbované vody identický u nativního i deaminovaného kolagenu. Avšak v alkalické oblasti dochází k podstatnému nárůstu objemu rozpouštědla, což je pozoruhodné vzhledem k Donnanově rovnováze a elektrostatickému efektu. Dochází zřejmě k poklesu vnitřní koheze mezi vlákny.

4.1.4. Deguanidinace

Arginin může být deguanidinován alkáliemi za vzniku ornitinu a močoviny, nebo také citrulinu a amoniaku (obr. 2). Reakce probíhá pomalu a je významná jen v pozdějším stupni alkalické degradace kolagenu²³.

4.2. Reakce vedoucí ke tvorbě síťovaného gelu

Síťovaný kolagen má vyšší modul pružnosti (Youngův modul), větší odolnost vůči působení proteas a nižší stupeň nabobtnání než protein nezesíťovaný^{24,25}. Jelikož je výhodné,



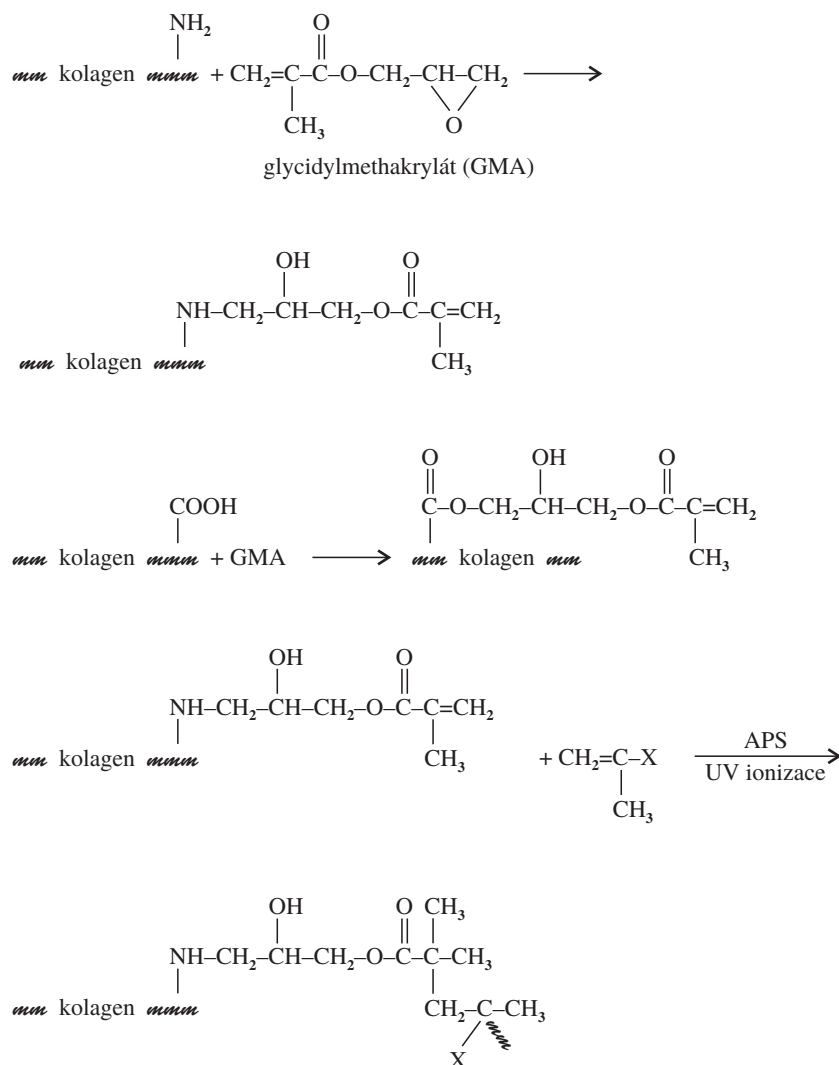
Obr. 3. Aldehydová kondenzace

aby kolagenové preparáty měly co možná nejlepší chemické, fyzikální i materiálové vlastnosti a minimální reaktivitu s vodou, v jejímž prostředí se obvykle nacházejí, jsou síťovací techniky často využívány. Zesíťování kolagenu může být docíleno jednak chemickou úpravou, např. s aldehydy, jako je formaldehyd, akrolein, glutaraldehyd, glyoxal, dále s kyselinami (kyselinou chromovou), oxidačními činidly (jodistany), jednak fyzikálními vlivy, např. gama zářením, UV zářením a jinými²⁶.

4.2.1. Aldehydová kondenzace

Schopnost aldehydů stabilizovat a síťovat AMK a proteiny byla potvrzena již v 50. letech na příkladu derivátů aminokyselin připravených reakcí s formaldehydem, které vedly ke vzniku aminomethylol derivátů primárních aminoskupin, s následnou kondenzací se sekundárními aminy, amidy, nebo guanidinovými skupinami za tvorby methylenových můstků¹ (obr. 3).

Síťování je docíleno s mono- i bifunkčními aldehydy, jejich reakce se však značně liší. Dialdehydové škroby a alifatické dialdehydy, jako je glutaraldehyd (GTA), modifikují kolagen tvorbou můstků za vzniku dvojité Schiffovy báze^{27,28} ($R_1-\text{C}=\text{N}=\text{C}-(\text{C})_n-\text{C}=\text{N}-\text{C}-R_2$). GTA reaguje přednostně s ϵ -aminoskupinami lysinových zbytků řetězců, ale byly získány také reakce s N-koncovými aminoskupinami peptidů, SH skupinami cysteinu a imidazolovými kruhy histidinu²⁹. Ze spektrální charakteristiky a relativní molekulové hmotnosti reakčních produktů je patrné, že GTA reaguje s ϵ -NH₂ skupinami za tvorby málo stabilního aminu s molární hmotností přibližně 200 g.mol⁻¹ a absorpcí při 300 nm (cit.³⁰). V přítomnosti nadbytku GTA nastává rychlá konverze na výšemolekulární meziprodukt, který silně absorbuje při 265 nm. Stabilita



Obr. 4. Syntéza kopolymeru kolagen-glycidylmethakrylát

vzniklé Schiffovy báze ukazuje, že takto fixovaný kolagen je mnohem více odolný vůči kyselé nebo vysokoteplotní hydrolyze než produkt modifikovaný za stejných podmínek, ale pomocí formaldehydu. Při nízké koncentraci tvoří GTA intramolekulární síťování, při vyšší vznikají dlouhé polymerní řetězce způsobující intermolekulární fixaci.

4.2.2. Oxidace jodistanem

Tato metoda propůjčuje kolagenu požadované biologické a/nebo fyzikální vlastnosti, jako jsou mechanická pevnost, biostabilita, antiimunogenicit a další, a eliminuje tak nutnost použití GTA jako síťujícího činidla. Hydroxylová skupina vzácnější aminokyseliny vyskytující se v polypeptidových řetězcích kolagenu, 5-hydroxylysinu, může být oxidována jodistanem³¹ za vzniku aldehydové skupiny, která reaguje se sousedními aminoskupinami lysinových zbytků a tvoří tak síť. Vznikající iminové skupiny jsou pak redukovány mírným redukčním činidlem, jako je např. hydridoboritan sodný nebo aminoborany.

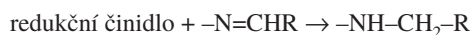
4.3. Reakce se syntetickými polymery – povrchová imobilizace

Jedním z důvodů pro imobilizaci kolagenu na povrchu syntetických polymerních materiálů je zvýšení biokompatibility medicínských implantátů s měkkými tkáněmi a snížení rizika tvorby nádorových útvarů utvářejících se v lidském těle po implantaci polymerních náhrad. Jako příklad slouží potažení porézního polyethylenu (PE) kolagenem vázaným k povrchu chemicky, přes kovalentní vazbu³². Plazmatickou úpravou a následným naroubováním kyseliny akrylové byly na povrchu materiálu imobilizován kolagen prostřednictvím amidové vazby vznikající reakcí mezi karboxylovými skupinami a aminoskupinami molekul kolagenu. Tímto způsobem je vrstva kolagenu pevně fixována na modifikovaný povrch polyolefinu, aniž by docházelo k jejímu oddělování v přítomnosti vlhkosti. Množství navázaného kolagenu bylo stanoveno ninhydrinovou metodou, která poskytla hodnotu 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Jinou možností ukotvení je modifikace kolagenu roubova-

cí polymerací s akrylovými monomery. Jako příklad může sloužit dvoustupňová výroba kopolymerů kolagenu s glycidylmethakrylátem² (obr. 4).

Oxidační metodu pro ukotvení biomolekul k povrchu substrátů vyvinul Keogh³¹. Metoda spočívá v oxidaci 2-aminoalkoholových skupin jednoho materiálu jodistanem za tvorby aldehydových skupin, reagujících v dalším kroku s aminoskupinami druhého materiálu za vzniku iminové vazby, která dále po redukci poskytuje aminová vazebná spojení, schematicky:



Materiálem obsahujícím 2-aminoalkoholovou nebo aminovou skupinu může být biomolekula nebo povrch polyolefinu. IO_4^- se používá buď ve formě kyseliny jodisté nebo jejích solí (Na, K a jiné alkalické kovy). V případě oxidace biomolekul je reakce vedena ve vodném pufru při pH 4–9 (6–8 pro pH senzitivní biomolekuly) a teplotě 4–37 °C. Polyolefiny mohou být snadno aminovány plazmochemickou úpravou s NH_3 .

5. Biomedicínské aplikace

Použití kolagenu má svůj původ ve „fyzilogické blízkosti“ nebo dokonce identitě aplikovaného kolagenu s tělesným kolagenem „příjemce“, v jeho resorbovatelnosti, která se dá řídit síťovacími reakcemi, a ve vysoké absorpční schopnosti, která je podporovaná značným vnitřním povrchem (několik m^2/cm^3) a snadno přístupnými reakčními skupinami. Výhodou je, že se dá vyrobit velmi čistý, což platí zejména pro rozpustné kolageny. Ukazuje se, že použití kolagenu má více předností. Jako nespecifický polymer, nacházející se ve stejné formě u různých druhů savců, vykazuje velmi nízkou antigenitu, nevyvolává tvorbu protilátek organismu². Při působení specifických enzymů na molekuly kolagenu se odstraní telopeptidy z konců řetězců a antigenita se potlačí ještě více. Kolagen může být i nosičem léčiv nebo stimulačních látek, které se lokálně dostávají do rány a postupně se během hojení uvolňují³³. O tuto skupinu biomateriálů je proto v současnosti mimořádný zájem. Nevýhodou systémů na bázi kolagenu je jejich nízká odolnost vůči enzymatické degradaci. Proto je nutné kompozitní systémy stabilizovat, např. přidávkem různých typů zhašičů nebo lapačů reaktivních radikálových meziproductů enzymatických reakcí.

Je účelné seřadit množství kolagenových lékařských preparátů nezávisle na výchozím materiálu a výrobním postupu podle druhů a použití (tabulka IV).

Ze střev stočená šicí vlákna („catgut“) patří již staletí k chirurgickému náčiní. Přes rostoucí význam syntetických šicích vláken, např. na bázi polyamidu, polyesteru nebo polymerů kyseliny mléčné, která nejsou absorbovatelná nebo jsou zpožděně resorbovatelná, fyziologicky jsou absolutně indiferentní a většinou levnější, má catgut své pevné místo na operačním sále. Jeho resorbovatelnost se řídí zesíťováním solemi chromu.

Kolagenové plochy se v medicíně používají buď jako přírodní vláknenné pletivo (kožní štípenky), jako netkané textilie nebo fixované pěny, přičemž cesta k oběma posledně

jmenovaným kategoriím vede buď přes mechanické rozmělnění vláknenného pletiva nebo přes rekonstituci z roztoku. Kožní štípenky, zbavené nekolagenových součástí do značné míry alkalickou, kyselou nebo enzymatickou úpravou, vysušené zmrazením a sterilizované radiačně-chemicky, se používají k zakrytí ran, především popálenin³⁴. Rovněž disperze kolagenových vláken formované do membrán se hodí k dočasnému zakrytí rány. V kolagenových membránách mohou být inkorporovány i baktericidní přísady a látky, které podporují růst kostí. Práškový kolagen byl zpracován do spreje, který lze nastříkat na rány jako bandáž. Membrány z atelokolagenu (kolagen enzymaticky zbavený koncových rozvětvených částí molekul, tzv. telopeptidů) se používají nejen na zakrývání ran, ale i k opravě cév, náhradě šlach a pro pěstování buněčných kultur *in vitro*. Obávanému vysušení ran zakrytých kolagenem je možno zabránit mj. kombinací s plastovou fólií, která pokrývá povrch a je prodyšná (např. Goretex nebo Poromeriks). Netkané textilie z kolagenu se užívají pro zastavení krvácení. Hemostyptika na bázi kolagenu dnes patří k základnímu vybavení při hojení operačních ran, patří sem např. výrobky firmy HYPRO, Otrokovice. Resorbovatelnost kolagenu se dá řídit síťujícími reakcemi, např. reakcí s již zmiňovaným glutaraldehydem. Houbovitě resorbovatelné polymery, např. na bázi kyseliny mléčné, je možné plnit atelokolagenem z vepřové kůže a používat jako náhradu pokožky³⁵.

I když v současné době stále více převládají syntetické cévní a orgánové protézy, přesto se vždy uvažuje kombinace s rozpustným kolagenem, aby se optimálně redukovala propustnost cév, podnítil růst buněk a zlepšila biokompatibilita protéz s živou tkání. Navrhují se nové látkové kombinace: např. vytlačované teflonové hadice s velkou pórovitostí mohou být opatřeny „vnitřním vyložením“ směsí chitosanu a kolagenu, nebo roubovací polymerace kolagenu na polytereftalátové protézy pomocí kyseliny akrylové². Kolagenová vlákna kombinovaná s fosforečnanem vápenatým se s výhodou používají jako náhrada kostí a zubů^{36,37}. Přídavek zydermu (vstříkovaného kolagenu) k fosforečnanu vápenatému podporuje lé-

Tabulka IV
Kolagenové medicínské preparáty podle druhu a oboru použití

Výrobky	Použití
Šicí vlákna – catgut	chirurgický šicí materiál zakrývání ran/léčení ran
Kolagenová vlákna – z roztoků – ze suspenzí – z membrán	zastavování krvácení (hemostatika) náhrada pokožky náhrada cév/vykládání cév
Kolagenové plochy přirozená pokožka membrány, bandáže netkané textilie pěny/ houby	orgánové implantáty plniva pro implantáty
Cévy/orgány	vazivové opravy lepení tkání proliferace buněk
Kolagenové prášky, lepidla, pudry a spreje	péče o pleť

čení kostí více než pouhá výplň z hydroxyapatitu. Jako příklad může sloužit kompozitní materiál obsahující hydroxyapatit a atelokolagen, určený na výplně různých kostních defektů³⁸, vyvinutý na Chemickotechnologické fakultě STU v Bratislavě pod názvem BIOVAK. Atelokolagen v kompozitu vyvolá rychlejší prorůstání implantátu novou kostí a potlačuje tvorbu fibrózní vrstvy na jejich rozhraní. Další aplikační výhodou takového kompozitu je jeho tvarovatelnost při současném zachování kompaktnosti.

Nejnovejší vývoj léčení ran se týká použití mikrokapslí (fibrilovaný kolagen v podobě koacervátu), upravených roztoky polysacharidů a růstovými buněčnými faktory. Zájem si zasluhuje výroba kolagenových částic v rozsahu mikro- a nanometrů, které jsou „napuštěny“ účinnou látkou a dají se vsťikovat. V chirurgii získává stále větší význam lepení místo šití. K tradičním fibrinovým lepidlům se nyní přidružují kolagenová lepidla, která se připravují reakcí kolagenu s kyselinou antrachinon-1,5-disulfonovou a anhydridem kyseliny glutarové. Značná pozornost je u medicínských aplikací kolagenu věnována také zábraně alergických reakcí. Aktuální je již zmiňované potahování syntetických polymerních náhrad a příprava kontaktních čoček v kombinaci s polyakryláty³⁹.

Autoři považují za milou povinnost poděkovat za finanční podporu tohoto výzkumu MŠMT ČR (granty VS 96108, CZT 90015, CZ 690019).

LITERATURA

- Blažej A., Deyl Z., Adam M., Galatík A., Michlík I., Smejkal P.: *Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín*. VEDA, Bratislava 1978.
- Reich G.: *Leder* 46, 2 (1995).
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.: *Molecular Biology of the Cell*, 2. vyd., str. 808. Garland Publishing, New York 1989.
- Mládek M.: *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu*, str. 33. SNTL, Praha 1971.
- Jackson D. S.: *Biochem. J.* 56, 699 (1954).
- Bella J., Brodsky B., Berman H. M.: *Structure* 3, 893 (1995).
- Nagarajan V., Kamitori S., Okuyama K.: *J. Biochem. (Tokyo)* 125, 310 (1999).
- Vodrážka Z., Krechl J.: *Bioorganická chemie*, str. 38. SNTL, Praha 1991.
- Hörmann H.: *Leder* 11, 173 (1960).
- Morawetz H.: *Chování makromolekul v roztoku*, str. 352. Academia, Praha 1971.
- Anselme K., Petite H., Herbage D.: *Matrix* 12, 264 (1992).
- Gustavson K. H.: *The Chemistry and Reactivity of Collagen*. Academic Press, New York 1956.
- Babel W.: *Chem. Unserer Zeit* 2, 86 (1996).
- Boedtker H., Doty P.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4267 (1956).
- Highberger J. H., Gross J., Schmitt F. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37, 286 (1951).
- Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 41, 1 (1955).
- Jackson D. S., Fessler J. F.: *Nature* 176, 169 (1955).
- Hattori S., Adachi E., Ebihara T., Shirai T., Someki I., Irie S.: *J. Biochem. (Tokyo)* 125, 676 (1999).
- Kuzma P., Odorosio G. (National Patent Development Corp.): WO 83/00339; Chem. Abstr. 98, 166936 (1983).
- Nimni M. E., Cheung D. T., Strates B., Kodama M., Sheikh K., v knize: *Collagen* (Nimni M.E., ed.), sv. III. *Biotechnology*, kap. 1. CRC Press, Boca Raton 1988.
- Nimni M. E., Cheung D. T., Strates B., Kodama M., Sheikh K.: *J. Biomed. Mater. Res.* 21, 741 (1987).
- Ramachandran G. N.: *Treatise of Collagen*, sv. I *Chemistry of Collagen*. Academic Press, New York 1967.
- Veis A.: *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*. Academic Press, New York 1964.
- Weadock K., Olson R. M., Silver F. H.: *Biomater. Med. Devices. Artif. Organs* 11, 293 (1984).
- Miyata T., Taira T., Noishiki Y., v knize: *Biologically Modified Polymeric Biomaterial Surfaces* (Piskin E., ed.), str. 195. Elsevier Applied Science, London 1992.
- Vizárová K., Bakoš D., Reháková M., Macho V.: *Biomaterials* 15, 1082 (1994).
- Richards F. M., Knowlens J. R.: *J. Mol. Biol.* 14, 231 (1968).
- Monsan P., Puzo G., Mazarquil J.: *Biochimie* 57, 1281 (1975).
- Kirkeby S., Moe D.: *Acta Histochem.* 79, 115 (1986).
- Cheung D. T., Nimni M. E.: *Connec. Tissue Res.* 10, 187 (1982).
- Keogh J. R.: US 5 821 343 (1998).
- Kinoshita Y., Kuzuhara T., Kirigakubo M., Kobayashi M., Shimura K., Ikada Y.: *Biomaterials* 14, 546 (1993).
- Hirasawa S., Fujioka I., Miyata N., Yamashita H.: *Biomater. Res.* 18, 149 (1997).
- Yannas I. V., v knize: *Material Science and Technology: A Comprehensive Treatment* (Williams D. F., ed.), sv. 14 *Medical and Dental Materials*, str. 180. VCH, Weinheim 1992.
- Koide M., Osaki K., Konishi J., Oyamada K., Katakura T., Takahashi A.: *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 79 (1993).
- Shoshan S., Yaffe A., v knize: *Collagen* (Nimni M. E., ed.), sv. III *Biotechnology*, kap. 8. CRC Press, Boca Raton 1988.
- Crigger M., Bogle G. C., Garrett S., Gantes B. G.: *J. Periodontal* 67, 403 (1996).
- Bakoš D.: *Quark* 10, 14 (1996).
- Kuzma P., Odorosio G. (National Patent Development Corp.): WO 82/02716; Chem. Abstr. 97, 223005 (1982).

P. Peterková^a and L. Lapčík, Jr.^b (^a*Institute of Physical and Consumer Chemistry, Chemical Faculty, Technical University, Brno*, ^b*Institute of Physics and Materials Engineering, Technological Faculty, Zlin, Technical University at Brno*): **Collagen – Properties, Modifications and Applications**

Chemical modifications for obtaining specific and the most efficient chemical, physical and material properties of the collagen-based matrices were reviewed. Possible chemical reactions of collagen with functional reagents (acylation, esterification, deamination and deguanidination) and polymerization reactions (aldehyde condensation, periodate oxidation) were discussed. Finally, several technological procedures for the surface immobilization of collagen on synthetic polymers were summarized.

CHEMICKÉ ASPEKTY IMOBILIZOVANÝCH SYSTÉMOV V BIOTECHNOLÓGIÁCH

MARIÁN NAVRÁTIL a ERNEST ŠTURDÍK

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: navratil@chelin.chtf.stuba.sk

Došlo dňa 13.IX.1999

Kľúčové slová: imobilizácia, techniky imobilizácie, imobilizačné metódy, imobilizačné materiály, bioaktívny komponent, biotechnológia, fermentácia

Obsah

1. Úvod
2. Bioaktívna časť imobilizovaných systémov
3. Metódy a nosiče pre imobilizáciu
 - 3.1. Uzavretie biokomponentu do nosiča
 - 3.2. Viazanie na povrch nosiča
 - 3.3. Kovalentné uchytenie
 - 3.4. Ďalšie imobilizačné metódy
4. Aplikácie imobilizovaných systémov v biotechnológii
 - 4.1. Potravinárske aplikácie imobilizovaných systémov
 - 4.2. Ostatné biotechnológie využívajúce imobilizované systémy
5. Záver

1. Úvod

Biotechnológie využívajúce imobilizované systémy znamenali v posledných pätnástich rokoch prudký rozvoj. Imobilizácia ako proces ukotvenia bioaktívneho komponentu má v porovnaní s klasickými metódami využívajúcimi voľné enzýmy, bunky, bunkové organely a tkanivá mnoho výhod. Pri použití imobilizovaných buniek odpadá nutnosť separovania biomasy z fermentačného média, je možné jej opakované použitie v ďalšej fermentácii, často v omnoho vyššej koncentrácii ako pri použití voľných buniek¹. Nasadenie imobilizovaných buniek môže v značnej miere prispieť ku kontinuálizácii celého fermentačného procesu.

Tento článok si dáva za úlohu definovať najznámejšie imobilizačné metódy, popísať materiály využívané jednotlivými technikami a charakterizovať interakcie biokomponent – nosič. V závere ponúka orientačný prehľad aplikácií imobilizovaných systémov v potravinárskych i nepotravinárskych technológiách.

2. Bioaktívna časť imobilizovaných systémov

Ako prvé bioaktívne komponenty boli v imobilizovaných systémoch použité enzýmy. Prvá zmienka o použití imobi-

lizovaného biokatalyzátora pochádza z roku 1908, keď Michaelis a Ehrenreich imobilizovali invertázu a proteolytické enzýmy na drevné uhlie a niektoré anorganické nosiče². Po tejto pionierskej práci sa ďalšie práce objavujú až v polovici päťdesiatych rokov. Referencie o použití imobilizovaných biokatalyzátorov na biotechnologické produkcie sú staré takmer 30 rokov³. Dnes sú však ako biokomponenty omnoho atraktívnejšie celé bunky, kde odpadajú náklady na izoláciu a purifikáciu enzýmu. Ako ďalšie možné varianty pripadajú do úvahy subcelulárne organely, huby, rastlinné pletivá a živočíšne tkanivá. Veľmi účinná je imobilizácia viacerých biokatalyzátorov súčasne, ktorej hovoríme koimobilizácia. Nasledovné odstavce stručne charakterizujú jednotlivé typy biokomponentov a uvádzajú niekoľko príkladov ich aplikácie.

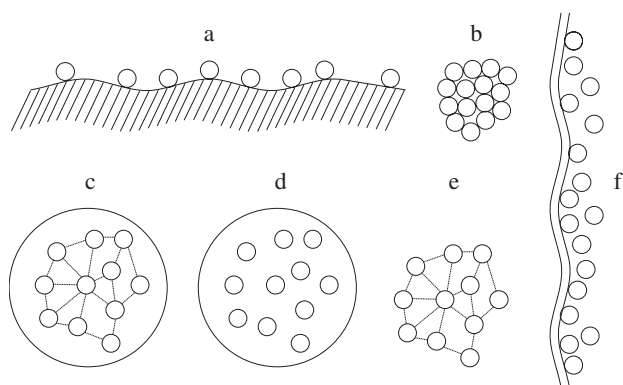
Použitie enzýmov v imobilizovaných systémoch má oproti iným bioaktívnym komponentom niekoľko výhod, z ktorých najdôležitejšie sú ich špecificita, nenákladné získavanie produktu a jednoduché prevádzkové vlastnosti. Ďalšou, nie nepodstatnou výhodou sú menšie nároky na objem reaktora (z dôvodu, že na rozdiel od buniek nie je prítomná nekatalytická biomasa) a nižšia citlivosť na kontamináciu reakčného prostredia. Medzi dôležité aplikácie imobilizovaných izolovaných enzýmov patrí použitie lipáz na produkciu monoacylglycerolov⁴ alebo štruktúrnych lipidov obsahujúcich esenciálne mastné kyseliny⁵, produkcia rôznych sacharidov ako L-fruktóza alebo L-manóza za použitia imobilizovaných enzýmov⁶, či uplatnenie imobilizovanej aminoacylázy na produkciu L-fenylalanínu⁷.

Celé bunky v imobilizovaných systémoch v poslednej dobe takmer nahradili použitie enzýmových preparátov z dôvodu už spomínanej redukcie nákladov na izoláciu enzýmu. Navyše sa enzýmy v celých bunkách vyznačujú vyššou stabilitou ako enzýmy imobilizované v čistom stave. Preto sa väčšina prác z tejto oblasti zaoberá imobilizovanými bunkami či už baktérií alebo kvasiniek. Za celú plejádu aplikácií imobilizovaných buniek možno spomenúť produkciu etanolu bunkami *Saccharomyces cerevisiae*⁸, *Kluyveromyces marxianus*⁹ a *Zymomonas mobilis*¹⁰ alebo produkciu organických kyselín (kyseliny glutámovej bunkami rodu *Brevibacterium*¹¹, citrónovej kvasinkami *Candida guilliermondii*¹², kyseliny mliečnej mliečnymi baktériami *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*¹³, propiónovej¹⁴ a octovej¹⁵ baktériami rodu *Propionibacterium*).

Použitie mikroskopických húb sa spája hlavne s produkciou organických kyselín (kyselina glukónová¹⁶, citrónová¹⁷, fumarová¹⁸ s využitím húb rodu *Aspergillus* alebo *Rhizopus*) a antibiotík (cefalosporíny¹⁹, penicilíny²⁰). Huby sú tiež významnými producentmi enzýmov, napr. amyláz²¹.

Farmaceutiká, dochucovadlá a farbivá rastlinného pôvodu sú známe už dlhý čas. Dôvodom, prečo nedošlo k masovejšiemu rozšíreniu rastlinných pletív v imobilizovaných systémoch je obtiažne získavanie produktu z rastlinných buniek. Napriek tomu sú zmienky o použití imobilizovaných pletív vyšších rastlín na produkciu antrachinónu²² alebo skopolínu²³.

Využitie imobilizovaných živočíšnych buniek prináša ešte viacej problémov spojených hlavne s potrebou komplexnej-



Obr. 1. Najpoužívanejšie imobilizačné techniky (a – adsorpcia na pevný nosič, b – flokulácia, c – uchytenie do gélu so sieťovaním, d – uchytenie do gélu, e – kovalentné viazanie, f – zadržanie za membránu)

šieho média, citlivých buniek a ich pomalého rastu. Napriek tomu možno nájsť v literatúre odkazy s použitím prevažne cicavčích buniek v imobilizovaných systémoch na produkciu imunoglobulínov²⁴ alebo monoklonálnych protilátok²⁵.

3. Metódy a nosiče pre imobilizáciu

Imobilizácia je proces, v ktorom sa za použitia jednej z imobilizačných metód zabráni biologickému materiálu pohybovať sa nezávisle od svojho okolia. Rozoznávame päť základných typov imobilizačných metód, z ktorých môžu vzniknúť ďalšie ich vzájomnou kombináciou a modifikáciou (obr. 1):

- uzavretie do nosiča,
- viazanie na povrch nosiča,
- kovalentné uchytenie,
- zadržanie za membránu,
- flokulácia.

Nakoľko sa jednotlivé imobilizačné metódy líšia mechanizmom i samotnou podstatou imobilizácie, je veľmi ťažké ich navzájom porovnávať. Každá z metód je však charakteristická určitými vlastnosťami. Úspešnosť metódy je však v značnej miere závislá na správnom výbere nosiča²⁶. Preto sa použitie imobilizačných materiálov posudzuje podľa mnohých kritérií, z ktorých najdôležitejšie sú pevnosť, tvar, stabilita, hydrofilita, pórovitosť, reaktivita, obnoviteľnosť a ekonomická náročnosť²⁷. Výhody a nevýhody jednotlivých imobilizačných metód zhrňuje tabuľka I.

3.1. Uzavretie biokomponentu do nosiča

Uzavretie, zväčša do matrice gélu, je v podstate „uväznenie“ molekúl enzýmu alebo buniek do trojrozmerného matrixu, ktorého póry sú menšie ako enzým, príp. bunka. Uzavretie do gélu kvôli jeho nenáročnosti na prípravu, miernosti a širokej použiteľnosti je pravdepodobne najpoužívanejšou zo všetkých imobilizačných metód. V originálnej anglickej literatúre sa tento typ často označuje ako „entrapment“.

Pre imobilizáciu metódou uzavretia je k dispozícii široká paleta nosičov zo skupiny polysacharidov, proteínov alebo syntetických polymérov.

Tabuľka I

Hlavné výhody a nevýhody rôznych imobilizačných techník (A-NN – adsorpcia/neutrálny nosič, A-NN – adsorpcia/nabitý nosič, F – flokulácia, U-PP – uzavretie/prírodný polymér, U-SP – uzavretie/syntetický polymér, KV – kovalentné viazanie, UM – uzavretie za membránu)

Klasifikácia	A-NN	F	U-PP	U-SP	U
	A-CN			KV	
Výhody					
jednoduchosť	×	×	×	(×)	×
miernosť	×	×	×	×	×
nízka cena	×				
obnoviteľnosť	×	×			×
trvácnosť					×
Nevýhody					
uvoľňovanie buniek	×		×		
difúzne limitácie			×	×	×
vysoká cena				×	×
toxická				×	×
citlivosť na zmeny pH		×			

Tabuľka II

Prehľad materiálov používaných pre uzavretie biokomponentu do gélu

Typ	Typické materiály
Jednoduché makromolekuly gelujúce zvýšením alebo znížením teploty	agar, agaróza, chitozan, želatína, vaječný bielok, glyoxilagaróza
Iontropné gély a makromolekuly s bi- a multivalentnými kationmi	alginát, pektán, κ-karagénan
Syntetické polyméry pripravované chemickou alebo fotochemickou geláciou	epoxidové živice, polyakrylamid, polymetakrylamid, polyuretán

Matrica, do ktorej sa bunky uzavierajú, je zvyčajne označovaná ako gél. Je jasné, že gél, v ktorom je biokomponent imobilizovaný, vytvára difúziu bariéru pre prienik substrátu a produktu. Preto je nutné vzhľadom na ich rozmery zvoliť aj správny typ gélu. Difúzne limitácie môžu byť niekedy aj výhodou, keď póry gélu zamedzia prístupu nežiadúcej vysokomolekulovej látky k bioaktívnemu komponentu. Avšak aj bunky samotné predstavujú bariéru pre prístup substrátu. Sú ňou bunkové steny alebo plazmatické membrány, ktorých permeabilizáciou môžeme dosiahnuť zvýšenie permeability imobilizovaného systému.

Materiály použité pre imobilizáciu typu „entrapment“ môžeme rozdeliť na 3 základné skupiny rovnako, ako to prezentuje tabuľka II.

Jednotlivé typy použitých gélových nosičov budú podrobnejšie popísané v nasledujúcich odstavcoch.

Agar

Agar je prírodný polymerický komplexný polysacharid získavaný z rôznych rodov morských rias. Je priamo dostupný v predajnej sieti zásobujúcej mikrobiologické laboratória. Priemerná cena 1 kg agaru pre potravinárske účely bola v roku 1993 19,72 USD, čím je najdrahším z bežných hydrokoloidných gélov²⁸. Pre imobilizáciu sa používa 2–4 % roztok agaru rozpusteného pri zvýšenej teplote (zvyčajne okolo 50 °C), ktorý po vychladení stuhne na gél. Existuje niekoľko spôsobov prípravy agarových imobilizátov: vylíatie agaru so suspenziou buniek na platňu v potrebnej hrúbke a narezanie na malé kocky, prípadne kvapkanie suspenzie do ľadového tlmivého roztoku. Vo všeobecnosti sa však agarové gély vyznačujú pomerne nízkou mechanickou pevnosťou.

Príkladom použitia agaru ako imobilizačného materiálu môže byť produkcia termostabilnej α -amylázy imobilizovanými baktériami *Bacillus brevis*²⁹ alebo konverzia D-xylózy na xylitol bunkami *Saccharomyces cerevisiae*³⁰.

Agaróza

Agaróza je jednou zo zložiek agaru. Pri separácii a purifikácii sú odstránené niektoré esterové skupiny. Je dostupná v rôznych stupňoch čistoty s príslušnými fyzikálnymi vlastnosťami. Spracováva sa podobne ako agar.

Agaróza bola napríklad použitá na imobilizáciu glutamát-racemázy pri produkcii D-glutamátu z L-glutamátu³¹ alebo pri produkcii γ -dekalaktónu imobilizovanými bunkami *Sporidibolus salmonicolor*³¹.

κ -Karagénan

κ -Karagénan je podobne ako agar komplexný polysacharid izolovaný z morských rias. V poslednej dobe sa karagénan stáva materiálom čoraz obľúbenejším, lebo oproti agaru je možné ho tepelne sterilizovať. Karagénan je používaný v potravinárskom priemysle aj ako zahusťovadlo a gélotvorný prostriedok. V géli býva zvyčajne zastúpený v koncentrácii okolo 4 %. Spracováva sa podobne ako agar kvapkaním do ľadovej vody. Samotný karagénan má však veľmi nepriaznivé mechanické vlastnosti, preto býva zvyčajne stabilizovaný vhodnou koncentráciou draslíka (2–4 %).

Guličky κ -karagénanu o veľkosti 1,2–2,5 mm s koimobilizovanými bunkami *Zymomonas mobilis* a glukoamylázou boli použité pri etanolovej fermentácii škrobu³³. Gély s koncentráciou κ -karagénanu 2, 4 a 6 % boli použité na imobilizáciu buniek *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* pri produkcii kyseliny propiónovej³⁴.

Proteíny

Prírodné proteíny vďaka schopnosti koagulovať slúžia tiež ako materiály pre uzavretie biokatalyzátora do svojej štruktúry. Z proteínov je možné na imobilizačné účely použiť napríklad kolagén alebo vaječný bielok. Ďalším z prírodných proteínov využívaných pre účely imobilizácie je želatína. Nakoľko proteíny v dôsledku svojej štruktúry obsahujú veľké množstvo karboxylových a aminoskupín, umožňujú ľahko naviazať biokomponent prostredníctvom kovalentnej väzby. Jedným zo spôsobov použitia je pokrytie pevného nosiča vrstvou

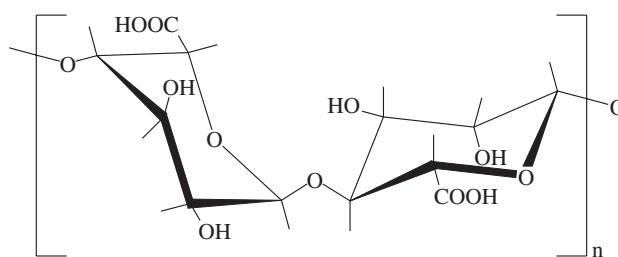
želatíny aktivovanej sieťovacím činidlom a následného naviazania enzýmu alebo buniek³⁵.

Alginát

Alginát sa už dlhé roky používa ako gelujúce činidlo v pudingoch, ovocných plnkách, dezertných rôsloch a štrukturovaných potravinách, ako látka viažúca vodu v mrazených potravinách, emulgátor v šalátových dressingoch a stabilizátor v pive, ovocných džúsoch, šťavách a omáčkach³⁶. Po chemickej stránke je to kyselina alginová, respektíve jej sodná soľ. Kyselina alginová je heteropolymér L-glukurónovej a L-manurónovej kyseliny, ale pomer jednotlivých kyselín kolíše v závislosti od zdroja. Štruktúru manuronát-glukurónátového komplexu znázorňuje obrázok 2.

Ionotropná gelácia alginátu sodného s multivalentným kationom, zvyčajne vápenatým, je pravdepodobne najpoužívanejšou metódou imobilizácie. Ionotropná gelácia je na realizáciu veľmi nenáročná. Prakticky sa uskutočňuje tak, že suspenzia biokomponentu v roztoku alginátu sodného (1–4 %) sa kvapká do roztoku chloridu vápenatého (s koncentráciou 0,125–0,5 mol.dm⁻³). Táto metóda poskytuje veľmi jednoduchú prípravu guľčiek o veľkosti 0,5–3 mm, avšak chelatujuce činidlá (citrátové alebo fosfátové tlmivé roztoky) účinne rozrušujú štruktúru buniek. Pomerne slabá štruktúra gélu tiež zapríčiňuje únik buniek, hlavne pri dlhotrvajúcom procese spojenom s rastom buniek. Bunky sú tiež pri miešaní náchylné na mechanické poškodenie. Jednoduchou metódou na zvýšenie stability je vysušenie guľčiek, pri ktorom dôjde k nevratnému zmenšeniu ich objemu. Určité zvýšenie stability bolo dosiahnuté tiež použitím trivalentných kationov³⁷. Aplikáciou dusičnanu hlinitého sa dosiahlo dvojnásobné zvýšenie stability gélu. Vytvrdenie guľčiek je možné dosiahnuť aj aplikáciou bivalentného činidla, napríklad glutardialdehydu³⁸.

Alginát môže byť použitý na imobilizáciu akéhokoľvek typu buniek zo zachovaním maximálnej biokatalytickej aktivity. Bol použitý na imobilizáciu baktérií, kvasiniek, húb a vyšších rastlín. V literatúre existuje nespočetné množstvo odkazov na použitie alginátu ako imobilizačného materiálu. Za všetky možno spomenúť napríklad sekundárnu fermentáciu pri výrobe šumivého vína s imobilizovanými kvasinkami³⁹, produkciu halofilnej α -amylázy imobilizovanými bunkami *Halobacterium salinarium*⁴⁰, produkciu xylitolu rekombinantným kmeňom *Saccharomyces cerevisiae*⁴¹, produkciu L-alanínu baktériami z rodu *Pseudomonas*⁴², alebo etanolovú fermentáciu kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*^{43–45}.



Obr. 2. Štruktúra manuronát-glukurónátového bloku tvoriaceho alginátový polymer. Kyselina glukurónová (vľavo) je v komplexe viazaná 1,4-glykozidovou väzbou, rovnako ako kyselina manurónová (vpravo)

Pektát

Pektát patrí do skupiny pektínových biopolymérov, ktoré nachádzajú svoje uplatnenie aj v potravinárskom priemysle ako želirujúce látky v džemoch a marmeládach. Na rozdiel od alginátu, pektáty majú rastlinný pôvod a vyrábajú sa deesterifikáciou pektínov – rastlinných polysacharidov²⁷. Rovnako ako alginát, aj pektát je svojim princípom ionotropnej gelácie veľmi nenáročný a pomerne lacný. Ako materiál pôsobí pri imobilizácii na biokatalyzátor veľmi mierne, takmer úplne bez negatívnych biochemických, resp. fyziologických zmien. Pektát vápenatý nie je len alternatívou alginátového gélu. V porovnaní s ním vykazuje aj lepšie mechanické vlastnosti, je menej citlivý na chelatujúce ióny a ďalšie chemické látky rozrušujúce štruktúru gélu. Možno preto býva operačná stabilita pektátových imobilizátov vyššia v porovnaní s alginátovými gémi^{46,47}.

Napriek svojim vlastnostiam nie je zďaleka tak rozšírený ako alginát. Pektátový gél bol použitý na imobilizáciu buniek *Kluyveromyces marxianus* ako zdroja β -galaktozidázy pri hydrolýze laktózy⁴⁶ alebo na imobilizáciu baktérií mliečneho kvasenia s koncentráciou až 10^{14} buniek / l gélu pri fermentácii so zvýšenou aktivitou tvorby laktátu⁴⁸.

Chitozan

Alternatívnym prístupom k použitiu polyaniónov (alginát, pektát) je použitie polykatiónov s následným sieťovaním polyvalentným aniónom. Umožňuje riešiť problémy spojené s cheláciou vápnika v géloch alginátu vápenatého. Biokomponent je primiešaný do viskózneho chitozanu rozpusteného v zriedenej kyseline octovej a kvapkaný do 1,5 % roztoku polyfosforečnanu sodného. Nezanedbateľný je vplyv pH na stabilitu a kvalitu guľičiek. Ďalšie zvýšenie stability chitozanového gélu možno dosiahnuť sieťovaním glutaraldehydom.

Chitozan ako nosič bol použitý napríklad pri produkcii γ -dekalaktónu z ricinolénovej kyseliny bunkami *Sporidiobolus salmonicolor*³².

Polyakrylamid

Polyakrylamidy sú syntetické polyméry, ktoré sa vyrábajú so širokým rozmedzím vlastností závislých na kvalite zložiek a podmienkach počas ich prípravy. Podobný typ gélu sa používa napríklad pri elektroforetickej separácii molekúl. Pri príprave gélu reaguje monomér s polyfunkčným sieťovacím činidlom. Monomér je zvyčajne akrylamid, hoci niekedy je možné použiť aj metakrylamid. Bifunkčným činidlom je obyčajne *N,N'*-metylén-bis-akrylamid, skrátene BIS. Poškodeniu buniek môžeme čiastočne zamedziť použitím tetrametyletyléndiamínu (TEMED) a peroxosíranom sodným (SPS) alebo amónnym, ktorý je iniciátorom polymerizácie. SPS zvýši rýchlosť polymerizácie a skrátí dobu styku biokomponentu s toxickým monomérom akrylamidom. Polymerizácia sa uskutočňuje vždy v prítomnosti vhodného tmivého roztoku. Štruktúra polyakrylamidu (PAA) obsahuje dutiny schematicky znázornené na obrázku 3, do ktorých sa pri imobilizácii uchyť biokatalyzátor.

2 % sieťovaný polyakrylamidový gél bol použitý na imobilizáciu bakteriálneho kmeňa *Bacillus mycoides* pri produkcii alkalickéj proteázy⁴⁹, 10%-ný PAA pri produkcii celobiázy

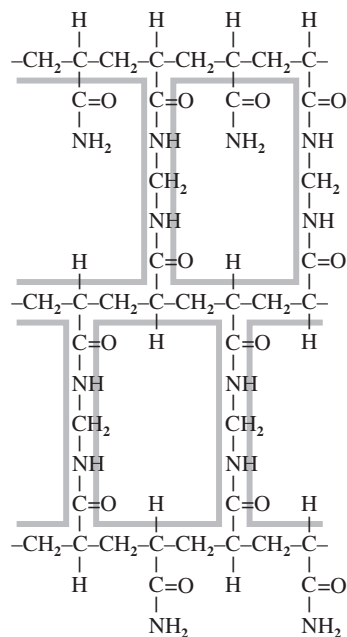
imobilizovanou kultúrou *Aspergillus niger*⁵⁰ alebo na zvýšenie produkcie lipázy kvasinkami *Candida rugosa*⁵¹.

Ďalšie syntetické polyméry

Z ďalších syntetických polymérov možno ešte spomenúť pomerne rozšírený polyuretán, prípadne 2-hydroxy-etylmetakrylát (HEMA), ktorý polymerizuje pôsobením γ žiarenia. Značnú pozornosť si v poslednej dobe získal polyvinylalkohol, ktorý či už po pôsobení chemických činidiel, foto-sieťovaním⁵² alebo zmrazením (kryogél)⁹ predstavuje kvalitný nosič pre imobilizáciu.

3.2. Viazanie na povrch nosiča

Imobilizácia adsorpciou je proces založený na vytvorení vzájomnej väzby nosič–bunka, resp. nosič–enzým. Z väzieb sa najčastejšie uplatňujú iónové a vodíkové väzby, obyčajne značne slabšie ako kovalentné väzby. Elektrostatické sily sú významné hlavne v počiatkovej fáze adsorpcie – vonkajší povrch buniek je zvyčajne nabitý a spravidla obsahuje aj množstvo ionizovateľných skupín. Z dôvodu, že ako nosiče sa používajú najmä prírodné alebo inertné materiály, vyvoláva tento typ imobilizácie len veľmi nízke poškodenie biologického materiálu, a preto sa imobilizácia adsorpciou považuje za jednu z najmiernejších imobilizačných metód. Je však metódou pomerne nešpecifickou, a tak jednak kvalita nosiča i stav biokomponentu majú na jej účinnosť značný vplyv. Ďalším z problémov pri viazaní na nosič je postupné uvoľňovanie buniek z jeho povrchu. Tieto môžu spôsobiť vážne problémy dané znižovaním biokatalytickej účinnosti imobilizátu i kontamináciou systému. Prudké miešanie alebo intenzívna produkcia plynnej fázy môžu tiež spôsobiť významnú stratu na aktivite v dôsledku uvoľňovania biokatalyzátora.



Obr. 3. Schematické znázornenie štruktúry akrylamid-*N,N'*-metylén-bis-akrylamidového kopolyméru (PAA) a jeho štruktúrnych charakteristík

V porovnaní s uzavretím do gélu možno jednoduchou adsorpciou pojať na gram nosiča omnoho menej biokatalyzátora. Navyše u pórovitých nosičov musí byť veľkosť pórov zvolená vhodne k použitému bioaktívnemu komponentu. Materiály používané na imobilizáciu adsorpciou môžeme rozdeliť na 3 hlavné skupiny: anorganické nosiče, organické materiály a iónovo-výmenné živice.

Imobilizácia zväčša na anorganické nosiče sa môže uskutočniť v troch modifikáciách:

- adsorpciou bioaktívneho katalyzátora priamo na povrch nosiča,
- kovalentné naviazanie biokatalyzátora na nosič,
- pokrytie povrchu nosiča polymérom.

Samotná absorpcia umožňuje len pomerne slabú väzbu biokatalyzátora na nosič. Žiaduce sú preto nosiče s veľkým počtom funkčných skupín, aby sa predchádzalo nežiadúcemu uvoľňovaniu buniek z povrchu nosiča.

Na kovalentné naviazanie sa používajú bifunkčné a polyfunkčné činidlá, ktoré cez svoju molekulu zabezpečia naviazanie biokomponentu k nosiču. Najpoužívanejším z nich je glutardialdehyd⁵³ (GDA). Spôsob naviazania enzýmu na nosič pomocou GDA je znázornený na obrázku 4.

Na účely pokrytia nosiča vrstvou polyméru bolo odskúšané použitie organických silánov, polyetylénimínu^{7,13}, polytri-metylpropántriakrylátu alebo poly-(*N*-benzyl-4-vinylpyridíniumchlorid-ko-styrénu)⁵⁴.

Anorganické nosiče

Výhody anorganických nosičov ako značná mechanická odolnosť, rezistencia voči rozpúšťadlám a biologickému poškodeniu, ich dostupnosť a pomerne nízka cena z nich spravili najatraktívnejšie materiály používané pre imobilizáciu adsorpciou. Zvolený nosič musí byť v reakčnom prostredí inertný, ľahko manipulovateľný, regenerovateľný a ekonomicky nenákladný. Anorganické materiály sú zvyčajne veľmi rigidné, preto sú odolnejšie voči obrusovaniu a deformácii. Z literatúry je známych mnoho materiálov ako kremeňové a korundové nosiče, uhličitan vápenatý, pórovité sklo, síran vápenatý, difosforečnan vápenatý, keramika, sklená vata, sinterované sklo a oxidy a hydroxidy kovov²⁷.

Kremeň, v pôvodnej literatúre označovaný aj ako „silica“ sa nachádza v dvoch formách: v prírode ako kryštalický minerál a synteticky pripravený amorfný materiál. Práve jeho amorfná forma sa používa ako materiál pre imobilizácie. Jednotlivé typy sa môžu od seba významne líšiť veľkosťou pórov, ako aj počtom hydroxylových skupín, ktoré sa uplatňujú pri samotnej imobilizácii. Jeho použitie bolo zaznamenané napríklad pri produkcii koenzýmov imobilizovanou NAD⁺-kinázou⁵⁵, či na imobilizáciu glyoxalázy pri produkcii S-laktoylglutatiónu z metylglyoxálu a glutatiónu⁵⁶.

Sklo si pre svoju inertnosť získalo svoje miesto v imobilizovaných systémoch, hlavne vo forme s uniformnou veľkosťou pórov, označovanou ako controlled-pore-glass (CPG). Na trhu je dostupná široká paleta CPG s nominálnou veľkosťou pórov 75–3000 Å (Sigma, 1998). Dostupné sú aj sklá nesúce funkčné skupiny. Pórovité sklo bolo použité napríklad na imobilizáciu pululanázy a aminoglukozidázy⁵⁷ alebo na imobilizáciu cyklo-dextrín-glyko-yltransferázy na produkciu β-cyklo-dextrínu zo škrobu⁵³. Osvedčilo sa aj na imobilizáciu buniek, o čom svedčí viazanie buniek *Phanerochaete*

chryso-sporium za účelom produkcie lignínperoxidázy⁵⁸.

Keramické nosiče, podobne ako sklo, boli použité na imobilizáciu enzýmov aj buniek v širokej palete foriem a tvarov. Najčastejšie sú však používané v tvare guľičiek s vysokým špecifickým povrchom. Ako príklady použitia môžu slúžiť produkcia štrukturovaných lipidov imobilizovanou lipázou⁵ a výroba sójovej omáčky za použitia imobilizovaných baktérií mliečného kvasenia⁵⁹. Duté keramické guľičky s priemerom 50–75 μm boli použité aj pri vývoji novej metódy imobilizácie buniek označovanej ako hydrodynamická depozícia⁶⁰.

Značnú pozornosť získali aj sol-gély, materiály prevažne na báze kremíka, ktoré zaujali hlavne svojou mechanickou pevnosťou a odolnosťou voči otieraniu⁶¹. Z ďalších anorganických materiálov je známe použitie alumíny (oxidu hlinitého)^{59,62,63}, uhličitanu vápenatého, síranu vápenatého, difosforečnanu vápenatého⁴, pórovitého vulkanického minerálu kyslíku⁶⁴ alebo pórovitej nehrdzavejúcej ocele⁶⁵.

Organické nosiče

Použitie organických materiálov pre imobilizáciu už nie je natoľko rozšírené, ako to bolo v prípade materiálov anorganických. Z ich použitia plynie množstvo nevýhod. Spravidla nie sú úplne inertné a nie sú odolné voči mikrobiálnej degradácii. Avšak v závislosti na svojom pôvode sú zvyčajne pomerne lacné.

Z organických materiálov používaných pre imobilizáciu treba na prvom mieste uviesť celulózu. Je to polydisperzný polymér rastlinného pôvodu, ktorého základnou jednotkou je glukóza. Deriváty celulózy viažu enzýmy priamo iónovými väzbami, ale umožňujú aj kovalentné viazanie, pri ktorom nosič interaguje s aminoskupinami enzýmu. Hydroxylové skupiny zabezpečujú hydrofilný charakter nosiča, a tým chránia imobilizovaný enzým²⁷. Mimo celulózy⁶⁶⁻⁶⁸ sú v imobilizovaných systémoch využívané aj jej deriváty ako karboxymetylcelulóza, dietylaminocelulóza⁶⁹, trietylaminocelulóza⁷⁰ a nitrocelulóza⁷¹. Z ďalších možno spomenúť použitie drevených kociek⁷² alebo hoblín⁷³ ako nosiča pre imobilizáciu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* pri produkcii etanolu, piliny na imobilizáciu kvasiniek *Candida guilliermondii* na produkciu kyseliny citrónovej alebo semená obilnín na imobilizáciu mycélia *Aspergillus niger* pri produkcii glukooamylázy⁷⁴.

3.3. Kovalentné uchytenie

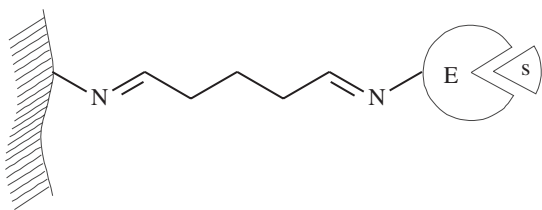
Z teoretického hľadiska je medzi kovalentným viazaním biokomponentu na nosič a sieťovaním napr. buniek navzájom zásadný rozdiel. V praxi to však už nie je také jednoznačné, lebo sa môžu bunky viazať na nosič práve tak ako navzájom medzi sebou. V literatúre je množstvo odkazov na kovalentné viazanie enzýmov, avšak ani viazanie celých buniek nie je nič mimoriadne. Kovalentné viazanie má však jednu nevýhodu: či už sa viažu enzýmy alebo bunky, sú vystavované reaktívnym skupinám, ktoré sa často vyznačujú toxickým efektom. Preto pri kovalentnom viazaní spravidla dochádza k zníženiu biokatalytickej aktivity. Ako je známe, samotné bunkové steny obsahujú množstvo reaktívnych skupín, ktoré sa potenciálne môžu podieľať na vytvorení kovalentných väzieb.

Z činidiel pre kovalentné naviazanie sa najčastejšie používa glutardialdehyd⁵³ a 1-etyl-3-(3-dimetyl-aminopropyl)-karbo-

diimid⁷, použité však boli aj bisdiazobenzidín-2,2'-disulfónová kyselina, *N*-etyl-5-fenylizoxazolium-3'-sulfonát, toluén-2-izokyanát-4-izotiokyanát, hexametyléndiizokyanát alebo 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzén. Z množstva reakcií, ktoré sa pri kovalentnom viazaní uplatňujú, spomenieme len nasledovné⁷⁵. Reakčné mechanizmy jednotlivých techník sú uvedené na obrázku 5.

- kyanogénbromidová technika,
- karbodiimidová metóda,
- väzba cez acylové skupiny pôsobením hydrazínu a kyseliny dusitej,
- viazanie s použitím kyanurochloridu,
- väzba cez diazóniové skupiny z aromatických aminoskupín,
- naviazanie cez tiolové skupiny.

Alternatívnym spôsobom viazania je využitie koordinačných vlastností kovov. Príkladom je úprava povrchu materiálu chloridom titaničitým, kde pri imobilizácii vznikne sendvičovo-



Obr. 4. Schematická väzba aminoskupiny enzýmu na aminoskupinu anorganického nosiča prostredníctvom glutardialdehydu

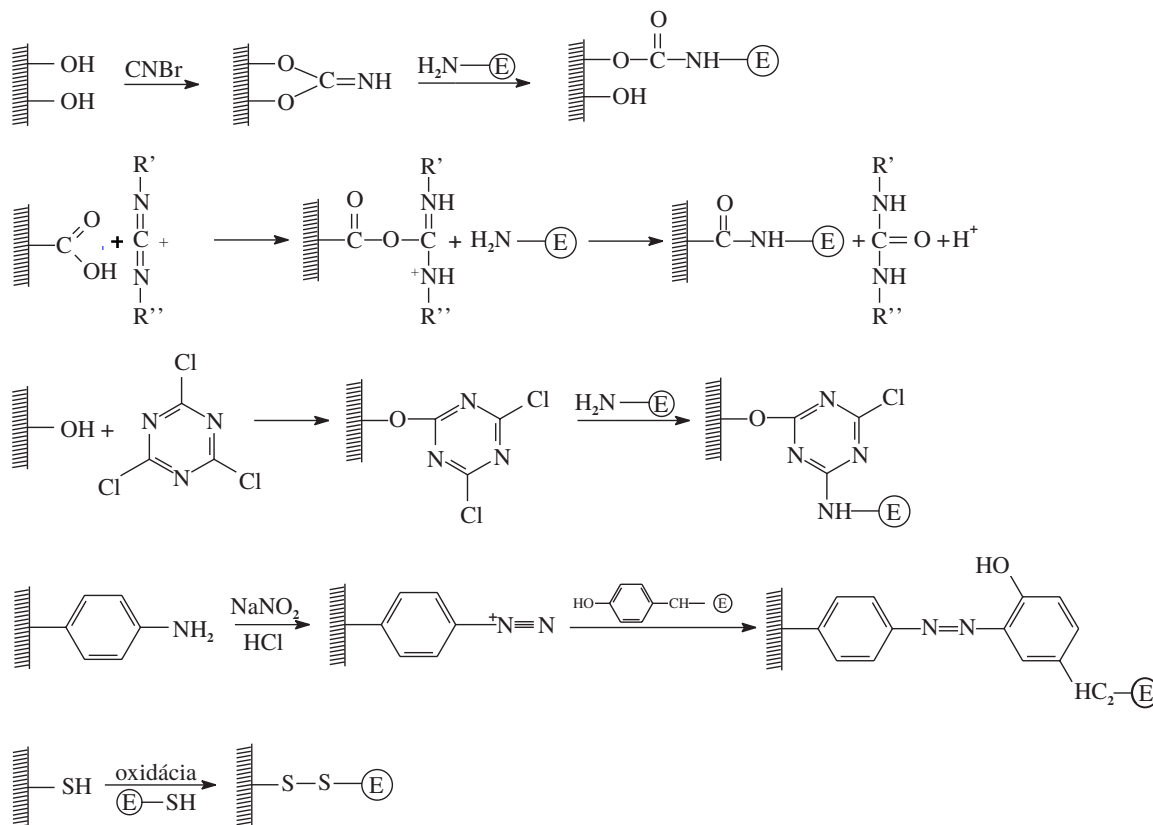
vý chelát medzi nosičom a biologickým materiálom prostredníctvom atómu titánu. Väzbu medzi enzýmom a povrchom popísal vo svojej práci Cabral a je znázornená⁷⁶ na obrázku 6.

3.4. Ďalšie imobilizačné metódy

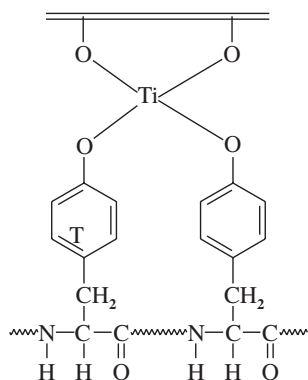
Za ďalšie imobilizačné metódy možno spomenúť zadržanie biokatalyzátora za membránou (obrázok 1f). Zatiaľ čo tento typ imobilizácie je veľmi bežný pri konštrukcii biosenzorov, v biotechnológiách využívajúcich imobilizované systémy sa vyskytuje len ojedinele. Membrány bývajú väčšinou zložené z polymérov (napr. polyvinylchlorid, polypropylén, polysulfón). Membrány môžu mať podobu plátov alebo zásobníkov s dutými vláknami. Zásobníky s dutými vláknami poskytujú membránam vyššiu mechanickú stabilitu a vyšší pomer povrch–objem⁷⁵.

Modifikácia tejto metódy s použitím gélových materiálov sa nazýva enkapsulácia. Je to metóda, pri ktorej sa biokatalyzátor, zvyčajne v tlmivom alebo stabilizačnom roztoku obalí tenkou semipermeabilnou membránkou gélu⁷⁷.

Už dlho je známe, že niektoré kmene liehovarníckych a pivovarských kvasiniek majú zvýšenú schopnosť flokulácie. Flokulácia sa považuje za pasívnu formu imobilizácie, pri ktorej sa jednotlivé bunky naadsorbujú jedna na druhú⁷⁸ (obrázok 1b). Furuta predstavil produkciu glukoamylázy flokulujúcimi kvasinkami *Saccharomyces diastaticus*⁷⁹. Ďalším rozšírením flokulačných možností je aplikácia polyelektrolytov alebo iných povrchovo aktívnych látok na vyvolanie umelej flokulácie⁸⁰.



Obr. 5. Reakcie uplatňujúce sa pri kovalentnom uchytení enzýmu na povrch nosiča



Obr. 6. Sendvičový komplex enzým–sklený nosič vytvorený prostredníctvom atómu titánu

4. Aplikácie imobilizovaných systémov v biotechnológii

Oblasti použitia imobilizovaných systémov môžu byť rozdelené do dvoch hlavných skupín: potravinárske a nepotravinárske aplikácie. Prvá skupina zahŕňa produkciu fermentovaných potravinárskych produktov ako pivo, víno, etanol, mäso, mlieko a mliečne výrobky. Druhá skupina pokrýva produkciu špecifických metabolitov vrátane alkoholov, antibiotík, organických kyselín, aminokyselín, sacharidov a enzýmov, ktoré môžu nájsť svoje uplatnenie vo farmaceutickom, chemickom i potravinárskom priemysle.

4.1. Potravinárske aplikácie imobilizovaných systémov

Čo sa týka pivovarnického priemyslu, potenciál technológií imobilizovaných buniek zaznamenal v minulosti pozornosť pri mnohých príležitostiach. Od roku 1987 sa na ne zamerala aj Európska konvencia pre pivovarníctvo⁸¹ (EBC). V poslednom čase bolo publikovaných množstvo prác o implementácii imobilizovaných kvasiniek do tradičných pivovarníckych procesov primárnej a sekundárnej fermentácie⁸²⁻⁸⁵.

Napriek tradičnej povahe vína, technológia imobilizovaných buniek si našla svoje uplatnenie aj na tomto poli. Imobilizované systémy môžu zvýšiť účinnosť alkoholovej a jablčno-mliečnej fermentácie^{86,87}. Niektoré práce popisujú fľašovú fermentáciu šumivého vína s využitím imobilizovaných buniek³⁹. Kritický pohľad na produkciu vína imobilizovanými systémami ponúka prehľadový článok autorského kolektívu Diviès a kol.⁸⁸

Udržanie určitej kvality mäsa a mäsových výrobkov môže byť nevedomky alebo zámerne ovplyvnené mikrobiálnou aktivitou buď prirodzenej mikroflóry alebo vybraných typov mikroorganizmov. Avšak len nedávno technológia imobilizovaných buniek našla svoje uplatnenie aj v mäso spracujúcom priemysle⁸⁹. McLoughlin a Champagne ponúkajú vyčerpávajúci prehľad možností využitia imobilizovaných buniek v procese spracovania mäsa. Ide najmä o imobilizáciu štartovacích kultúr pri výrobe fermentovaných mäsových produktov⁹⁰.

Imobilizované bunky môžu nájsť svoje uplatnenie aj v procese výroby mlieka a mliečnych výrobkov. Na tomto poli sa

imobilizované bunky používajú na predúpravu surového mlieka, produkciu mliečnych štartovacích kultúr, výrobu jogurtov a syrov, fermentáciu smotany a mrazených dezertov s alebo bez obnovy bunkovej biomasy⁹¹.

4.2. Ostatné biotechnologické využívajúce imobilizované systémy

Mnohé imobilizované systémy našli svoje uplatnenie pri produkcii sacharidov a ich derivátov. Patrí sem výroba vysokokonzentrovaných fruktózových sirupov^{92,93}, glukózy a galaktózy hydrolýzou laktózy⁴⁶. Mnoho prác sa tiež zaoberá produkciou enzýmov, napr. amylolytických²⁹, proteáz⁴⁹, lipáz⁵¹ alebo katalázy⁹⁴. Aminokyseliny ako dôležité farmaceutické a krmovinárske aditíva sú tiež vyrábané využitím imobilizovaných systémov. Patrí sem produkcia kyseliny asparágovej⁵⁴, glutámovej¹¹, alanínu⁴², tryptofánu⁹⁵, lyzínu⁹⁶, serínu⁹⁷ alebo arginínu⁹⁸. Aj organické kyseliny zaznamenali mnohé prípady aplikácie^{17,33,99,100}. Ďalšie práce popisujú tiež produkciu glycerolu¹⁰¹ a sorbitolu¹⁰², aromatických látok, polysacharidov, alkaloidov alebo pigmentov¹⁰³.

5. Záver

Táto práca približuje spôsoby a metódy zavádzania imobilizovaných systémov využívajúcich enzýmy alebo celé bunky do jednotlivých odvetví potravinárskeho i nepotravinárskeho priemyslu. Jej zámerom bolo charakterizovať najznámejšie metódy imobilizácie spolu s materiálmi, pre jednotlivé metódy typickými. Kapitoly o metódach imobilizácie sa neobmedzujú len na suché vymenovanie používaných materiálov, ale naznačujú aj ich pôvod, princíp použitia a ďalšie parametre spolu s príkladmi praktických aplikácií v biotechnologických produkciách.

V prvej časti článku sú naznačené biologické materiály, používané pri realizácii technológií s imobilizovanými systémami. Druhá, najobsiahlejšia časť je venovaná metódam a hlavne najpoužívanejším materiálom pri jednotlivých imobilizačných technikách. Tretia, záverečná časť je veľmi stručným prehľadom zavádzania imobilizovaných systémov do technologickej praxe.

Táto práca bola podporovaná finančnými zdrojmi z grantov EU č. 2/5059/98, 1/7347/20 a 1/6252/99.

LITERATÚRA

1. Bittar E. E., Danielsson B., Büllow L.: *Advances in Molecular and Cell Biology*, sv. 15A. JAI Press, Greenwich 1996.
2. Michaelis L., Ehrenreich M.: *Biochem. J.* 10, 283 (1908).
3. O'Neill S. P., Dunnill P., Lilly M. D.: *Biotechnol. Bioeng.* 13, 337 (1971).
4. Rosu R., Uozaki Y., Iwasaki Y., Yamane T.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 445 (1997).
5. Shimada Y., Sugihara A., Maruyama K., Nagao T., Nakayama S., Nakano H., Tominaga Y.: *J. Ferment. Bioeng.* 81, 299 (1996).
6. Bhuiyan S. H., Itami Y., Izumori K.: *J. Ferment. Bioeng.* 84, 558 (1997).

7. Lee P. M., Lee K. H., Siaw Y. S.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 58, 65 (1993).
8. Joekes I., Moran P. J. S., Rodrigues J. A. R., Wendhausen R., Tonella E., Cassiola F.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 73, 54 (1998).
9. Gough S., Mchale A. P.: Bioproc. Bioeng. 19, 33 (1998).
10. Kannan T. R., Sangiliyandi G., Gunasekaran P.: Enzyme Microb. Technol. 22, 179 (1998).
11. Nampoothiri M., Pandey A.: Biores. Technol. 63, 101 (1998).
12. Tisnadjaja D., Gutierrez N. A., Maddox I. S.: Enzyme Microb. Technol. 19, 343 (1996).
13. Senthuran A., Senthuran V., Mattiasson B., Kaul R.: Biotechnol. Bioeng. 53, 214 (1997).
14. Rickert D. A., Glatz C. E., Glatz B. A.: Enzyme Microbiol. Technol. 22, 409 (1998).
15. Czaczyk K., Trojanowska K., Albrecht A.: Folia Microbiol. 40, 337 (1995).
16. Vassilev N., Vassileva M. C., Spassova D. I.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 285 (1993).
17. Sakurai A., Itoh M., Sakakibara M., Saito H., Fujita M.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 70, 157 (1997).
18. Cao N. J., Du J. X., Gong C. S., Tsao G. T.: Appl. Environ. Microbiol. 62, 2926 (1996).
19. Srivastava P., Kundu S.: J. Gen. Appl. Microbiol. 44, 113 (1998).
20. Mussenden P., Keshavarz T., Saunders G., Bucke C.: Enzyme Microb. Technol. 15, 2 (1993).
21. Fiedurek J., Szczodrak J.: Starch/Staerke 5, 196 (1995).
22. Dornenburg H., Knorr D.: J. Biotechnol. 50, 55 (1996).
23. Roisin C., Gilletmanceau F., Saucedo J. E. N., Fliniaux M., Jacquindubreuil A., Barbotin J. N.: Plant Cell Reps. 16, 349 (1997).
24. Yamaji H., Fukuda H.: J. Ferment. Bioeng. 83, 489 (1997).
25. Riley M. R., Muzzio F. J., Reyes S. C. (ed.): Biotechnol. Progr. 13, 301 (1997).
26. Svec F., Gemeiner P., v kniže: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (Tombs M. P., ed), sv. 13. Intercept, Hants 1996.
27. Gemeiner P., Rexová-Benková L., Švec F., Norrlöw O., v kniže: *Immobilized biosystems. Theory and Practical Applications* (Veliky I. A., McLean R. J. C., ed), str. 1. Chapman and Hall, London 1994.
28. Seisun D.: *Hydrocolloids – Global Market Summary and Overview., International Conference on Food Hydrocolloids, Barcelona 1999.*
29. Stefanova M. E., Tonkova A. I., Dobрева E. P., Spasova D. I.: Folia Microbiol. 43, 42 (1998).
30. Lebeau T., Jouenne T., Junter G. A.: Biotechnol. Lett. 19, 615 (1997).
31. Mansur M., Garcia J. L., Guisan J. M., Garcíacalvo E.: Biotechnol. Lett. 20, 57 (1998).
32. Lee S. L., Cheng H. Y., Chen W. C., Chou C. C.: Proc. Biochem. 33, 453 (1998).
33. Sun M. Y., Nghiem N. P., Davison B. H., Webb O. F., Bienkowski P. R.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 70, 429 (1998).
34. Czaczyk K., Trojanowska K., Albrecht A.: Folia Microbiol. 40, 337 (1995).
35. Doran P. M., Bailey J. E.: Biotechnol. Bioeng. 28, 73 (1986).
36. Sanderson G. R., Ortega D., Sifferman E.: US 5,596,084 (1997).
37. Rochefort W. E., Rehg T., Chau P. C.: Biotechnol. Lett. 8, 115 (1986).
38. Rymowicz W., Kautola H., Wojtatowicz M., Linko Y. Y., Linko P.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 1 (1993).
39. Yokotsuka K., Yajima M., Matsudo T.: Am. J. Enol. Viticult. 48, 471 (1997).
40. Bagai R., Madamwar D.: Appl. Biochem. Biotechnol. 62, 213 (1997).
41. Roca E., Meinander N., Hahnhagerdal B.: Biotechnol. Bioeng. 51, 317 (1996).
42. Santoyo A. B., Rodriguez J. B., Carrasco J. L. G., Gomez E. G., Rojo I. A., Teruel L. M. A.: Enzyme Microb. Technol. 19, 176 (1996).
43. Roca E., Flores J., Nunez M. J., Lema J. M.: Enzyme Microb. Technol. 19, 132 (1996).
44. Yadav B. S., Rani U., Dhamija S. S., Nigam P., Singh D.: J. Basic Microbiol. 36, 205 (1996).
45. Roukas T.: J. Food Eng. 27, 87 (1996).
46. Tomáška M., Gemeiner P., Materlín I., Šturdík E., Handriková G.: Biotechnol. Appl. Biochem. 21, 347 (1995).
47. Tóth D., Tomašovičová D., Gemeiner P., Kurillová L.: Folia Microbiol. 34, 515 (1989).
48. Richter K., Ruhlemann I., Berger R.: Acta Biotechnol. 12, 229 (1992).
49. Abdelnaby M. A., Ismail A. M. S., Ahmed S. A., Fattah A. F. A.: Biores. Technol. 64, 205 (1998).
50. Abdelfattah A. F., Osman M. Y., Abdelnaby M. A.: Chem. Eng. J. 2, 189 (1997).
51. Benjamin S., Pandey A.: Proc. Biochem. 32, 437 (1997).
52. Slokoska L., Angelova M., Pashova S., Petricheva E., Konstantinov C.: Proc. Biochem. 34, 73 (1999).
53. Steighardt J., Kleine R.: Appl. Microbiol. Technol. 39, 63 (1993).
54. Kawabata N., Hatanaka H., Odaka H.: J. Ferment. Bioeng. 79, 317 (1995).
55. Simon L. M., Kotorman M., Szajani B.: Enzyme Microb. Technol. 14, 997 (1992).
56. Inoue Y., Tsuchiyama H., Tran L. T., Kosugi N., Kimura A.: J. Ferment. Bioeng. 73, 116 (1992).
57. Englbrecht U., Schmidt H. L.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 53, 397 (1992).
58. Rogalski J., Dawidowicz A. L., Wojtaswasilewska M.: Acta Biotechnol. 12, 191 (1992).
59. Iwasaki K., Nakajima M., Sasahara H.: Proc. Biochem. 28, 39 (1993).
60. Salter G. J., Kell D. B., Ash L. A., Adams J. M., Brown A. J., James R.: Enzyme Microb. Technol. 12, 419 (1990).
61. Lev O., Tsionsky M., Rabinovich L., Glezer V., Sampath S., Pankratov I., Gun J.: Anal. Chem. 67, 22 (1995).
62. Chatterjee S., Grethlein A. J., Worden R. M., Jain M. K.: J. Ferment. Bioeng. 81, 158 (1996).
63. Isono Y., Araya G., Hoshino A.: Proc. Biochem. 30, 743 (1995).
64. Love G., Gough S., Brady D., Barron N., Nigam P., Singh D., Marchant R., Mchale A. P.: Bioproc. Eng. 18, 187 (1998).
65. Elsayed A. M. M., Abdulwahid K., Coughlin R. W.: Biotechnol. Bioeng. 40, 617 (1992).
66. Krisch J., Szajani B.: Biotechnol. Lett. 18, 393 (1996).

67. Park Y. S., Ohta N., Okabe M.: *J. Ferment. Bioeng.* 78, 265 (1994).
68. Gemeiner P., Štefuca V., Báleš V.: *Enzyme Microb. Technol.* 15, 551 (1993).
69. Lee D. C., Lee S. G., Kim H. S.: *Enzyme Microb. Technol.* 18, 35 (1996).
70. West T. P., Strohfus B.: *Microbios* 88, 177 (1996).
71. Bric J. M., Bostock R. M., Silverstone S. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 535 (1991).
72. Guenette M. E., Duvnjak Z.: *Acta Biotechnol.* 15, 381 (1995).
73. Razmovski R., Pejin D.: *Folia Microbiol.* 41, 210 (1996).
74. Fiedurek J., Szczodrak J.: *Starch/Staerke* 47, 196 (1995).
75. Barker S. A., v knihe: *Biosensors. Fundamentals and Applications* (Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S., ed.), str. 85. Oxford University Press, New York 1987.
76. Cabral J. M. S., Cardosa J. P., Novais J. M., Kennedy J. F.: *Enzyme Microb. Technol.* 6, 365 (1984).
77. Lim F.: US 4,352,883 (1982).
78. Vaniersel M. F. M., Meersman E., Arntz M., Rombouts F. M., Abee T.: *J. Inst. Brew.* 104, 131 (1998).
79. Furuta H., Arai T., Hama H., Shiomi N., Kondo A., Fukuda H.: *J. Ferment. Bioeng.* 84, 169 (1997).
80. Callander I. J., Barford J. P.: *Biotechnol. Lett.* 5, 153 (1983).
81. Masschelein C. A.: *Proc. Eur. Brew. Conv. 22nd Congress, Zürich 1989*, str. 785.
82. Pilkington P. H., Margaritis A., Mensour N. A., Russell I.: *J. Inst. Brew.* 104, 19 (1998).
83. Masschelein C. A., Ryder D. S., Simon J. P.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 155 (1994).
84. Šmogrovicová D., Dömény Z., Gemeiner P., Malovíková A., Šturdík E.: *Biotechnol. Tech.* 11, 261 (1997).
85. Dömény Z., Šmogrovicová D., Gemeiner P., Šturdík E., Pátková J., Malovíková A.: *Biotechnol. Lett.* 20, 1041 (1998).
86. Crapisi A., Nuti M. P., Spettoli P., Zamorani A.: *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 310 (1987).
87. Kosseva M., Beschkov V., Kennedy J. F., Lloyd L. L.: *Proc. Biochem.* 33, 793 (1999).
88. Diviès C., Cachon R., Cavin J. F., Prevost H.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 135 (1994).
89. Kearney L., Upton M., McLoughlin A. J.: *Appl. Microbiol. Technol.* 33, 648 (1990).
90. McLoughlin A. J., Champagne C. P.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 179 (1994).
91. Champagne C. P., Lacroix C., Sodini-Gallot I.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 109 (1994).
92. Kirk L. A., Doelle H. W.: *Biotechnol. Lett.* 16, 533 (1994).
93. Ge Y. B., Zhou H., Kong W., Tong Y., Wang S. Y., Li W.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 69, 203 (1998).
94. Petruccioli M., Piccioni P., Fenice M., Federici F.: *Biotechnol. Lett.* 16, 939 (1994).
95. Dallmann K., Orosz L. S., Szajani B.: *Biotechnol. Lett.* 19, 123 (1997).
96. Velizarov S. G., Rainina E. I., Sinitsyn A. P., Varfolomeyev S. D., Lozinsky V. I., Zubov A. L.: *Biotechnol. Lett.* 14, 291 (1994).
97. Tanaka T., Yamamoto K., Towprayoon S., Nakajima H., Sonomoto K., Yokozeki K., Kubota K., Tanaka A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 564 (1989).
98. Fujimura M., Chibata I., Kato J., Tosa T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 79 (1984).
99. Cao N. J., Du J. X., Gong C. S., Tsao G. T.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63, 387 (1997).
100. Goksungur Y., Guvenc U.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 131 (1999).
101. Benito G. G., Ozores M., Pena M.: *Biores. Technol.* 49, 209 (1994).
102. Jang K. H., Jung S. J., Chang H. S., Chun U. H.: *Proc. Biochem.* 31, 485 (1996).
103. Norton S., Vuilleumard J. C.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 193 (1994).

M. Navrátil and E. Šturdík (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Chemical Aspects of Immobilized Systems in Biotechnologies**

Biotechnological applications using immobilized systems have recorded fast development in last years. The paper tries to deal with chemical aspects of immobilized biotechnologies. It is aimed primarily at definition of immobilization techniques and their modifications. For every method, the principle of immobilization and the most frequently used carriers are described. The appropriate matrix materials such as agar, agarose, κ-carrageenan, alginate, pectates, protein carriers, chitosan, polyacrylamide and other synthetic carriers are characterized more in detail. Basic principles of covalent coupling are presented as chemical equations. Several examples of applications of immobilized systems in both food and non-food biotechnological processes are mentioned.

AFINITNÍ PRECIPITACE BÍLKOVIN

ZDENĚK GLATZ

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

Došlo dne 22.VII.1999

Klíčová slova: afinitní precipitace

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismy precipitace
3. Afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů
4. Afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů
 - 4.1. Ligandy používané při afinitní precipitaci
 - 4.2. Polymery používané při afinitní precipitaci
 - 4.3. Vazba ligandu na polymer
 - 4.4. Precipitační mody
 - 4.5. Postup při afinitní precipitaci
 - 4.6. Speciální modifikace metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů
5. Afinitní precipitace pomocí modifikovaných fosfolipidů
6. Závěr

1. Úvod

Precipitace byly v počátcích chemie bílkovin jedinými dostupnými metodami pro jejich separaci z komplexních směsí. Přestože patří k nejstarším a nejjednodušším metodám nelze jejich význam podceňovat ani v současné době. Klasické precipitační metody při použití neutrálních solí, organických rozpouštědel nebo organických polymerů mají totiž řadu výhod. Lze je snadno převést z laboratorních podmínek do poloprovodního či provozního měřítka, mohou být zařazeny jako počáteční purifikační krok při práci s hrubými extrakty

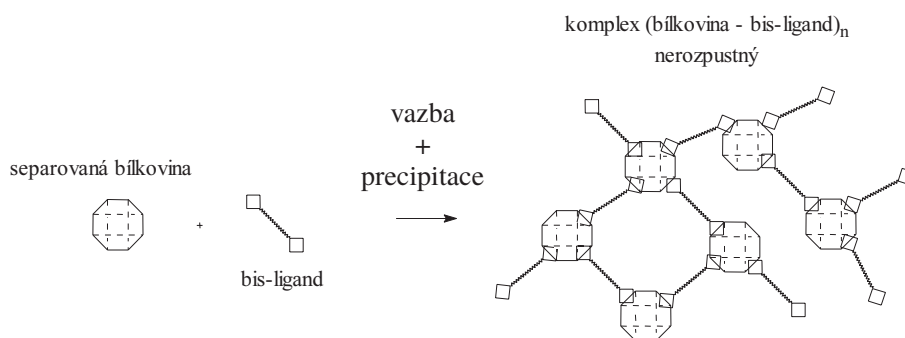
a výsledku je přitom dosaženo v relativně krátkém čase. Jejich většímu využití však brání nedostatek selektivity. Tento problém napomáhá odstranit kombinace afinitních interakcí a precipitace do jediné metody – metody afinitní precipitace. Přestože byla poprvé popsána již v roce 1979 Larssonem a Mosbachem¹, její význam narůstá až nyní, a to i díky rozvoji jiných mechanismů než použili ve své práci Larsson a Mosbach. Cílem tohoto sdělení je podat ucelenou informaci o této slibné metodě purifikace bílkovin.

2. Metody afinitní precipitace

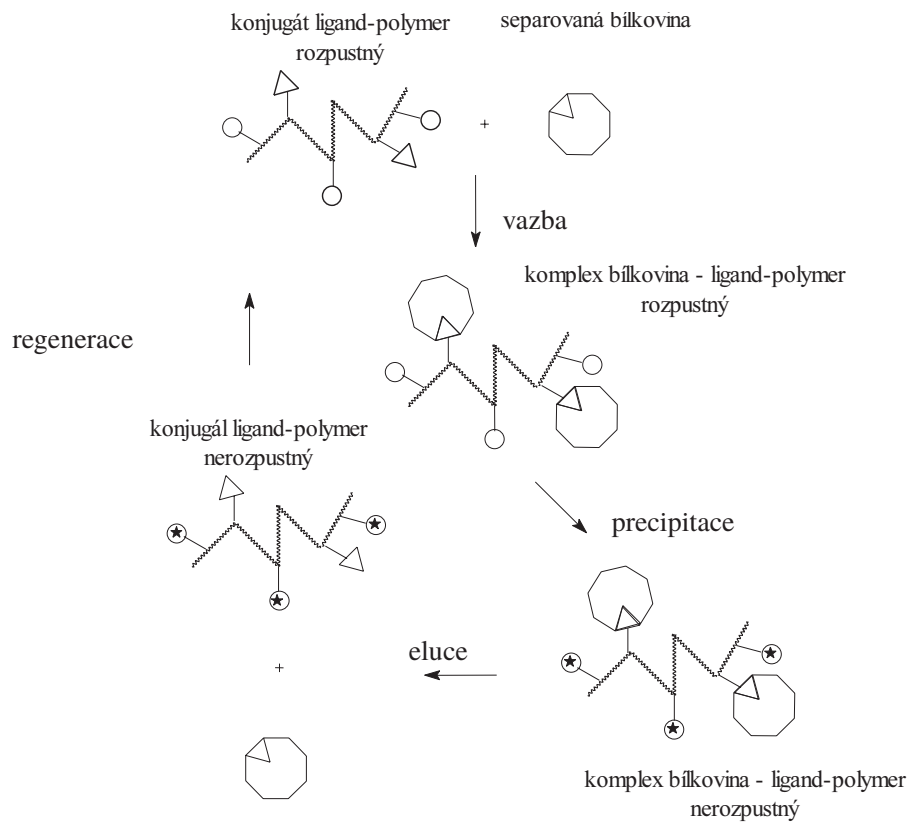
Pro afinitní precipitace bílkovin byly použity tři základní mechanismy. První mechanismus zahrnuje vytváření síťového komplexu mezi polyvalentní bílkovinou a bi- nebo polyligandem. Za vhodných podmínek dochází k trojrozměrnému narůstání tohoto komplexu, který se postupně stává nerozpustným, a dochází k jeho precipitaci (obr. 1). Tato metoda je označována jako afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů a v své podstatě je identická s imunoprecipitační reakcí protilátky s antigenem.

V případě druhého mechanismu dojde nejprve k vytvoření rozpustného komplexu mezi bílkovinou a ligandem, který je navázán na polymeru. K vlastní precipitaci komplexu pak dochází snížením rozpustnosti tohoto polymeru, a to buď změnou fyzikálně chemických vlastností roztoku nebo přidáním činidla, které tento polymer zesíťovává a vyvolává tak jeho precipitaci (obr. 2). Tato metoda je označována jako afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů. Vzhledem ke skutečnosti, že většina v současné době publikovaných prací využívá právě tohoto mechanismu, bude hlavní část tohoto sdělení věnována této modifikaci metody afinitní precipitace.

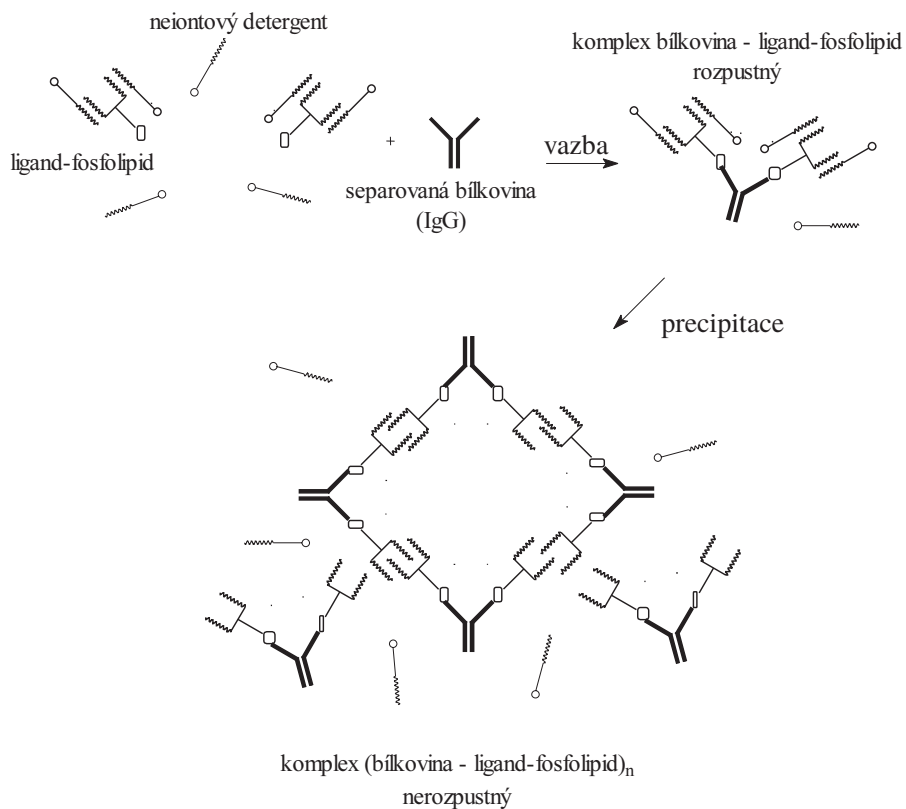
Se zcela novou metodou afinitní precipitace pomocí modifikovaných fosfolipidů přišli Kilpatrick a spol.² Fosfolipidy s navázaným ligandem jsou rozpuštěny ve vodném roztoku neiontového detergentu. Tento roztok je přidán k roztoku purifikované polyvalentní bílkoviny. Přitom dochází k navázání konjugátu ligand–fosfolipid na bílkovinu a současně se snižuje díky zředění výchozího roztoku modifikovaných fosfolipidů koncentrace detergentu. Tím se obnaží nepolární al-



Obr. 1. Princip metody afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů



Obr. 2. Princip metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů



Obr. 3. Princip metody afinitní precipitace pomocí modifikovaných fosfolipidů

kylové řetězce fosfolipidů, dochází mezi nimi k hydrofobním interakcím a výsledkem je precipitace komplexu bílkovina – ligand–fosfolipid (obr. 3).

3. Afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů

Afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů bývá také označována jako „pravá“, neboť vlastní precipitace je skutečně vyvolána tvorbou afinitních interakcí mezi ligandem a bílkovinou. Primární podmínkou pro tuto metodu afinitní precipitace je multivalentnost příslušné bílkoviny a použitého ligandu. V případě bílkoviny je tato vlastnost dána její strukturou a nelze ji tedy ovlivnit. U ligandu je uvedené skutečnosti dosaženo spojením dvou molekul ligandu prostřednictvím raménka, vytvořením tzv. bis-ligandu. Délka raménka má přitom podstatný vliv na precipitační vlastnosti daného systému bílkovina – bis-ligand. Pokud je raménko příliš krátké, bis-ligand nedokáže spojit vazebná místa na různých molekulách bílkoviny. Je-li naopak raménko příliš dlouhé, může se bis-ligand navázat na vazebná místa identické molekuly bílkoviny. V obou případech nedojde k precipitaci.

Další důležitou podmínkou pro úspěšnou aplikaci této metody afinitní precipitace je optimální poměr koncentrací intereagujících složek. Stejně jako v systému protilátka – antigen je maximálního výtěžku precipitace dosaženo při poměru ligand : vazebné místo rovnému 1. Proto je nutné před provedením precipitace provést orientační precipitační experimenty při různých poměrech koncentrací obou složek.

S metodou afinitní precipitace poprvé přišli Larsson a Mosbach, kteří jako homobifunkční ligand pro purifikaci laktátdehydrogenasy z hovězího srdce použili bis-NAD⁺. Jedná se o dvě molekuly NAD⁺ kovalentně spojené pomocí dihydrazinu kyseliny adipové. Obdobné deriváty NAD⁺ byly připraveny karbodiimidovou kondenzací³. Bis-NAD⁺ není monospecifickým ligandem, v hrubém homogenátu s ním budou interagovat všechny NAD⁺ dependentní dehydrogenasy, i když různou silou. Specifitu afinitní precipitace pro danou dehydrogenasu lze zvýšit přidávkem substrátového analoga, který zvyšuje sílu interakce. Tato skutečnost platí především u enzymů s uspořádaným sekvenčním mechanismem. Afinitní precipitaci tak lze v případě glutamátdehydrogenasy vyvolat přidávkem glutarátu, u laktátdehydrogenasy přidávkem oxalátu a v případě

alkoholdehydrogenasy přidávkem pyrazolu. Irwin a Tipton dokonce vypracovali metodu afinitní precipitace, pomocí které lze díky přidávku různého substrátového analoga rozseparovat jednotlivé izoenzymy laktátdehydrogenasy⁴. Pro rozpuštění vzniklého precipitátu je možné použít NADH, který se na uvedené dehydrogenasy váže silněji než bis-NAD⁺. Obdobně Beattie a spol.⁵ připravili pro purifikaci fosfofruktokinasy z hovězího srdce bis-ATP. V tomto případě slouží ke zvýšení specifity precipitace citrát, který u tohoto enzymu vystupuje jako allosterický inhibitor.

NAD⁺ a ATP jsou však velmi nestálé látky, což samozřejmě platí i o jejich bis-derivátech. Nezanedbatelná je rovněž jejich cena. Proto byly k identickému účelu, stejně jako v případě afinitní chromatografie, použity jako pseudoafinitní ligandy deriváty triazinových barev – Cibacron Blue F3GA (cit.^{6,7}) a Procion Blue H-B (cit.^{8,9}), které vykazují obdobnou afinitu vůči dehydrogenasám a jiným bílkovinám.

Poslední aplikací afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů je precipitace pomocí tzv. bis-chelátů¹⁰ – ethylenglykoltetraoctové kyseliny – EGTA a polyethylenglykol-bisiminodiocetové kyseliny – PEG(IDA)₂ s navázanými kovovými ionty Cu²⁺ nebo Zn²⁺. Tato metoda je použitelná pro bílkoviny s více vazebnými místy pro koordinační vazbu kovových iontů, především s povrchově dostupnými histidinyllovými zbytky. Vzhledem k tomu, že kratší polyhistidinyllové řetězce jsou často využívány v rekombinantních technologiích pro usnadnění purifikace rekombinantních bílkovin, nabízí se zde aplikace právě této metody¹¹.

Identické precipitační chování jako bis-ligandy vykazují rovněž tzv. polyligandy, které ve své molekule obsahují více než dvě molekuly ligandu. Morris a spol.¹² použili biotin navázaný na polyakrylamidovém řetězci jako polyligand pro avidin. Jednalo se však pouze o předběžné experimenty prováděné na modelových směsích a není možné objektivně posoudit potenciální výhody tohoto uspořádání.

Jak je patrné, metoda afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů má řadu problematických míst a nejedná se tedy o metodu univerzální. Nevýhodou je rovněž dlouhá inkubační doba potřebná pro precipitaci, která u některých systémů dosahuje až 20 hodin. Tento mechanismus je však vhodný především pro bílkoviny citlivé na změny fyzikálně chemických vlastností roztoků. Přehled aplikací afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů je uveden v tabulce I.

Tabulka I

Přehled využití afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů pro purifikaci bílkovin

Bílkovina	Ligand	Zdroj	Cit.
Laktátdehydrogenasa	bis-NAD ⁺	hovězí srdce	1,4,13–15
Glutamátdehydrogenasa	bis-NAD ⁺	hovězí a krysí játra	13–15
Alkoholdehydrogenasa	bis-NAD ⁺	kvasniční	13,15
Fosfofruktokinasa	bis-ATP	hovězí srdce	5
Laktátdehydrogenasa	bis-Cibacron Blue F3GA	králíčí svaly	6,7
Sérový albumin	bis-Cibacron Blue F3GA	hovězí sérum	6,7
Laktátdehydrogenasa	bis-Procion Blue H-B	králíčí svaly	8,9
Hemoglobin	(Zn ²⁺) ₂ EGTA	lidský	10
Myoglobin	(Cu ²⁺) ₂ PEG(IDA) ₂	velrybí	10
Galaktosadehydrogenasa	(Zn ²⁺) ₂ EGTA	rekombinatní	11

Tabulka II
Přehled polymerů použitých při afinitních precipitacích

Polymer	Precipitační podmínky	
	rozpustný	nerozpustný
<i>Přírodní polymery</i>		
Chitosan	< pH 5,5	> pH 8,5
Alginát		Ca ²⁺
Dextran		Concanavalin A
Galaktomannan		B ₄ O ₇ ²⁺
<i>Syntetické polymery</i>		
Hydroxypropylmethylcelulosa	< pH 4,2	
Kopolymer methylmethakrylát-methakrylová kyselina Eudragit S100	> pH 5,5	< pH 4,7
Kopolymer <i>N</i> -isopropylakrylamid- <i>N</i> -akryloxysukcinimid NIPAM-NASI		> 34 °C
Kopolymer <i>N</i> -isopropylakrylamid-glycidylmethakrylát NIPAM-GMA		> 27 °C
Poly(<i>N</i> -vinylkaprolaktam) PVCL > 45 °C		
Polyethylenimin PEI		k. polyakrylová PAA

4. Afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů

Jak již bylo uvedeno, v případě metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů není precipitace ve skutečnosti vyvolána přímo tvorbou afinitní interakce mezi bílkovinou a ligandem. Za precipitaci je odpovědný polymer, který změnou své rozpustnosti reaguje na cílené změny ve vlastnostech okolního roztoku.

4.1. Ligandy používané při afinitních precipitacích

Pro metodu afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů lze v principu použít identické ligandy jako při afinitní chromatografii. U chromatografie má však bílkovina při průchodu chromatografickou kolonou více příležitostí pro vytvoření afinitní interakce s imobilizovaným ligandem, což samozřejmě neplatí při afinitní precipitaci, kde k interakci dochází přímo v roztoku. Ligandy použité při afinitní precipitaci tedy musí vykazovat silnější interakce než ligandy používané v afinitní chromatografii. Navíc je nutné brát v úvahu, že po vazbě ligandu na polymer dochází k jejímu zeslabení.

4.2. Polymery používané při afinitních precipitacích

Pro potřeby afinitní precipitace jsou využívány polymery rozpustné ve vodných roztocích, které jsou schopny reagovat i na malé změny ve vlastnostech roztoku. Tyto změny vyvolávají tvorbu nové fáze v dosud homogenním roztoku, tj. vznik trojrozměrné struktury. Změna potřebná pro přechod mezi rozpustnou a nerozpustnou formou polymeru by měla být mírná a nesmí mít vliv na samotné afinitní interakce. Ideální polymer pro afinitní precipitace by měl přitom splňovat několik dalších požadavků: (i) měl by obsahovat volné skupiny pro vazbu ligandu, a to v odpovídajícím počtu pro dosažení dostatečné vazebné kapacity; (ii) měl by vykazovat minimální nespécifické interakce; (iii) měl by vytvářet kompaktní preci-

pitát vhodný pro další manipulace s minimem koprecipitovaných nečistot; (iv) měl by být opakovaně použitelný; (v) měl by být levný a dostupný a (vi) neměl by být toxický.

V tabulce II je uveden přehled polymerů, které byly dosud použity při afinitních precipitacích. Jak je patrné, k afinitním precipitacím byly použity jak přírodní tak syntetické polymery. Syntetické polymery vykazují vyšší účinnost precipitace, neboť na rozdíl od polymerů přírodních nejsou polydisperzní. Za zmínku stojí některé aplikace přírodních polymerů chitosanu a alginátu, které slouží nejen jako polymery nezbytné pro precipitaci, ale současně i jako ligandy pro příslušné bílkoviny – lektin z pšenice¹⁶ a celulasu¹⁷, respektive endopolygalakturonasu¹⁸.

Žádný z doposud použitých polymerů nespĺňuje všechny uvedené požadavky. Hlavními nedostatky jsou nekompletní precipitace, nespécifické hydrofobní interakce a zachycení balastních bílkovin ve struktuře precipitátu. Uvedené problémy se pokusili odstranit Sun a Zhou využitím polymerizovaných liposomů pro afinitní precipitace¹⁹. Liposomy připravené z fosfolipidů s diacetylenovými zbytky jsou dostatečně stálé a mají hydrofilní povrch bez nespécifických interakcí, jejich precipitaci lze jednoduše vyvolat osmotickým šokem způsobeným přidávkem soli do roztoku.

4.3. Vazba ligandu na polymer

Pro vazbu ligandu na polymer lze obecně použít reakce, jež jsou používány pro syntézu sorbentů pro afinitní chromatografii či imobilizaci enzymů. Volba reakce bude záviset na dostupných funkčních skupinách polymeru a ligandu. Při této reakci nesmí docházet k zesíťování polymeru, neboť by se snížila dostupnost ligandu pro bílkovinu a rozpustnost modifikovaného polymeru. Získaný konjugát ligand–polymer si přitom musí zachovat afinitu vůči příslušné bílkovině a schopnost precipitace. U precipitační závislosti však po navázání ligandů na polymer dojde k určitým posunům, které se ještě více prohloubí po vazbě bílkoviny.

Ligand je možné vázat přímo na aktivovaný polymer, případně ho lze navázat na monomer a ten použít jako kopolymer

Tabulka III
Přehled aplikací afinitní precipitace vyvolané změnou pH

Bílkovina	Polymer-ligand	pH interakce	pH precipitace	Cit.
Trypsin	NAABA- <i>p</i> -aminobenzamidin	8,0	4,0	20
Protein A	HPMC-IgG	7,2	4,2	21
Protein A	Eudragit S100-IgG	7,0	4,5	22
L-LDH	Eudragit S100-CB	7,6	5,1	23
D-LDH	Eudragit S100	5,5	4,3	24
L-LDH	Eudragit S100-CB	5,5	4,9	25
Xylanasa	Eudragit S100	5,6	4,3	26
Lektin ze sóji	Eudragit S100-N-Ac-D-GalNH ₂		5,2	27
MAB	Eudragit S100-lipasa		4,8	28
Lektin z pšenice	chitosan	5,5	8,5	16
Celulasa	chitosan	5,0	8,0	17
Trypsin	chitosan – STI	5,5	8,5	29

L-LDH – L-laktátdehydrogenasa, N-Ac-D-GalNH₂ – *N*-acetyl-D-galaktosamin, MAB – monoklonální protilátka, HPMC – hydroxypropylmethylcelulosa, STI – inhibitor trypsinu ze sóji, NAABA – *N*-akryloyl-aminobenzoová kyselina, CB – Cibacron Blue 3GA

Tabulka IV
Přehled aplikací afinitní precipitace vyvolané přidavkem polyvalentních iontů

Bílkovina	Polymer-ligand	Sítující činidlo	Cit.
Trypsin	alginát-STI	Ca ²⁺	30
Endogalakturonasa	alginát	Ca ²⁺	18
L-LDH	Eudragit S100-CB	50 mM Ca ²⁺ + 40 °C	31
Pyruvátkinasa	Eudragit S100-CB	50 mM Ca ²⁺ + 40 °C	31
ADH	Eudragit S100-CB	50 mM Ca ²⁺ + 40 °C	32
IgG	galaktomannan-protein A	B ₄ O ₇ ²⁻	33

L-LDH – L-laktátdehydrogenasa, ADH – alkoholdehydrogenasa, STI – inhibitor trypsinu ze sóji, CB – Cibacron Blue 3GA

při syntéze polymeru. K vazbě ligandu se nepoužívá raménko, neboť modifikovaný polymer je při inkubaci se vzorkem v rozpuštěném stavu a jeho řetězce jsou natolik flexibilní, že raménko není nutné. Po reakci je nezbytné důkladně odstranit nezreagovaný ligand, a to opakovanou precipitací modifikovaného polymeru.

4.4. Precipitační módy

Metoda použitelná k precipitaci komplexu bílkovina – ligand–polymer bude především záviset na daném polymeru, nezanedbatelné jsou však rovněž vlastnosti roztoku, ze kterého má být precipitace prováděna.

Precipitace vyvolaná změnou pH. Polymery, které ve své struktuře obsahují jak ionizovatelné, tak i hydrofobní skupiny, jsou při určitém pH nabitě a budou rozpustné v roztoku, při jiném pH naopak náboj ztrácejí a pak převládají jejich hydrofobní vlastnosti a dochází k precipitaci. Tohoto efektu je právě využíváno při afinitních precipitacích. Inkubace bílkoviny s konjugátem ligand–polymer se provádí při takovém pH, při kterém je polymer rozpustný, následně je změnou pH vyvolána jeho precipitace. Přehled některých aplikací precipitace vyvolané změnou pH je uveden v tabulce III.

Precipitace vyvolaná přidavkem polyvalentních iontů. Přídavek opačně nabitých polyvalentních iontů k roztoku nabitého polymeru vyvolává tvorbu komplexu, který postupně narůstá a následně precipituje. Účinnost precipitace je přitom závislá na daném iontu. Typickým příkladem takového polymeru je alginát, který precipituje po přidavku dvojmocných nebo trojmocných iontů např. Ca²⁺. Eudragit S100, který je obvykle precipitován změnou pH, lze rovněž precipitovat přidavkem Ca²⁺ v kombinaci se zvýšenou teplotou. Na identickém principu je rovněž založena precipitace galaktomannamu pomocí iontu B₄O₇²⁻. Přehled některých aplikací precipitace vyvolané přidavkem polyvalentních iontů je uveden v tabulce IV.

Precipitace vyvolaná přidavkem opačně nabitého polymeru. Precipitaci nabitého polymeru lze vyvolat přidavkem opačně nabitého polymeru, vzniklý polyelektrolytový komplex je následně precipitován změnou pH. Při jediné doposud publikované aplikaci uvedeného způsobu precipitace použili Dis-sing a Mattiasson³⁴ pro afinitní precipitaci laktátdehydrogenasy z hovězího srdce jako konjugát Cibacron Blue 3GA navázanou na polyethyleniminu a kyselinu polyakrylovou jako opačně nabitý polymer.

Precipitace vyvolaná změnou teploty. Charakteristickým parametrem některých polymerů je tzv. bod zákalu, což je te-

Tabulka V
Přehled aplikací afinitní precipitace vyvolané změnou teploty

Bílkovina	Polymer-ligand	Precipitační teplota	Cit.
Trypsin	PVCL-STI	45 °C	35
Alkalická proteasa	NIPAM- <i>p</i> -aminobenzamidin	50 °C + 0,94 % NaCl	36
Trypsin	NIPAM-NASI- <i>p</i> -aminobenzamidin	42 °C + 3, % (NH ₄) ₂ SO ₄	37
Trypsin	NIPAM-GMA- <i>p</i> -aminobenzamidin	34 °C + 3,8 % (NH ₄) ₂ SO ₄	37
Protein A	NIPAM-GMA-IgG	34 °C + 3,8 % (NH ₄) ₂ SO ₄	37
Antigen	NIPAM-GMA-MAB	31 °C	38
IgG	NIPAM-NASI-protein A	37 °C	39
Inhibitor trypsinu	VCL-VI-Cu ²⁺	45 °C	40
	NIPAM-VI-Cu ²⁺	35 °C	
Inhibitor a-amylasy	NIPAM-IDA-Cu ²⁺	35 °C	41
	NIPAM-VI-Cu ²⁺	35 °C	
Anti-BSA	IgG PST-NIPAM-GMA-BSA	30 °C	42
	PST-NIPAM-MMA-BSA	40 °C	
Antigen	NIPAM-IgG	32 °C	43
C reaktivní protein	NIPAM-GMA-APPC	32 °C + Ca ²⁺	44

BSA – hovězí sérový albumin, PVCL – polyvinylkaprolaktam, STI – inhibitor trypsinu ze sóji, NIPAM – poly-*N*-isopropylakrylamid, NASI – *N*-akryloxysukcinimid, GMA – glycidylmethakrylát, MAB – monoklonální protilátka, VCL – vinylkaprolaktam, VI – vinylimidazol, IDA – iminodioxová kyselina, PST – polystyren, MMA – methakrylová kyselina, APPC – aminofenylfosforlycholin

plota při které se původně homogenní roztok polymeru separuje do dvou fází – vodné fáze a fáze polymeru. Tento fázový přechod je způsoben asociací polymeru do větších agregátů prostřednictvím hydrofobních interakcí. Pokud tento teplotní přechod leží v rozsahu teplotní stability příslušné bílkoviny, lze polymer použít k afinitní precipitaci. K danému účelu byly použity především syntetické polymery na bázi poly(*N*-isopropylakrylamidu) – NIPAM nebo poly(*N*-vinylkaprolaktamu) – PVCL. Přehled některých aplikací precipitace vyvolané změnou teploty je uveden v tabulce V.

Precipitace vyvolaná přidávkem síťující bílkoviny. K precipitaci komplexu bílkovina – ligand – polymer lze také použít síťujícího efektu jiné polyvalentní bílkoviny. Příkladem může být precipitace komplexu laktátdehydrogenasa – Cibacron Blue 3GA-dextran pomocí lektinu concanavalinu A (cit.⁴⁵). Jedná se vlastně o využití dvou různých afinitních interakcí pro afinitní precipitaci.

4.5. Postup precipitace

Purifikace bílkovin metodou afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů probíhá v několika následných krocích:

- *vazba bílkoviny* – heterobifunkční ligand je přidán ke vzorku za podmínek, které jsou vhodné pro vytvoření afinitní interakce, vzniklý komplex bílkovina – ligand – polymer zůstává v rozpustném stavu,
- *precipitace komplexu* – některou z výše uvedených metod je vyvolána precipitace komplexu, precipitát je poté z roztoku oddělen centrifugací. Rychlost a výtěžek precipitace je možné v některých případech zvýšit přidávkem nemodifikovaného polymeru, který napomáhá vytváření precipitačních center v roztoku,
- *promytí* – pokud je precipitace prováděna z hrubého homogennátu, dochází při ní k koprecipitaci nespecificky vázaných

- balastních bílkovin. Část balastních bílkovin je rovněž zachycena ve vnitřní struktuře precipitátu. Pro zvýšení specifity je nezbytné tyto bílkoviny z precipitátu odstranit, což je možné provést rozpuštěním precipitátu a jeho opětovným vysrážením, případně přímým promytím precipitátu,
- *disociace purifikované bílkoviny a odstranění konjugátu ligand – polymer* – při afinitní precipitaci je purifikovaná bílkovina navázaná nejenom na vnějším povrchu precipitátu, ale i v jeho vnitřní struktuře. Vzhledem k této skutečnosti byly testovány dva přístupy disociace bílkoviny z komplexu, a to buď přímo z precipitovaného komplexu nebo po jeho rozpuštění. V prvním případě zůstává konjugát ligand – polymer v precipitovaném stavu, což je výhodné pro jeho odstranění z roztoku separovaně bílkoviny. V druhém případě musí být ze stejného důvodu konjugát opětovně precipitován. Konkrétní metoda disociace bude záviset na daném systému bílkovina – ligand,
- *regenerace konjugátu ligand – polymer* – primární podmínkou pro ekonomicky efektivní metodu afinitní precipitace je opakované použití konjugátu ligand – polymer. Předtím je nezbytné z konjugátu odstranit nejenom všechny navázané nečistoty, ale i činidla použitá k disociaci.

4.6. Speciální modifikace metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů

Jedním z problémů metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů jsou nespecifické interakce balastních bílkovin se samotným polymerem, které snižují specifickou aktivitu purifikovaných bílkovin. Aby předešli tomuto problému, vypracovali Shu a spol. tzv. sekvenční precipitační proceduru²⁴, při které jsou za sebou provedeny nespecifická a afinitní precipitace. Tuto metodu aplikovali při purifikaci

D-laktátdehydrogenasy z bakterie *Leuconostoc mesenteroides*. Při nespecifické precipitaci byl k hrubému extraktu přidán nemodifikovaný polymer – Eudragit S100, přičemž došlo k precipitaci balastních bílkovin a D-laktátdehydrogenasa zůstala v roztoku. Získaný supernatant byl po úpravě pH podroben vlastní afinitní precipitaci s konjugátem Cibacron Blue 3GA-Eudragit S100. Pomocí této metody došlo nejenom ke zvýšení specifické aktivity výsledného enzymového preparátu, nezanedbatelnou výhodou je rovněž možnost použít pro purifikaci přímo hrubý extrakt, neboť při prvním precipitačním kroku dochází k odstranění zbývajících fragmentů bakteriálních buněk.

Kombinaci metody afinitní precipitace s metodou dvoufázových separací využili pro purifikaci laktátdehydrogenasy z prasečích svalů Guoquiand a spol.²⁵ Vyšli přitom ze skutečnosti, že při dvoufázových separacích v systému polyethylenglykol – dextran se Eudragit S100 separuje z více než 98 % v horní polyethylenglykolové fázi. Hrubý extrakt byl nejprve podroben dvoufázové separaci v systému 6 % polyethylenglykol 8000 – 8 % dextran T250, přičemž LDH se separovala do dolní dextranové fáze. Horní polyethylenglykolová fáze byla nahrazena novou, do které byl navíc přidán konjugát Cibacron Blue 3GA-Eudragit S100. Tím došlo ke změně distribučního koeficientu laktátdehydrogenasy a ta se separovala do horní polyethylenglykolové fáze. Komplex laktátdehydrogenasa – Cibacron Blue 3GA-Eudragit S100 byl z polyethylenglykolové fáze precipitován snížením pH.

5. Afinitní precipitace pomocí modifikovaných fosfolipidů

Také u této metody není precipitace vyvolána přímo tvorbou afinitní interakce mezi příslušnou bílkovinou a konjugátem ligand–fosfolipid. K precipitaci vzniklého komplexu dochází díky hydrofobním interakcím mezi alifatickými řetězci jednotlivých fosfolipidových molekul. Tyto řetězce byly původně komplexovány molekulami neiontového detergentu, avšak po přidavku roztoku fosfolipidu v neiontovém detergentu do roztoku purifikované bílkoviny dochází ke snížení koncentrace detergentu a řetězce přestávají být chráněny proti vzájemným hydrofobním interakcím. Tím se tato metoda afinitní precipitace liší od metody, která využívá heterobifunkční ligandy, neboť pro vyvolání precipitace není nutná změna fyzikálně chemických vlastností výsledného roztoku. Jak afinitní interakce, tak i hydrofobní interakce jsou totiž inicializovány prostým smícháním roztoku bílkoviny s roztokem fosfolipidů. Kilpatrick a spol. použili při svých experimentech syntetický fosfolipid – dimyristoylfosfatidylethanolamin, na který navázali jako ligand biotin, a oktaethylenglykol-n-dodecylether jako neiontový detergent. Uvedený konjugát biotin–fosfolipid byl využit pro purifikaci avidinu z vaječného bílku², respektive pro purifikaci polyklonálních a monoklonálních protilátek proti biotinu⁴⁵.

6. Závěr

Metoda afinitních precipitací kombinuje účinnost a jednoduchost klasických precipitačních metod se selektivitou danou metodám založeným na afinitních interakcích. Jejimi hlavní-

mi výhodami jsou především nízké provozní náklady, rychlé a snadné provedení a možnost přímé práce s hrubými bílkovinnými extrakty. V tomto směru lze předpokládat její další rozvoj jako možné alternativy afinitní chromatografie v polo-provozních a provozních aplikacích.

LITERATURA

1. Larsson P.-O., Mosbach K.: FEBS Lett. 98, 333 (1979).
2. Powers D. P., Carbonell R. G., Willard B. L., Kilpatrick P. K.: Biotechnol. Prog. 8, 436 (1992).
3. Irwin J. A., Tipton K. F.: Essays Biochem. 29, 137 (1995).
4. Irwin J. A., Tipton K. F.: Biochem. Soc. Trans. 23, 365S (1995).
5. Beattie R. E., Buchanan M., Tipton K. F.: Biochem. Soc. Trans. 15, 1043 (1987).
6. Hayet M., Vijayalakshmi M. A.: J. Chromatogr. 376, 157 (1986).
7. Lowe C. R., Pearson J. C., v knize: *Affinity Chromatography and Biological Recognition* (Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh I., ed.), str. 421. Academic Press, London 1983.
8. Pearson J. C., Burton S. J., Lowe C. R.: Anal. Biochem. 158, 382 (1986).
9. Pearson J. C., Clonis Y. D., Lowe C. R.: J. Biotechnol. 11, 267 (1989).
10. Van Dam M. E., Wuenschell G. E., Arnold F. H.: Biotechnol. Appl. Biochem. 11, 492 (1989).
11. Lilius G., Persson M., Bülow L., Mosbach K.: Eur. J. Biochem. 198, 499 (1991).
12. Morris J. E., Hoffman A. S., Fisher R. R.: Biotechnol. Bioeng. 41, 991 (1993).
13. Flygare S., Griffin T., Larsson P.-O., Mosbach K.: Anal. Biochem. 133, 409 (1983).
14. Larsson P.-O., Flygare S., Mosbach K., v knize: *Methods in Enzymology* (Jakoby W. B. ed.), sv. 104, str. 364. Academic Press, London 1984.
15. Beattie R. E., Graham L. D., Griffin T. O., Tipton K. F.: Biochem. Soc. Trans. 12, 433 (1985).
16. Senstad C., Mattiasson B.: Biotechnol. Bioeng. 34, 387 (1989).
17. Homma T., Fujii M., Mori J. I., Kawakami T., Kuroda K., Taniguchi M.: Biotechnol. Bioeng. 41, 405 (1993).
18. Gupta M. N., Guoqiang D., Mattiasson B.: Biotechnol. Appl. Biochem. 18, 321 (1993).
19. Sun Y., Yu K., Jin X. H., Zhou X. Z.: Biotechnol. Bioeng. 47, 20 (1995).
20. Schneider M., Guillot C., Lamy B.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 369, 257 (1981).
21. Taniguchi M., Kobayashi M., Natsui K., Fujii M.: J. Ferment. Bioeng. 68, 32 (1989).
22. Kamihara M., Kaul R., Mattiasson B.: Biotechnol. Bioeng. 40, 1381 (1992).
23. Guoqiang D., Kaul R., Mattiasson B.: J. Chromatogr. 668, 145 (1994).
24. Guoqiang D., Kaul R., Mattiasson B.: Bioseparation 3, 333 (1993).
25. Shu H. C., Guoqiang D., Kaul R., Mattiasson B.: J. Biotechnol. 34, 1 (1994).
26. Gupta M. N., Guoqiang D., Kaul R., Mattiasson B.: Biotechnol. Tech. 8, 117 (1994).

27. Linné Larsson E., Mattiasson B.: *J. Biotechnol.* 49, 189 (1996).
28. Taipa M. A., Kaul R., Mattiasson B., Cabral J. M.: *J. Mol. Recognit.* 11, 240 (1998).
29. Senstad C., Mattiasson B.: *Biotechnol. Bioeng.* 33, 216 (1989).
30. Linné E., Garg N., Kaul R., Mattiasson B.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 16, 48 (1992).
31. Guoqiang D., Lali A., Kaul R., Mattiasson B.: *J. Biotechnol.* 37, 23 (1994).
32. Guoqiang D., Benhure M. A. N., Kaul R., Mattiasson B.: *Biotechnol. Prog.* 11, 187 (1995).
33. Bradshaw A. P., Sturgeon R. J.: *Biotechnol. Tech.* 4, 67 (1990).
34. Dissing U., Mattiasson B.: *J. Biotechnol.* 52, 1 (1996).
35. Galaev I. Y., Mattiasson B.: *Biotechnol. Tech.* 6, 353 (1992).
36. Pécs M., Eggert M., Schügerl K.: *J. Biotechnol.* 21, 137 (1991).
37. Nguyen A. L., Luong J. H. T.: *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1186 (1989).
38. Monji N., Hoffman A. S.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14, 107 (1987).
39. Chen J. P., Hoffman A. S.: *Biomaterials* 11, 631 (1990).
40. Galaev I. Y., Kumar A., Agarwal R., Gupta M. N., Mattiasson B.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 68, 121 (1997).
41. Kumar A., Galaev I. Y., Mattiasson B.: *Biotechnol. Bioeng.* 59, 695 (1998).
42. Kondo A., Kaneko T., Higashitani K.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1 (1994).
43. Takei Y. G., Matsukata M., Aoki T., Sanui K., Ogata N., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T.: *Bioconjugate Chem.* 5, 579 (1994).
44. Mori S., Nakata Y., Endo H.: *Protein Expression Purif.* 5, 153 (1994).
45. Senstad C., Mattiasson B.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11, 41 (1989).
46. Powers D. P., Carbonell R. G., Kilpatrick P. K.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 509 (1994).

Z. Glatz (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Affinity Precipitation of Proteins**

Affinity precipitation combines high performance and simplicity of precipitation methods with high selectivity achieved in affinity methods of protein purification. The affinity precipitation could have a great potential as an alternative or complement to affinity chromatography, mainly in downstream processes. Basic principles and characteristics of the method are given. In addition, the paper describes some special applications of affinity precipitation in protein purification.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

PŘÍSTROJ PRO KONTINUÁLNÍ MĚŘENÍ ROZTAŽNOSTI POLYMERNÍCH FÓLIÍ

TOMÁŠ BARTOVSKÝ^a a LIDMILA BARTOVSKÁ^b

^aÚstav fyziky a měřicí techniky, ^bÚstav fyzikální chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: bartovsl@vscht.cz

Došlo dne 30.IX.1999

Klíčová slova: roztažnost, polymerní fólie, botnání

1. Úvod

V rámci studia sorpčních vlastností polymerních materiálů, používaných při membránových separačních procesech, byl vyvinut přístroj pro sledování jejich roztažnosti v kapalinách. Tento přístroj, umožňující kontinuálně měřit rozměry vzorku polymerní fólie, ponořeného v kapalině, byl testován měřeními roztažnosti izotropních i anizotropních materiálů v aromatických, lineárních alifatických a alicyklických uhlovodících, v alkoholech a ve směsích uhlovodíků nebo ve směsích uhlovodík + alkohol. Z údajů o změnách lineárních rozměrů lze za určitých předpokladů získat informace o objemovém botnání. Obvykle používané metody pro sledování botnání polymerů¹⁻³ nebyvají kontinuální a jejich použití pro tenké fólie, zvláště z materiálů málo botnajících, může být problematické⁴.

2. Popis přístroje

Základem přístroje, jehož blokové schéma je uvedeno na obr. 1, je plochá nádobka pro kapalinu, v níž vzorek botná. Řez měřicí kyvetou ukazuje obr. 2. Nádobka má teflonový rám

a skleněné dno, aby bylo možno optickými prostředky snímat vnější obrysy vzorku, seshora je kryta skleněnou deskou, jejímž úkolem je snížit rychlost odpařování kapaliny. To je významné především u směsí, jejichž složky mají rozdílnou tenzi par.

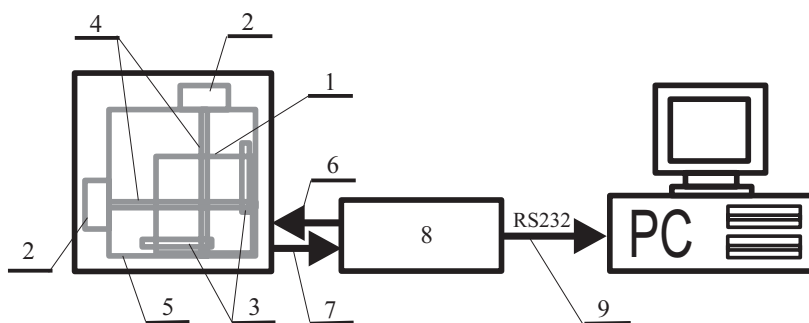
Vzorek, jehož tvar je patrný z obr. 3, je do kyvety přístroje vkládán v drátěné mřížce, která dovoluje roztahování měřené fólie ve všech směrech, ale brání jejímu kroucení, k němuž dochází nerovnoměrnou změnou objemu v různých částech fólie, především na horní a spodní straně. Nerovnoměrné botnání může být způsobeno buď nehomogenitou vzorku nebo různou dobou kontaktu kapaliny s povrchem fólie, přičemž se rozdíl okamžiku smočení různých částí povrchu nemusí výrazně projevovat v celkové změně rozměru, ale může způsobit kroucení.

Vnitřní rozměry nádoby jsou 80×80 mm. Vzhledem k tomu, že část vnitřního prostoru zaujímá drátěná mřížka, mohou být největší rozměry vzorku po nabotnění přibližně 75×75 mm. Výchozí rozměry vzorku je pak nutno volit podle roztažnosti materiálu – při zkušebních měřeních byly počáteční rozměry 50×50 mm.

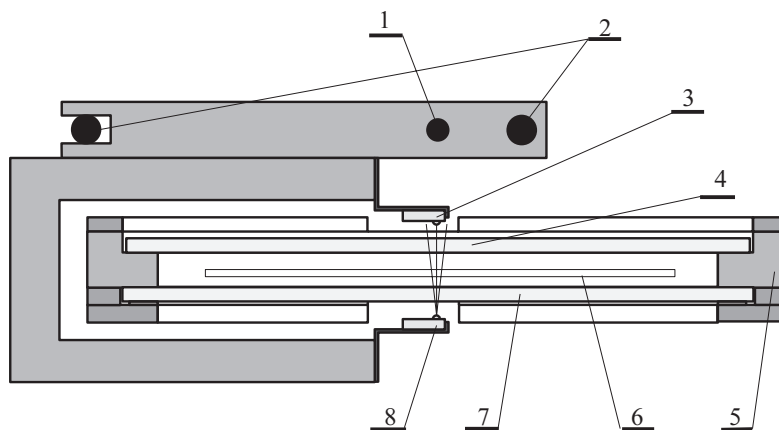
Pro zvýšení spolehlivosti snímání konce fólie optickým čidlem se na okraje fólie připevňuje lehká značka z tenkého plechu (tloušťka 50 μm). Způsob připevnění je patrný z obr. 4. V případech, kdy je fólie méně průhledná nebo je rozdíl indexu lomu fólie a kapaliny výrazný, je optické čidlo schopno zjistit okraj fólie přímo. U průhledné fólie s indexem lomu blízkým indexu lomu kapaliny jsou koncové značky nezbytné.

Okraj fólie se snímá optickým systémem s fototranzistorem a světelnou diodou (LED). LED je zdrojem světla a přerušování paprsku mezi LED a fototranzistorem indikuje okraj vzorku (značky). Nosič fototranzistoru a LED ve tvaru ležatého U se pohybuje po vodicích tyčích, přičemž pohon zajišťuje šroub poháněný krokovým motorkem. Stoupání šroubu a úhlový krok motorku určují výsledný lineární krok, který činí 0,0125 mm. Tato hodnota je rozhodující pro přesnost měření.

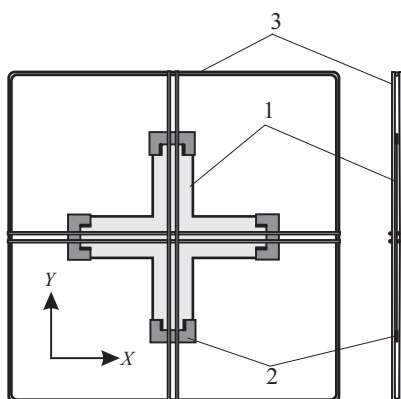
Krokový motorek je řízen jednočipovým mikroprocesorem. Základní poloha obou snímačů je určena koncovými kontakty. Ze základní polohy se oba snímače postupně pohybují napříč nádobkou. Nejprve se pohybuje snímač v jednom směru; když



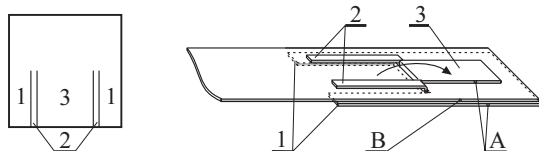
Obr. 1. Blokové schéma měřicího řetězce; 1 – kyveta (vnitřní rozměry 80×80 mm), 2 – krokové motorky, 3 – fotosnímače, 4 – vodicí tyče, 5 – rám kyvety, 6 – řízení krokových motorků, 7 – signál z fotosnímačů, 8 – řídicí obvod s jednočipovým mikroprocesorem, 9 – rozměrové údaje



Obr. 2. Řez měřicí květou a snímacím systémem; 1 – pohybový šroub, 2 – vodící tyče, 3 – fotosnímač, 4 – skleněné víko, 5 – teflonový rám květy, 6 – měřená fólie, 7 – skleněné dno, 8 – světelná dioda



Obr. 3. Vzorek fólie umístěný v drátěné klínce; 1 – vzorek fólie, 2 – koncová značka, 3 – drátěná mřížka, X – směr po obvodu rukávu polyethylenové fólie, Y – směr osy rukávu polyethylenové fólie (směr vyfukování)



Obr. 4. Upevnění značky na vzorek fólie; A – značka – čtvercový plíšek 10×10 mm (vlevo před upevněním na rameno vzorku, vpravo připevněná na vzorku), B – koncová část jednoho ramene vzorku fólie, jehož tvar je ukázán na obr. 3. Značka se nastříhne do hloubky 5 mm. Délky 2 a 3 se ohnou kolmo k dílům 1 a provléknou otvorem, nařiznutým v rameni vzorku ve vzdálenosti 5 mm od konce. Díl 3 se pak ohne ve směru šipky, díl 2 směrem opačným

zajede do krajní polohy, uvolní dráhu pro pohyb druhého snímače v kolmém směru. Rychlost pohybu je $2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, takže přejetí celého měřicího pole jedním snímačem trvá 78 s a celková doba jednoho cyklu měření je 157 s.

Jednočipový mikropočítač zaznamenává pořadové číslo kroku, ve kterém se změnilo osvětlení fototranzistoru a při-

slušný údaj přepočtený na délkové jednotky vysílá jako sériový signál v normě RS232 k dalšímu zpracování v osobním počítači. Pro výsledné vyhodnocení je důležitý rozdíl mezi nejvzdálenějšími okraji fólie, resp. koncových značek na fólii. Případný malý posuv fólie nemá na výsledek měření vliv.

Přístroj je třeba umístit na vodorovnou podložku. Hladina kapaliny v nádobce musí být rovnoběžná s hranami měřicí cely. Mírný sklon aparatury (do 2°) však neovlivňuje výsledky měření. Měření je prováděno při teplotě místnosti nebo ve vzdušném termostatu.

Zkušební měření

Postup měření: Vzorek fólie opatřený koncovými značkami se v drátěné mřížce vloží do suché měřicí nádoby, zapne se měřicí systém a asi 5 minut jsou zaznamenávány rozměry suchého vzorku. Poté je měřicí cela naplněna kapalinou a měření probíhá až do ustálení signálu.

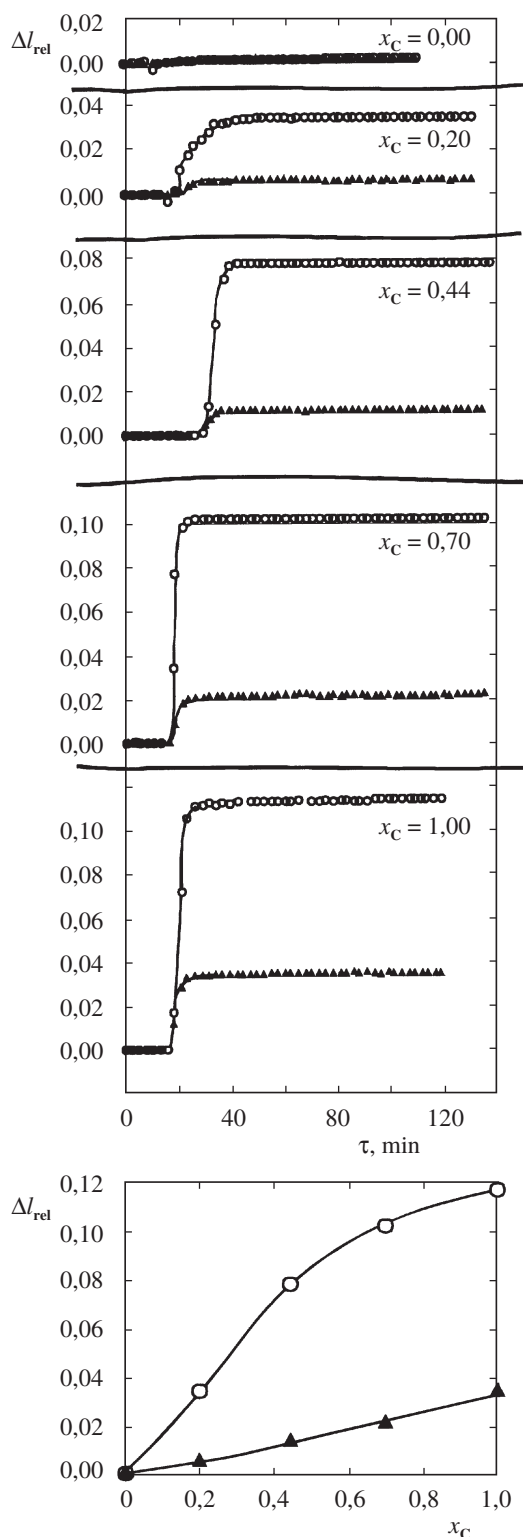
Protože přístroj umožňuje měřit rozměry ve dvou navzájem kolmých směrech, mohou měření na vzorcích vyříznutých z fólie postupně v různých směrech poskytnout informace o případné anizotropii materiálu.

Jako typicky anizotropní materiál byl zvolen nízkohustotní polyethylen (hustota $0,919 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) ve tvaru fólie o tloušťce 0,1 mm.

Izotropní chování (obr. 6) vykazovaly fólie připravené z impranilu DLH (40 % vodná disperze anionaktivního alifatického polyesterurethanu – fa Bayer AG) litím na skleněnou desku. Fólie měla tloušťku 0,225 mm, hustotu $1,1227 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Výsledky měření roztažnosti, vyjádřené relativním prodloužením, $\Delta l_{\text{rel}} = (l_o - l)/l_o$, jsou pro systém polyethylen v binárních směsích toluen + 1-butanol uvedeny na obr. 5, pro systém Impranil v binárních směsích toluen + cyklohexan na obr. 6. V obou případech je ukázána časová závislost relativního prodloužení i závislost relativního prodloužení na složení kapaliny, v níž vzorek botná, vyjádřeném molárním zlomkem.

Při zkušebních měřeních byla zjištěna reprodukovatelnost stanovení změny lineárních rozměrů 0,04 mm.



Obr. 5. Výsledky měření roztažnosti polyethylenu v binárních směsích toluen + 1-butanol; nahoře: závislost relativního prodloužení Δl_{rel} na době trvání experimentu τ (min), dole: závislost relativního prodloužení Δl_{rel} na složení kapalné směsi, udané molárním zlomkem cyklohexanu (x_c), ○ směr X, ▲ směr Y

Z údajů o změnách lineárních rozměrů lze získat za určitých předpokladů informace o objemovém nabotnutí ($Q_v = \Delta V/V_0$, kde $\Delta V = \Delta X \cdot \Delta Y \cdot \Delta Z$ je změna objemu vzorku, V_0 objem suchého vzorku) pro Impranal za předpokladu, že změna třetího rozměru ΔZ je stejná jako změna v měřených směrech X a Y. Pro polyethylen byla mikrometrickým šroubem změněna tloušťka vrstvy 10 fólií před a po nabotnutí v kapalině.

Protože v literatuře nebyla nalezena podobná data, bylo botnutí obou polymerů pro porovnání měřeno také metodou vážení a metodou měření úbytku kapaliny.

Metoda vážení. Při obvyklém postupu používaném v chemii polymerů je zvážen nejprve suchý polymer a pak, po vyjmutí z kapaliny a osušení, polymer nabotnalý. Reprodukovatelnost tohoto způsobu měření je však u tenkých fólií nedostatečná; proto byl vypracován tento postup vážení: do váženky, jejíž dno i vnitřní stěny byly vyloženy filtračním papírem, byl po vyjmutí z kapaliny umístěn kruhový vzorek nabotnalé fólie tak, aby se filtračního papíru dotýkal pouze hranami. Asi po jedné hodině, kdy papír odsál přebytečnou kapalinu (tato doba byla zjištěna opakovanými pokusy), byla váženka s fólií zvážena, pak byla fólie rychle vyjmuta a uzavřená váženka se zbylým obsahem znovu zvážena. Tento způsob umožnil stanovit množství sorbované kapaliny např. u systému polyethylen + toluen (systém s malým stupněm nabotnutí) se střední odchylkou 3 %.

Objem kapaliny pohlcené polymerem byl měřen Dogatkinovým přístrojem^{1,5}. Naměřené hodnoty bylo při měření impranalových fólií nutno korigovat na množství kapaliny ulpívající v horních partiích přístroje. U polymerů s velkým stupněm nabotnutí je toto množství proti objemu pohlcené kapaliny zanedbatelné. Pro polyethylenové fólie nebyl tento způsob použitelný, neboť slepé pokusy ukázaly, že korekce by byla o řád větší než úbytek kapaliny, způsobený sorpcí⁴.

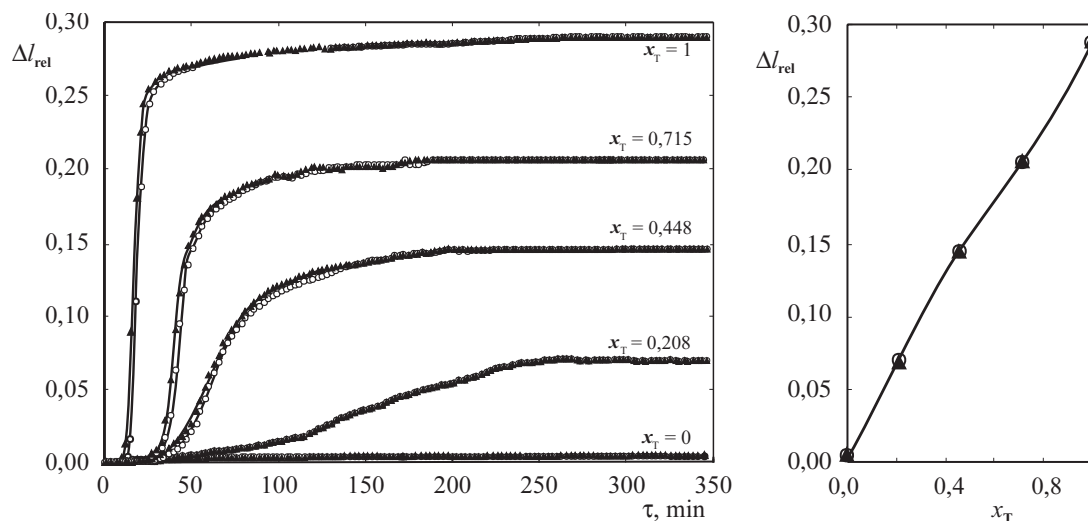
Abyste bylo možno porovnat hodnoty naměřené různými metodami, byl Q_v , získaný ze změny lineárních rozměrů, přepočten na hmotnostní stupeň nabotnutí:

$$Q_m = \frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta V \cdot \rho_\lambda}{V_0 \cdot \rho_s}$$

kde Δm je změna hmotnosti vzorku v důsledku sorpce kapaliny, m_0 počáteční hmotnost suchého vzorku, ρ_λ hustota kapaliny, ρ_s hustota suchého polymeru. Tento přepočet je možný pouze tehdy, je-li splněn předpoklad aditivity objemů. Pro systém Impranal + toluen se maximální stupeň nabotnutí zjištěný ze změny rozměrů lišil od Q_m získaného vážením o +1,5 %, od Q_m zjištěného měřením objemu pohlcené kapaliny o -3 %. U systému polyethylen + toluen činil rozdíl mezi hodnotami Q_m ze změny rozměrů a vážením -6 %.

Závěr

Přístroj je vhodný ke sledování botnutí polymerů ve tvaru tenkých fólií, zvláště pro anizotropní materiály. Údaje o změnách lineárních rozměrů mohou být za určitých předpokladů využity k výpočtu objemového stupně nabotnutí. Ze záznamu lze také získat informace o kinetice botnutí. Reprodukovatelnost



Obr. 6. Výsledky měření roztažnosti Impranilu DLH v binárních kapalných směsích toluen + cyklohexan; vlevo: závislost relativního prodloužení Δl_{rel} na době trvání experimentu τ (min), vpravo: závislost relativního prodloužení Δl_{rel} na složení kapalné směsi, udané molárním zlomkem toluenu (x_T), \circ směr X, \blacktriangle směr Y

nost měření změny lineárních rozměrů je 0,04 mm, minimální chyba měření je 0,01 mm.

LITERATURA

1. Pouchlý J., Vavruch I.: *Fyzikální chemie koloidních soustav*. SNTL, Praha 1960.
2. Dušek K., Seidl J., Malinský J., Dušková D.: *Chem. Prum. II*, 439 (1961).
3. Enneking L., Stephan W., Heintz A.: *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 97, 912 (1993)
4. Wojnarová I.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 1995.
5. Ulický L., Vavra J.: *Fyzikálna chémia, laboratorne cvičenia*. Alfa, Bratislava 1974.

T. Bartovský^a and L. Bartovská^b (^a*Institute of Physics and Measuring Techniques*, ^b*Department of Physical Chemistry, Prague Institute of Chemical Technology*): **An Apparatus for Continuous Measurement of Polymeric Foil Expansion in Liquids**

In the framework of the study of sorption properties of polymers used in membrane separation processes, an apparatus was designed for continuous measurements of polymer expansion. The apparatus was tested by measuring expansion of isotropic and anisotropic materials in aromatic, linear aliphatic, and alicyclic hydrocarbons, in alcohols, and in hydrocarbon and hydrocarbon – alcohol mixtures.

POUŽITÍ VOLTAMETRICKÝCH METOD KE SLEDOVÁNÍ OBSAHU OLOVA V ORGANISMU PŘI RŮZNÝCH ZPŮSOBECH INTOXIKACE

TOMÁŠ NAVRÁTIL^a, ZDEŇKA DLASKOVÁ^b,
DANA PELCLOVÁ^b a LADISLAV NOVOTNÝ^a

^aUNESCO Trace Element Satellite Center, Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Do-
lejškova 3, 182 23 Praha 8, e-mail: Navratil@jh-inst.cas.cz,
^bToxikologická laboratoř, Klinika nemocí z povolání, 1. lékař-
ská fakulta, Univerzita Karlova, Na Bojišti 3, 128 00 Praha 2

Došlo dne 21.I. 1999

Klíčová slova: voltametrie, intoxikace olovem, analýza moči,
krve a stolice, kys. δ-aminolevulová, porfyriny;

Úvod

V současné lékařské praxi je otrava olovem obvykle prokazována chemickou cestou¹ měřením koncentrace olovnatých iontů v krvi a v moči, případně ve stolici (povětšinou atomovou absorpční voltametrií (AAS)), stanovováním kyseliny δ-aminolevulové (ALA) (UV/VIS spektrometrií) v moči a porfyrinů (UV/VIS spektrometrií) v moči. Stav intoxikace pacienta se charakterizuje pomocí všech těchto indikátorů současně.

Provádění všech uvedených analýz podle předepsaných postupů^{2,3} je značně časově i instrumentálně náročné. Určité zjednodušení představuje voltametrické stanovení olova navržené v práci⁵. V předkládané práci byla použitelnost této metody ověřena při různých způsobech intoxikace

Experimentální část

Pro voltametrická měření byl použit jednak polarografický analyzátor PA-3 se statickou rtuťovou elektrodou SMDE-1 v režimu visící rtuťové kapkové elektrody HMDE (vs. referentní nasycená argenochloridová a pomocná platinová elektroda), ve spojení se zapisovačem XY 4105 (vše Laboratorní přístroje, Praha), jednak počítačem řízený Eco-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, spol. s r. o., Praha)⁴.

Pracovní metodou byla diferenční pulsní anodická roz-pouštěcí voltametrie v režimu „fast scan“. Pro odstranění vzdušného kyslíku sloužilo vybublání dusíkem.

Při fotometrických stanoveních byl užit spektrofotometr Spekol 11 (Carl Zeiss Jena). Mineralizace odebraných vzorků byla prováděna za pomoci topného hnízda a vodní lázně.

Při určování, zda mezi náhodnými experimentálně určovanými proměnnými je nějaká závislost, byla posuzována její těsnost pomocí tzv. korelačního koeficientu ρ resp. jeho odhadu r (cit⁵⁻⁷). Ten charakterizuje těsnost závislosti dvou náhodných veličin pro případ, že jde o závislost lineární. Jeho výpočet a způsob aplikace včetně ověření tzv. nulové hypotézy je podrobně zpracován v cit.⁵

Mineralizace

Tělní vzorky (krev, moč i stolice) byly před analýzou mineralizovány předepsaným postupem¹. Konkrétní postup včetně homogenizace byl popsán hlavně v cit.^{1,2,8}. V našem případě byl při mineralizaci krve, moči i stolice použit postup popsaný v našem sdělení⁵.

Voltametrické stanovení olovnatých iontů

10 ml mineralizátu bylo převedeno do voltametrické nádoby a okyseleno 0,1 ml koncentrované HCl. Měření bylo prováděno metodou katodické diferenční pulsní voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě v dvouelektrodovém zapojení s počátečním potenciálem $E_{in} = -200$ mV a konečným $E_{fin} = -500$ mV vs. nasycená kalomelová elektroda SKE, rychlostí polarizace 20 mV.s⁻¹. Pík olova byl registrován u -375 mV vs. SKE. Při vyhodnocení voltametrických měření byla použita metoda standardního přídatku. Každé měření bylo třikrát opakováno.

Stanovení porfyrinů a kyseliny δ-aminolevulové

Stanovení moči a kyseliny δ-aminolevulové bylo prováděno spektrofotometricky podle postupů popsaných v našem předchozím sdělení⁵.

Charakteristika sledovaných osob

a) Perorální otrava

Pacientka (17 let, váha 51 kg, výška 163 cm) úmyslně požila větší množství (cca 700 ks) olovených diablek, s cílem omezit chuť k jídlu (perorální otrava).

b) Otrava s kombinovanou cestou vstupu

Pacient (32 let, váha 89 kg, výška 182 cm) byl zaměstnán při montáži licích automatů na olovo. Na jeho pracovišti byly soustavně vyšší hladiny koncentrace olova ovzduší (5 až 25krát), než připouští norma což bylo příčinou chronické intoxikace olovem.

c) Inhalační otrava

Pacient (38 let, váha 84 kg, výška 172 cm) byl zaměstnán jako tavič olova u šachtové pece. Na jeho pracovišti byly soustavně zjišťovány (3 až 85krát) vyšší hodnoty hladiny olova v ovzduší, než připouští norma. Příčinou hospitalizace byla profesionální intoxikace olovem.

Výsledky a diskuse

Výsledky stanovení indikátorů otravy

Při stanovení olova v moči byla standardní relativní odchylka samotného měření pod 1 %. Reprodukovatelnost záznamů byla lepší než ± 1 %. Mezilaboratorní reprodukovatelnost stanovení se pohybovala v rozmezí ± 15 %. Obdobně

hodnoty reprodukovatelnosti i mezilaboratorní reprodukovatelnosti byly dosaženy i při stanovení ostatních sledovaných indikátorů otravy.

Vyhodnocována byla stanovení jak absolutního množství výše uvedených látek vyloučených z těla za jeden den (kyseliny δ -aminolevulové, semikvantitativních porfyrinů, olova v moči a v krvi) (viz např. obr. 1), tak jejich koncentrace v krvi a v moči (kyseliny δ -aminolevulové, olova v moči, v krvi a ve stolici) (viz např. obr. 2). Pokud byl odběr prováděn vícekrát za den, byl proveden u absolutních množství součet a u koncentrací výpočet váženého průměru.

Vzhledem k tomu, že u pacientky s perorální otravou bylo přibližně známo, jaké množství olovených broků pozřela, bylo voltametricky sledováno i celkové množství vyloučeného olova v moči (obr. 3).

Optimalizace počtu a druhu měření

Pro optimalizaci měření byly korelovány koncentrační výsledky i absolutní množství vyloučených látek následovně:

1. *Bez použití antidot:* a) Výsledek ze dne d vs. výsledek ze dne d ; b) výsledek ze dne d vs. výsledek ze dne $d + 1$; c) Výsledek ze dne d vs. výsledek ze dne $d - 1$;
2. *Při užití antidot:* a) Výsledek ze dne d vs. výsledek ze dne d ; b) Výsledek ze dne d vs. výsledek ze dne $d + 1$; c) Výsledek ze dne d vs. výsledek ze dne $d - 1$; d) Výsledek ze dne $d + 1$ vs. výsledek ze dne $d + 1$.

Cílem porovnání bylo zjištění případných časových souvislostí mezi analyzovanými složkami v průběhu metabolických procesů.

Z literatury je známo, že dosahované korelace jsou ze statistického pohledu, velmi nízké. Např. podle cit.⁹ u sledovaných pracovníků exponovaných olovu po delší dobu byly zjištěny korelační koeficienty mezi výsledky jednotlivých stanovení max. 0,8, běžně však kolem 0,3–0,5.

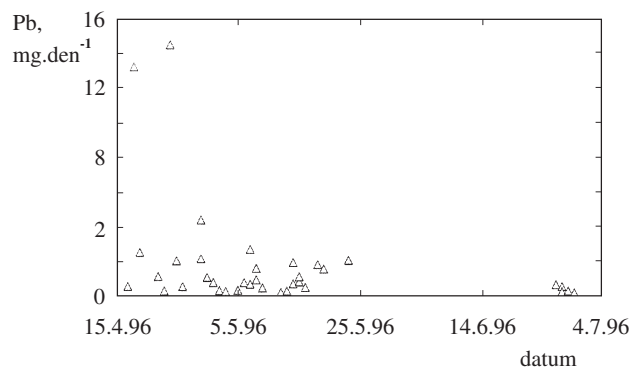
Srovnání výsledků jednotlivých typů otrav

Kombinovaná cesta vstupu

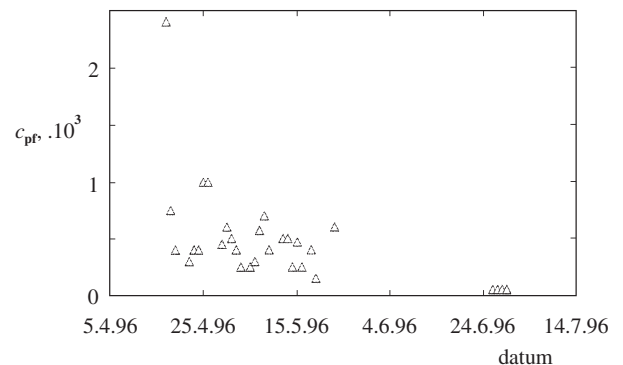
Zmíněný pacient nebyl léčen antidoty. Výběrové párové korelační koeficienty dosahovaly pouze relativně nízkých hodnot (nejvyšší r u absolutních množství nedosahovalo ani 0,3 a u koncentračních množství 0,4), což však odpovídá poznatkům dle cit.⁹ Tyto výsledky neodpovídají očekávané profesionální otravě, ale naznačují, že ke vstupu kovu do těla došlo více cestami.

Inhalační otrava

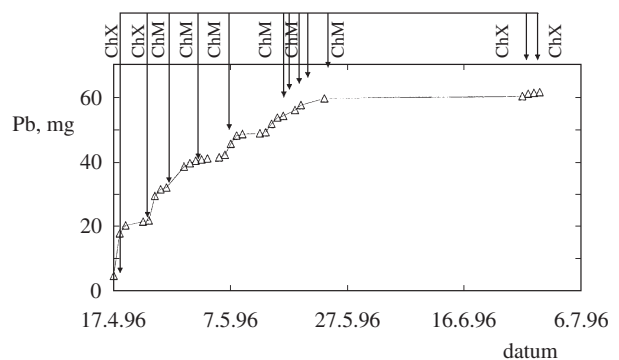
Také tento pacient nebyl léčen antidoty. Korelace mezi výsledky stanovení absolutního množství δ -aminolevulové kyseliny a semikvantitativně stanovených porfyrinů z jednoho dne hospitalizace d dosahovaly hodnot pouze okolo $r = 0,56$, avšak korelace výsledků ze dne hospitalizace d s výsledky ze dne hospitalizace $d - 1$ (resp. $d + 1$) těchto látek již dosahovala $r = 0,92$ až $0,98$. Korelace mezi koncentracemi těchto látek ze stejných dnů byly o něco nižší, avšak přesto dosáhly významných hodnot ($r = 0,88$ – $0,89$).



Obr. 1. Absolutní množství olova v moči pacientky s perorální otravou během léčby



Obr. 2. Koncentrace semikvantitativně stanovených porfyrinů c_{pb} (mg.l^{-1}) v moči pacientky s perorální otravou během léčby



Obr. 3. Celková suma vylučovaného olova v moči během léčby pacientky s perorální otravou; šipky označují použití Antidot: ChX – Chelintox a ChM – Chemet

Zároveň došlo ke zvýraznění korelací mezi koncentrací δ -aminolevulové kyseliny a olova v moči (z cca $r = -0,02$ na $-0,55$).

Perorální otrava

Korelace absolutních množství sledovaných látek ve dnech bez podávání antidot byly porovnány s obdobnými hodnotami při jejich aplikaci; dosáhly hodnoty až $r = 0,69$ (absolutní

množství kyseliny δ -aminolevulové vs. absolutní množství semikvantitativně stanovených porfyrinů). Při korelování absolutních množství vyloučených indikátorů otravy v jednotlivých dnech léčby, kdy byla podávána antidota, se dnem následujícím byly hodnoty r nevýznamné ($r < 0,30$).

Srovnání korelací koncentračních hodnot ze všech dnů hospitalizace při podávání antidot vykazala nejvyšší korelaci dvojice: koncentrace δ -aminolevulové kyseliny vs. semikvantitativně stanovené porfyriny ($r = 0,74$), obdobně jako koncentrace semikvantitativně stanovených porfyrinů vs. koncentrace olova v krvi ($r = -0,68$). Korelace s koncentrací olova v moči byla poněkud nižší ($r = 0,55$).

Pokud byly korelovány jen koncentrace analytů ve dnech podání antidot, byly obdrženy absolutně nejvyšší korelace ($r = -0,54$) u dvojice olovo v moči vs. olovo v krvi, (i když ze statistického hlediska málo významné); u této dvojice došlo k podstatnému zvýšení oproti dnům bez podání antidot ($r = -0,03$).

Obecně lze konstatovat, že výběrové párové korelační koeficienty pocházející z korelací dnů následujících po dnech podání antidot byly vyšší, i když nedosahovaly obdobných hodnot ze stejných dnů odběru.

Ostatní korelace koncentračních hodnot i absolutních množství byly zanedbatelné.

Případ perorální otravy se jevil vhodným pro provedení srovnání jednotlivých ukazatelů otravy, neboť bylo možno předpokládat, že pro relativně nízký věk pacientky (17 let) a pobyt v životním prostředí znečištěném olovem pod hygienickými normami, byl její organismus před otravou zatížen pouze běžným pozadím sledovaného olova. Nebylo známo, že by dříve pacientka trpěla chorobou, která by mohla výsledky stanovených složek zkreslit. Korelace byly relativně nízké, neboť organismus z části teprve vytvářel depozitum olova.

Závěr

Provedená měření plně prokázala, že voltametrie je z hlediska časové a investiční náročnosti i přesnosti vhodnou metodou pro určování všech typů otravy organismu olovem. Po provedené mineralizaci vzorků, která je stejná jako při užití AAS, lze voltametrické metody, především pak DPV, aplikovat ke stanovení koncentrace (resp. absolutního množství) olova v krvi, v moči i ve stolici.

Dále byl proveden pokus o optimalizaci počtu a druhu prováděných stanovení prostřednictvím výpočtů výběrových párových korelačních koeficientů mezi jednotlivými ukazateli u všech způsobů otravy olovem. Bylo jisté, že s délkou doby expozice olovu rostou i korelace mezi jednotlivými indikátory

otravy. U osob s delší dobou expozice (a tím pádem i s tzv. vyšším depozitem) dochází po podání antidot ke zvýšenému vylučování indikátorů otravy.

Z vypočtených výsledků vyplynulo, že nejvyšší hodnoty párových korelačních koeficientů byly nalezeny mezi koncentrací, resp. absolutním množstvím kyseliny δ -aminolevulové a ostatními indikátory. Pro potvrzení tohoto závěru bude však třeba provést srovnání většího počtu vzorků od různých pacientů při různých typech otrav.

Autoři děkují za finanční podporu grantu GA ČR reg. č. 203/98/P239.

LITERATURA

1. Bardoděj Z., David A., Šedivec V., Škramovský S., Teisinger J.: *Expoziční testy v průmyslové toxikologii*. Avicenum, Praha 1980.
2. De Medinilla J., Espigares M.: *J. Soc. Occup. Med.* 41, 107 (1991).
3. Grabecki J., Haduch T., Urbanovica H.: *Int. Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg.* 23, 226 (1967).
4. *Manuál k počítačovému Eco-Tribo Polarografu PC-ETP*. Polaro-Sensors, Praha 1994–98.
5. Dlasková Z., Navrátil T., Novotný L., Pelclová D., Mádllová P.: *Chem. Listy* 93, 142 (1999).
6. Eckschlager K.: *Chemometrie*. Karolinum, Praha 1991.
7. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Edice Plus, Praha 1994.
8. Goldfrank L. R., Flomenbau N. E.: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*, 5. vyd. Appleton and Lange, New York 1994.
9. Hirata M., Yoshida T., Miyajima K., Kosaka, H. Tabucho T.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 68, 58 (1995).

T. Navrátil^a, Z. Dlasková^b, D. Pelclová^b, and L. Novotný^a (^a*UNESCO Trace Element Satellite Centre, J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic*, ^b*Toxicological Laboratory, Clinic for Occupational Diseases, First Medical Faculty, Charles University, Prague*): **Use of Voltammetric Methods for Investigation of Lead Content in Organism in Various Intoxications**

Applicability of voltammetric methods to lead determination in various intoxications was verified. The measurements proved that voltammetry is, from the viewpoints of time and investment demands as well as accuracy, an appropriate method for diagnosis of all types of lead intoxications.

AZEOTROPICKÝ NÁSTAVEC PRO ESTERIFIKACE V ROZPOUŠTĚDLECH LEHČÍCH NEŽ VODA, MODIFIKOVANÝ PRO POUŽITÍ MOLEKULOVÉHO SÍTA

JIRÍ PODEŠVA

Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6
e-mail: podesva@imc.cas.cz

Došlo dne 21.I.2000

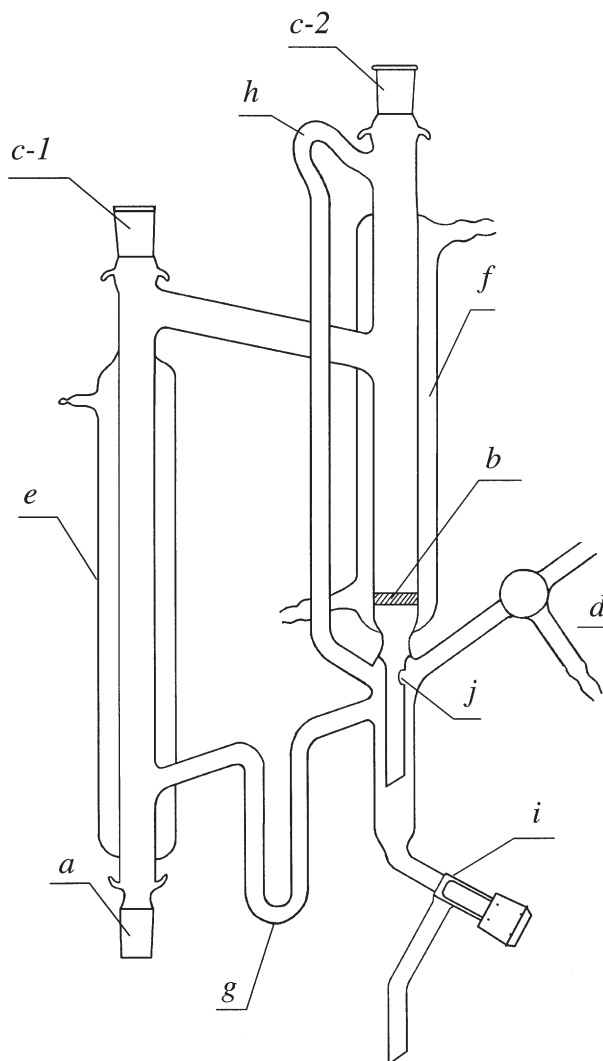
Klíčová slova: azeotropický nástavec, esterifikace, molekulové síto

1. Úvod

Azeotropické nástavce se běžně používají při organických preparacích^{1,2}, při kterých se uvolňuje reakční voda, např. při esterifikacích, prováděných v rozpouštědlech tvořících s vodou azeotropickou směs. Někdy se však stává, že vroucí rozpouštědlo s sebou strhává malá množství nějaké látky, např. některé z reakčních komponent, která může působit jako kompatibilizátor směsi organické rozpouštědlo–voda, a místo ostře oddělených fází se v nástavci tvoří emulze. V některých případech se tento problém dá obejít tak, že přímo do reakční směsi vložíme aktivované molekulové síto, které reakční vodu váže (v takovém případě se lze obejít i bez nástavce, pouze se zpětným chladičem), ale tento postup není univerzální a může mít za následek nezanedbatelné ztráty produktu. Podle uspořádání navrženého v tomto příspěvku je molekulové síto umístěno tak, aby nepřišlo do styku s reagující směsí.

2. Technické provedení

V naší laboratoři se pro malé objemy reakční směsi a pro rozpouštědla lehčí než voda osvědčila následující konstrukce azeotropického nástavce, který kombinuje oddělování vody z azeotropu s jejím zachycováním v molekulovém sítu mimo vlastní reakční směs. Aparát dovoluje i provádění reakcí pod inertní atmosférou. Jeho funkce je zřejmá z obr. 1: baňka s reakční směsí se umísťuje na zábrus *a*, do prostoru nad fritu *b* se nasype aktivované molekulové síto; zábrus *c-1* může sloužit k připojení teploměru nebo dělicí nálevky, zábrus *c-2* pak k umístění probublávačky s vhodnou náplní pro kontrolu průchodu inertního plynu, přiváděného trojcestným kohoutem *d*; trubice *e* nemá funkci kolony, nýbrž slouží k vyvedení par nad úroveň molekulového síta s co nejmenšími tepelnými ztrátami (evakuovaný plášť je výhodný, ale lze jej samozřejmě nahradit jinou izolací); páry se po kondenzaci vodním chladičem *f* a zachycení vody sítím vracejí zpět do baňky sifonem *g*; tlakový gradient, který vždy vzniká mezi prostorem nad sítím a pod fritou *b*, je nutné vyrovnávat trubicí *h*. (Frita *b* může někdy „rozrážet“ eventuální stékající emulzi, takže se lze v některých případech obejít bez molekulového síta a vznikající vodu oddělit kohoutem *i*.)



Obr. 1. Azeotropický nástavec: Všechny zábrusy (*a*, *c-1*, *c-2*) jsou NZ-14; *b* je vtavená fritra s velkou porozitou (S-0), *d* trojcestný kohout pro přívod inertního plynu, *e* evakuovaný izolační plášť, *f* vodní chladič, *g* sifon pro zpětný tok rozpouštědla, *h* trubice pro vyrovnávání tlakového rozdílu, *i* teflonový kohout (např. Rotaflon) pro event. vypouštění reakční vody, *j* otvor ve stonku

3. Příklady použití

Uvedená aparatura byla s úspěchem použita pro následující dvě esterifikace, vyžadující šetrné podmínky: *i*) příprava 6-sulfanylhexyl-3-(3,5-di-*terc*-butyl-4-hydroxyfenyl)propanoátu z kyseliny 3-(3,5-di-*terc*-butyl-4-hydroxyfenyl)propanové a 6-sulfanylhexan-1-olu, *ii*) příprava 3-(3,5-di-*terc*-butyl-4-hydroxyfenyl)propyl-3-sulfanylpropanoátu z 3-(3,5-di-*terc*-butyl-4-hydroxyfenyl)propan-1-olu a kyseliny 3-sulfanylpropanové. V obou případech bylo použito molekulové síto (typ 4A, 8×12 mesh, Union Carbide) aktivované v proudu dusíku při 300 °C, benzen jako rozpouštědlo a kyselina 4-methylbenzen-1-sulfonová jako katalyzátor. (Thioly jsou všeobecně citlivé vůči vzdušnému kyslíku, a proto byly obě esterifikace prováděny pod argonem.)

Tato publikace byla vypracována v rámci grantu č. A4072902, uděleného Grantovou agenturou Akademie věd České republiky.

LITERATURA

1. Kolektiv autorů: *Organická syntéza/Organikum*, str. 78. Academia, Praha 1971.
2. Keil B.: *Laboratorní technika organické chemie*, 2. vydání, str. 371. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1963.

J. Podešva (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **An Azeotropic Adapter Designed for Small-Scale Esterifications Using Solvents Lighter than Water**

A glass apparatus has been designed for performing small-scale esterifications in solvents such as benzene. To prevent formation of solvent/water emulsion, water released is trapped by an active molecular sieve which is located outside the reaction mixture. The adapter can also be used for reactions under inert atmosphere. Two application examples are given.

Odborná skupina pro chemickou termodynamiku České společnosti chemické
a Katedra anorganické technologie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice

pořádají seminář

Teoretický a experimentální výzkum v oboru chemické a chemicko-inženýrské termodynamiky na vysokých školách a akademických ústavech v České republice

Termín: 12. září 2000 v rámci oslav 50. výročí založení Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice

Místo konání: Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice

Kontaktní osoba: doc. Ing. Vratislav Velich, CSc., FCHT Univerzita Pardubice, nám. Legií 565, 532 10 Pardubice, tel. 040-512911, e-mail: vratislav.velich@upce.cz

RECENZE

Miroslav Raab:

Materiály a člověk**(Netradiční úvod do současné materiálové vědy)**

Encyklopedický dům, Praha 1999. Stran 228; cena 290,- Kč.

Materiálová věda je název oboru v češtině dosud málo používaný, ačkoliv jde o významnou vědní disciplinu, jež se výrazně konstitovala v druhé polovině 20. století jako „material science“ a patří k nejprogresivnějším vědeckým a technickým oborům poslední doby. Pod názvem nauka o materiálu byl tento obor u nás již dlouho uznáván a měl svou tradici zejména na vysokých školách strojínského zaměření. Poznání širších souvislostí, plynoucích z nástupu nových typů materiálů (zejména organických polymerních, nových materiálů keramických aj.), zdůraznilo potřebu posílení ucelené disciplíny integrující poznatky fyziky, chemie a aplikovaných věd pod nahofe uvedeným názvem.

V české odborné literatuře již delší dobu zřetelně chyběla souborná práce, jež by se zabývala všemi typy materiálů a ukázala názorně, že materiálová věda je vyhraněným oborem zasluhujícím zvýšenou pozornost. Tuto mezeru vyplňuje sympatická kniha M. Raaba, jež přináší živým a poutavým způsobem nejen dnešní odborný pohled na materiály tradiční i moderní, ale uvádí také souvislosti s vývojem lidské civilizace, v níž materiály hrály od pradávna významnou roli. Jestliže lze knihu označit za popularizující, pak to neznamená její nízkou náročnost ani potlačení vědeckých aspektů. Knihu ocení zejména čtenáři, usilující o ucelenou informovanost o trendech vědy a techniky, a také pracovníci materiálových oborů, jimž užší odborné zaměření a specializované prostředí někdy neskýtá mnoho podnětů k tomu, aby uvažovali o zobecnění speciálních poznatků nebo o jejich umístění do širšího kontextu.

Úvodní stati knihy se zamýšlejí nad historií materiálů a revolučními změnami v jejich vývoji až po dnešek, a také nad perspektivami dalšího vývoje. Na tyto úvahy pak navazují kapitoly o poznacích, jež tvoří základ materiálové vědy. Především jsou to otázky podstaty hmoty, látek a materiálů z pohledu chemické vazby a krystalové struktury (vč. látek amorfních). Materiál je zde definován jako to, z čeho je uděláno něco fyzického (hmotného) a užitečného (str. 49), což je zúžená definice běžného vícevýznamového slova materiál, a tak je tento pojem chápán v materiálové vědě. Snad by bylo možno tuto definici doplnit zdůrazněním pevné konzistence a převažující fyzikální funkce materiálů. Jak autor uvádí, jeho záměrem bylo soustředit se hlavně na materiály konstrukční, a tomu odpovídá zařazení poměrně rozsáhlé kapitoly o mechanice materiálů a mechanických vlastnostech, zatímco o jiných fyzikálních vlastnostech se pojednává později v souvislosti s jednotlivými typy materiálů a jejich využitím, často v souvislosti s realizací nových výrobních postupů nebo nových fyzikálních objevů. Autor věnuje pozornost také materiálům kompozitním, o nichž se pojednává z pohledu dominujících mechanických vlastností, v souvislosti s typem jednotlivých fází kompozitu, až po tzv. nanokompozity, jež jsou dnes intenzivně studovány.

Další kapitoly se zabývají podrobněji jednotlivými typy materiálů, jež jsou rozděleny obvyklým způsobem na materiály kovové, anorganické nekovové a organické polymerní. Tyto partie uvádějí v přiměřené proporcii historické údaje a mezníky ve vývoji materiálů, na nichž lze dobře demonstrovat vývoj názorů na strukturu a vztah k vlastnostem. Vedle tradičních materiálů jsou akcentovány progresivní typy a směry vývoje (např. kovová skla, keramické supravodiče, optická vlákna, kapalně krystalické polymery, hydrogely aj.). Zejména kapitola o polymerních materiálech dává autorovi příležitost ukázat poutavým způsobem sled objevů, jež tento obor přivedly k dnešní úrovni a k dnešnímu významu. Stati o anorganických materiálech rovněž dobře vystihují podstatné rysy a pestrost této skupiny materiálů, i když obsahují některé nepřesnosti. To je dosti obvyklý úděl autorů, usilujících o postižení širších souvislostí a obecnější interpretace v oblastech, jež jsou jejich aktivnímu působení vzdálenější (táž nesnáž postihuje ovšem i recenzenta takové práce).

K nejzajímavějším statím knihy náleží kapitola o přírodních materiálech, jež vždy byly, a dosud jsou pro výjimečné mechanické vlastnosti inspirací pro další vývoj materiálových oborů (dřevo, kosti, ulity a lastury, pavoučí vlákna aj.). Závěrečné kapitoly pojednávají o reologických aspektech materiálové vědy, o stárnutí a únavě materiálů, krátce také o jejich korozi a degradaci. Materiály pro třetí tisíciletí se budou patrně vyvíjet zejména ve směru materiálů kompozitních, biomimetických (napodobujících přírodní materiálové principy) a tzv. inteligentních (chytrých) materiálů reagujících změnou vlastností na vnější podněty.

Závěrem lze konstatovat, že materiálová věda se jako obor původně formovala na základě převážně fyzikálního pohledu, kdy společným jmenovatelem materiálů, bez ohledu na chemickou podstatu, jsou fyzikální vlastnosti mechanické, optické, elektrické aj., jež určují funkci a použití daného materiálu. Význam chemických přístupů se projevil v plné míře s nástupem organických polymerů, kde je zvlášť zřetelné, že struktura a výsledné vlastnosti jsou záležitostí chemických procesů přípravy materiálů, což platí ovšem i pro materiály anorganické, kovové i nekovové. V chemickém pohledu se však zvyrazňuje rozdíl mezi hlavními skupinami materiálů v tom smyslu, že polymerní materiály navazují hlavně na makromolekulární chemii, zatímco anorganické materiály využívají, vedle klasické anorganické chemie, specifické disciplíny jako je chemie pevných látek, vysokoteplotní chemie aj. Pojednání o materiálech v jednotném pohledu fyziky a chemie je však v každém případě užitečné a podnětné.

Autorovi se podařilo znamenitým způsobem přiblížit materiálové obory širší odborné veřejnosti. Kniha si zaslouží vřelé doporučení jak pro svoji vědeckou a odbornou hodnotu, tak i pro zajímavé a čtivé podání. Může také být významnou pomůckou při rozhodování absolventů středních škol i vysokoškolačů o dalším směru studia.

Jan Hlaváč

OSOBNÍ ZPRÁVY

K šedesátinám RNDr. Václava Macháčka, DrSc.

RNDr. Macháček, narozený 28.6.1940, absolvoval Vyšší průmyslovou školu chemickou v Mostě se zaměřením na výrobu paliv a čištění odpadních vod. Již při studiu inklinoval k přemýšlivé práci, proto ho více zaujala analytická a fyzikální chemie než technologické přednášky. Po maturitě dostal umístěnku do tehdejších Stalinových závodů. Zde ovšem nevydržel dlouho, protože ocelová monstra na něj působila depresivně. Přešel do závodu Reagencie v Kralupech nad Vltavou – laboratorní výroba a analýza čistých chemikálií. Po ukončení vlastenecké povinnosti v armádě zůstal ve vojenském sportovním oddíle a nastoupil do vojenských laboratoří. Zde si ho všimnul dr. Maličský, bývalý asistent prof. Tomička, pro jeho preciznost a samostatnost v laboratorní práci. Doslova ho dotlačil k dálkovému studiu na jeho bývalé „alma mater“ – PřF UK, se zaměřením na analytickou chemii. Zde se poprvé setkal s takovými veličinami jako byli profesori Zýka, Suk, Doležal, Malát a další, které předtím znal jen z literatury. Studium ukončil v roce 1969, téma jeho diplomové práce bylo „Kinetické studium bromace organických sulfidů pomocí coulometrie s biamprometrickou indikací“, pod vedením prof. Zýky a pak prof. Doležala. Během studia navštěvoval i diskusní kroužky toxikologické a farmaceutické analýzy prof. Škramovského. Rigorózní práci obhájil v roce 1974 na téma „Využití moderních metod v analýze psychotropních látek“. Složil atestaci z farmaceutické analýzy a spolupracoval s Vojenskou technickou akademií v Brně a Vojenskou lékařskou fakultou v Hradci Králové. Pak mu ale bylo jako nestraníkovi znemožněno pracovat dále v této oblasti, a na doporučení prof. Zýky nastoupil do analytické laboratoře ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby (VÚRV) v Praze. V roce 1975–78 absolvoval postgraduální studium moderních analytických metod na VŠCHT v Praze. Ve VÚRV se věnoval modernizaci a automatizaci laboratoří pro sériové analýzy půd a rostlin. Začal řešit půdní dynamiku fosforu ve vztahu k výživě rostlin. Byl iniciátorem tuzemských kruhových testů a zapojení i do testů mezinárodních. Kandidátskou disertační práci obhájil za necelé tři roky, v roce 1981, na PřF UK v Praze na téma „Extrakčně spektrofotometrické stanovení fosforu v půdě, rostlinách a vodě pomocí tenzidů“ pod vedením prof. Maláta. Tato práce měla po publikaci v *Microchemical Journal* velký ohlas ve světě (54 žádostí o separát) a kromě pozvánek na různé konference dostal autor i pozvánky na stáže. Bohužel musel pozvání vždy slušně odřeknout...

Po roce 1989 začal jubilant pomýšlet na doktorskou disertaci. Po ověření starších výsledků a získání nových teoretických poznatků začal v roce 1994 se sepisováním práce na téma „Využití statických a kinetických metod pro stanovení přístupného fosforu v půdě“. V oboru „Obecná produkce rostlin-

ná“ obhájil práci v květnu 1997 a vědeckou radou ČZU v Praze mu byla udělena vědecká hodnost: Doktor zemědělsko-lesnických věd.

RNDr. Macháček pracuje aktivně i mimo svou vlastní vědeckou experimentální činnost. Od roku 1979 byl členem Komise půdní chemie a agrochemie při Československé akademii zemědělských věd, od roku 1982 jako člen předsednictva této komise a zároveň předseda pracovní skupiny „Analytické metody“, až do jejího rozdělení v roce 1993 na ČAZV a SAPV. Byl odborným garantem 5 analytických seminářů. Současně byl kooptován do Komise výživy rostlin odboru rostlinné výroby ČAZV. Na mezinárodním poli byl od roku 1985 hlavním řešitelem za ČSSR v mezinárodní komisi RVHP pro studium půdního fosforu, za což mu bylo uděleno i čestné uznání. V roce 1987 byl odborným garantem mezinárodní konference v Praze s tímto tematickým zaměřením. Je dopisujícím členem světové organizace pro fosfor IMPHOS se sídlem v Casablance a členem Evropské agronomické společnosti. Nyní je členem vědecké rady pro výživu rostlin VÚRV. Kromě dlouholetého členství v České společnosti chemické je i členem České pedologické společnosti. V současnosti pracuje ve funkci vedoucího Oddělení soustav hnojení Odboru výživy rostlin VÚRV.

Výsledky své vědecké práce RNDr. Macháček, DrSc. publikoval sám nebo jako spoluautor ve 32 závěrečných a dílčích zprávách a ve 48 publikacích ve vědeckém a odborném tisku; 53 prací je uvedeno ve sbornících různých mezinárodních a tuzemských konferencí a seminářů. Publikace měly velký ohlas ve světě, což potvrzuje přes 200 žádostí o separáty, nejvíce z USA a z Německa. Byla mu udělena tři „Autorská osvědčení“ na analytické metody stanovení půdního fosforu pomocí iontoměničů a jejich využití pro výživu rostlin. Jeho práce jsou uváděny v přehledných sbornících jako *Soil and Fertilizers*, *Field Crop Abstract*, *Referativnyj Žurnal*, *Revision Bibliografia Metodes de Extraccion and Abano*. Pedagogické práci se systematicky nevěnoval, byl však konzultantem různých prací na ČZU – Praha, MZLU – Brno a Jihočeské univerzitě – České Budějovice.

Spolupracovníci RNDr. Macháčka oceňují jeho vstřícnost, otevřenost, kolegialitu a dnes silně opomíjený filozofický nadhled nad „všespatitelným“ materialistickým konzumním myšlením. Stále si zachovává sportovní optimismus, a to nejen na teoretické úrovni, nýbrž i prakticky: prohání horské kolo a při své dobré fyzické kondici jezdí v kategorii veteránů několik maratónů ročně!

Široká rozvětvená rodina rostlinných výživářů a pedologů mu ke „kulatému“ životnímu jubileu srdečně gratuluje a přeje mu do dalších let neutuchající energii a aktivitu v práci i v soukromí. Ať Ti to, Václave, ještě dlouho dobře šlape!

Jaroslav Prugar

OBSAH

ÚVODNÍK	337
REFERÁTY	
Senzory s tuhými polymery pro měření vlhkosti plynů	338
P. Hrnčířová a F. Opekar	
Derivatizační reakce v kapilární elektroforéze aminokyselin	347
P. Mikuš a D. Kaniansky	
Purinové 8-O- a 8-S-cykonukleosidy – syntéza a vlastnosti	355
Z. Janeba	
Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace	371
P. Peterková a L. Lapčík, Jr.	
Chemické aspekty imobilizovaných systémů v biotechnologiích	380
M. Navrátil a E. Šturdík	
Afinní precipitace bílkovin	389
Z. Glatz	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Přístroj pro kontinuální měření roztažnosti polymerních fólií	397
T. Bartovský a L. Bartovská	
Použití voltametrických metod ke sledování obsahu olova v organismu při různých způsobech intoxikace	401
T. Navrátil, Z. Dlasková, D. Pelclová a L. Novotný	
Azeotropický nástavec pro esterifikace v rozpouštědlech lehčích než voda, modifikovaný pro použití molekulového síta	404
J. Podešva	
RECENZE	406
OSOBNÍ ZPRÁVY	407

CONTENTS

EDITORIAL	337
REVIEW ARTICLES	
Sensors with Solid Polymers for Determination of Relative Humidity of Gases	338
P. Hrnčířová and F. Opekar	
Derivatization Reactions in Capillary Electrophoresis of Amino Acids	347
P. Mikuš and D. Kaniansky	
Purine 8-O- and 8-S-cyclonucleosides – Synthesis and Properties	355
Z. Janeba	
Collagen – Properties, Modifications and Applications	371
P. Peterková and L. Lapčík, Jr.	
Chemical Aspects of Immobilized Systems in Biotechnologies	380
M. Navrátil and E. Šturdík	
Affinity Precipitation of Proteins	389
Z. Glatz	
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
An Apparatus for Continuous Measurement of Polymeric Foil Expansion in Liquids	397
T. Bartovský and L. Bartovská	
Use of Voltammetric Methods for Investigation of Lead Content in Organism in Various Intoxications	401
T. Navrátil, Z. Dlasková, D. Pelclová, and L. Novotný	
An Azeotropic Adapter Designed for Small-Scale Esterifications Using Solvents Lighter than Water	404
J. Podešva	
BOOK REVIEWS	406
PERSONAL NEWS	407

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 94 (2000), čís./no. 6 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 124, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 110 • ČASOPIS ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ • Bulletin roč./vol. 31 • Vydává Česká společnost chemická ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, s Českou společností průmyslové chemie a Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt PG 97142), Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • *Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, 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. Jiráťová • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, J. Churáček, Č. Jech, J. Káš, J. Košťál, J. Koubek, L. Lapčík, J. Lederer, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, P. Pavlas, I. Šibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ, INZERCÍ, 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 • SOUHRNÝ NA INTERNETU/PREPUBLISHED ABSTRACTS ON URL: http://staff.vscht.cz/chem_listy/index.html • TISK: PORS 052, Školní náměstí 11, 537 33 Chrudim; SAZBA: SF SOFT, Jinonická 329, 158 00 Praha 5 • Copyright © 2000 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 100 Kč, roční předplatné 2000 (12 čísel) 940 Kč. Předplatné ve Slovenské republice 2200 Kč. Pro členy ČSCH je sleva 50 %, pro studenty 70 % • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2000 (12 issues) DEM 440 • Podávání novinových zásilek povoleno ČP s.p. OZ VČ, č.j. PPI/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.*