

Jak si Evropa sama dělá problémy

Česká republika je členem Evropské unie a to je dobře. Dovedu si představit, že někdy v budoucnu budeme mít všichni evropské občanství a EU bude mocným partnerem mírumilovných a demokratických uskupení na naší planetě. Ale zatím tomu tak není. Evropa se neosvědčila při řešení velmi vážných problémů světa, jakými byly například národnostní války na Balkáně. A neosvědčuje se ani při potlačování byrokracie spojené s budováním společných struktur a společné politiky.

V poslední době se velmi nepříznivě vyvíjí například celá evropská legislativa zavádění geneticky modifikovaných plodin do zemědělství. Ta je založena na iracionálních předpokladech a vychází vstříc populismu a nátlaku některých nevládních organizací s globální působností. Již výchozí paradigma, uzákoněné v roce 1990, je postaveno na absurdní představě, že riziko používání GMO neplyne z vlastností plodin, ale ze způsobu jejich šlechtění. Transgenose (přenášení genů) se například odmítá, ale daleko nebezpečnější radiační a chemická mutagenese se bez omezení povoluje. Na rozdíl od přenosu genů metodami molekulární biologie, které zaručují, že k žádným náhodným a skrytým změnám v plodině nedojde, mění ze své podstaty mutační metody mnohé geny, při čemž se o podstatě těchto změn nic neví. Některé tyto změny však mohou působit vážné zdravotní potíže, například alergie.

Povolení experimentů s geneticky modifikovanými bramborami se změněným složením škrobu vyžaduje neuvěřitelné množství papírování, ale rostliny a zvířata vzniklá běžným křížením, lze uvolňovat do přírody bez omezení. Pro biodiverzitu a životní prostředí při tom uvolňování GMO není o nic nebezpečnější.

Evropská veřejnost je cíleně matena. Připomíná mi to čas od času se opakující „opičí procesy“ v USA, tedy odmítání darwinismu, výuka tzv. inteligentního plánu, kreacionismu a podobně. Výzkumy ukazují, že více než polovina Evropanů se domnívá, že snědením transgenní plodiny se změní jejich dědičnost. 44 % občanů EU si myslí, že jen transgenní plodiny mají geny. Ty původní, nemodifikované plodiny, „geny nemají“, a proto žádné škodlivé geny nemohou na člověka „přeskočit“ a změnit ho v monstrum.

Značit „vyrobeno z GMO“ je nutno i to, co z transgenní plodiny neobsahuje prakticky nic, například líh destilovaný z transgenních brambor.

Evropská legislativa také potraviny zdražuje. Je třeba nákladně zjišťovat i jen stopy transgenní sóji v potravinách, ačkoliv se jí už celosvětově zkonsumovalo okolo 750 milionů tun – a nikde se neprojevil žádný negativní efekt.

Vědci marně upozorňují na to, že na základě iracionální legislativy bude Evropa stále méně a méně konkurenceschopná. Stále více a více se budou v zemědělství používat chemické přípravky se všemi negativními dopady na životní prostředí. Česká veřejnost by se měla spoléhat na vlastní selský rozum a neměla by podléhat nepodloženým argumentům některých zájmových skupin.

Nedávno byla Biologickým centrem AV v Českých Budějovicích publikována Bílá kniha geneticky modifikovaných plodin, která na základě tvrdých mnohaletých pokusů dokazuje neškodnost geneticky upravených potravin.

Václav Pačes

ZAHRADA

**SLEDOVÁNÍ REAKCÍ POMOCÍ
SYNCHROTRONOVÉHO ZÁŘENÍ
JAKO JEDINEČNÝ ZDROJ PŘESNÝCH
ENERGETICKÝCH ÚDAJŮ
O REAKCÍCH V PLYNNÉ FÁZI**
JANA ROITHOVÁ^{a,b} a DETLEF SCHRÖDER^b

^a *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra organické a jaderné chemie, Hlavova 8, 128 43 Praha 2,* ^b *Ústav organické chemie a biochemie, v.v.i., Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6*
roithova@natur.cuni.cz

Došlo 17.7.08, přepracováno 13.2.09, přijato 12.3.09.

 Klíčová slova: acetamid, aréniové ionty, dikationty, fotoionizace, oxidy kovů, synchrotron

Obsah

1. Úvod
2. Princip VUV-fotoionizace a monitorování reakcí
3. Příklady experimentálních studií
 - 3.1. Isomerizační bariéry pro ionizovaný acetamid
 - 3.2. C–H aktivace v $\text{OV}(\text{OCH}_3)_3^+$
 - 3.3. Termální reaktivita dikationtů
4. Shrnutí a výhled

1. Úvod

Chemie volných iontů v plynné fázi představuje důležité pojitko mezi experimentem a teorií, protože experimenty jsou prováděny za dobře definovaných podmínek a studované systémy jsou většinou dostatečně malé pro použití přesných kvantově-chemických výpočtů¹. Energetické informace o volných iontech v plynné fázi (především ionizační energie) lze získat pomocí spektroskopických metod², které v současnosti dosahují přesnosti blízké se 0,1 meV, ale pouze za podmínky, že existuje vhodný neutrální prekurzor. Velmi přesná experimentální data (přesnost až ± 10 meV) lze také získat studiem elektronů vyražených fotonem z hmotově vybraných aniontů³ (metoda Photodetachment). Pro stanovení energetiky fragmentů lze použít různé metody fotoionizace⁴ nebo také kvantitativní analýzu prahového chování při disociaci indukované srážkou⁵, kde lze dosáhnout nejlepších přesností

okolo 50 meV. Mezi další velmi užitečné metody pro určení termodynamických charakteristik iontů v plynné fázi patří rovnovážná měření^{3,4}, termokinetické experimenty^{6,7} a Cooksova kinetická metoda⁸, kterou lze použít také na komplexy přechodných kovů⁹. Detailní přehled o těchto metodách lze získat v článku K. M. Ervina¹⁰.

Daleko komplikovanější situace nastává v okamžiku, kdy nás zajímá výška aktivační bariéry, která je experimentálními metodami určována obvykle s velkou chybou, nebo dokonce není možné získat žádné spolehlivé údaje. Právě v této oblasti dosáhly moderní metody kvantové chemie v posledních dvaceti letech obrovského pokroku^{11–13} a velké množství současných publikací v oboru chemie v plynné fázi spoléhá na klíčová data získaná z výpočtů. Nicméně stále je nezbytně nutné mít přístup také k experimentálním údajům pro reakční prahové energie a aktivační bariéry, abychom mohli testovat přesnost a spolehlivost hodnot předpověděných teoretickými metodami.

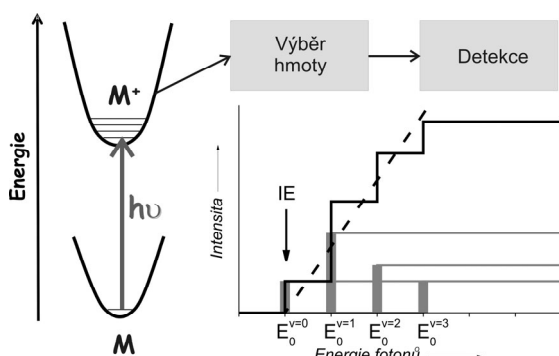
V souvislosti se současnou iniciativou pro postavení českého synchrotronu¹⁴ bychom zde rádi představili jednu z experimentálních metod, která umožňuje stanovovat vztažné termodynamické hodnoty pomocí kombinace fotoionizace fotonů z vakuové ultrafialové (VUV) oblasti spektra a sledování reaktivity.

2. Princip VUV-fotoionizace a monitorování reakcí

Fotoionizace neutrálního atomu na monokation se řídí Wannierovým zákonem, který říká, že pokud energie fotonů dosáhne prahové energie E_0 , výtěžek stoupne jako kroková funkce na σ_0^+ . Při ionizaci molekul se situace komplikuje přítomností mnoha vibračních stavů (obr. 1), přičemž ionizace do každého vibračního stavu se rovněž řídí Wannierovým zákonem. V praxi tedy nezískáváme krokovou závislost ionizačního výtěžku na energii fotonů, ale nárůst výtěžku je lineární. Ionizační energii ($IE = E_0$) určujeme většinou lineární extrapolací nárůstu výtěžku k nule (obr. 1).

Analýza a detekce iontů je založena na metodách hmotnostní spektrometrie. Ionty jsou vytvářeny v iontovém zdroji ionizací fotonů a následně vytaženy elektrostatickým polem do hmotnostního analyzátoru a detektoru. Nejčastěji používaným hmotnostním analyzátozem je kvadrupól. Zařazení hmotnostního analyzátoru poskytuje selektivitu pro požadované ionty a eliminuje možný vliv nečistot v iontovém zdroji. Umožňuje také jednoduché stanovování prahových energií pro fragmentace iontů pouhým přeladěním hmotnostního analyzátoru na hmotu fragmentu a sledováním tvorby fragmentu v závislosti na stále se zvyšující energii ionizujícího záření.

Studium bimolekulární reaktivity iontů s neutrálními atomy/molekulami v závislosti na jejich vnitřní energii



Obr. 1. Schéma nárůstu výtěžku monokationtů (černá plná čára) vznikajících z neutrálních molekulových prekursorů pomocí fotoionizace. Krokové nárůsty odpovídající ionizacím do jednotlivých vibračních stavů jsou naznačeny v šedé barvě a lineární extrapolace nárůstu výtěžku je ukázána pomocí přerušované čáry

vyžaduje prodloužení experimentálního zařízení o kolizní celu, kam lze v plynném stavu zavádět neutrální reaktant, a o další hmotnostní analyzátor, který slouží k analýze vzniklých produktů (Schéma 1). Pro lepší kontrolu energie iontu vytvořeného fotoionizací, detegujeme rovněž elektrony, které jsou vyraženy z neutrální molekuly při ionizaci. Pouze v případě, že elektrony mají nulovou kinetickou energii, lze uvažovat, že celá energie fotonu byla přenesena do vytvořeného iontu.

3. Příklady experimentálních studií

Následující příklady ukazují, jak lze pomocí synchrotronového záření ve VUV oblasti provést experimenty, které poskytují důležitá termodynamická data a také informace o mechanismech organických a organometalických reakcí. Rozhodující vlastnost, pro kterou je synchrotronové záření nenahraditelné, je možnost snadného a přesného ladění fotonové energie v poměrně širokém energetickém spektru.

3.1. Isomerizační bariéry pro ionizovaný acetamid

Z organické chemie je dobře známé, že u normálních karbonylových sloučenin je keto-forma značně stabilnější

než odpovídající enol-forma. Při ionizaci se u molekulových kationtů pořadí obrátí tak, že enol-forma radikál-kationtu představuje stabilnější tautomer. V případě acetamidu lze na příkladu chemické reaktivity ukázat, že radikál-kation vytvořený elektronovou ionizací (EI) se převážně vyskytuje v enol-formě (Schéma 2)¹⁵.

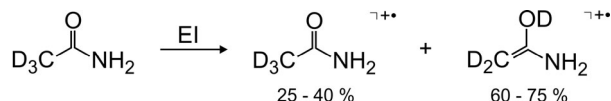


Schéma 2

Nevyhnutelně vyvstává otázka, s jak vysokou bariérou je spojený tento přesmyk. Vedle celé řady teoretických metod lze získat experimentální hodnotu výšky isomerizační bariéry pomocí sledování reaktivity za použití synchrotronového záření. Acetamid je ionizován ve zdroji pomocí VUV záření a vytvořený radikál-kation (buď v původní keto-formě nebo rovnou v enol-formě) je hmotově vybrán pomocí kvadrupólu. Vybraný kation reaguje s vhodným reakčním partnerem, který poskytuje selektivní reakce s oběma formami radikál-kationtu. Produkty jsou monitorovány v závislosti na energii ionizujících fotonů.

Zatímco všechny parametry (výběr hmoty reaktantu, srážková energie, tlak reaktantů, apod.) jsou konstantní, mění se pouze energie fotonů. Vhodným reaktantem pro rozlišení reaktivity obou isomerů radikál-kationtu je methylvinylether, který s keto-formou přenáší pouze náboj, kdežto s enol-formou dochází k přenosu protonu. Pro zamezení překryvu hmot je nutné použít deuterovaný acetamid (Schéma 3).

Výšku bariéry tedy snadno určíme v následující sekvenci: neutrální značený acetamid ionizujeme VUV synchrotronovým zářením, molekulární kation $\text{CD}_3\text{CONH}_2^{\cdot+}$ ($m/z = 62$) vybereme pomocí hmotnostního analyzátoru (kvadrupól Q1) a necháme reagovat s nezačleněným methylvinyletherem (MVE). Druhý hmotnostní analyzátor (Q2) naladíme na hmotu produktu specifického pro enol-formu reaktantu ($\text{CH}_3\text{OCHCH}_2\text{D}^{\cdot+}$, $m/z = 60$) a detegujeme produkt. Při experimentu měníme pouze energii ionizujícího záření a detegujeme také vyražené elektrony, abychom mohli normalizovat efektivitu ionizace (obr. 2). Experiment musíme provést také bez přítomnosti MVE (bez plynu), abychom mohli korigovat data o signál, který pochází ze samovolné ztráty deuteria z reaktantu $\text{CD}_3\text{CONH}_2^{\cdot+}$.

Opakováním experimentu a použitím dalších kombinací reaktantů (nezačleněný acetamid se značeným MVE,

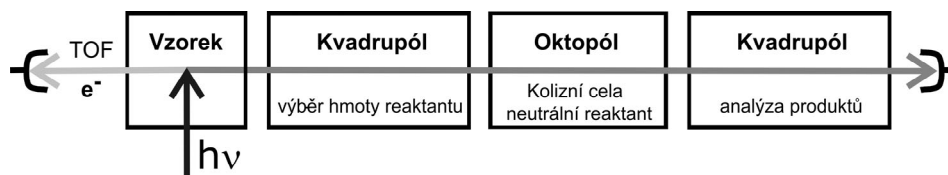


Schéma 1. Schéma geometrie experimentálního zařízení pro studium reaktivity iontů v závislosti na jejich vnitřní energii. TOF je „time of flight“ analyzátor kinetické energie vyražených elektronů

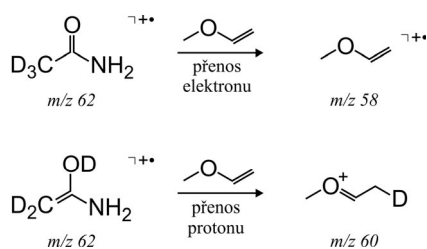


Schéma 3

H/D výměna enolformy s methanolem) jsme získali prahovou energii $AE = 10,5 \pm 0,1$ eV, což dohromady s ionizační energií acetamidu $IE = 9,69 \pm 0,02$ eV, vede k experimentální hodnotě výšky bariéry $E_a = 0,8 \pm 0,1$ eV pro unimolekulární přesmyk z keto- do enolformy ionizovaného acetamidu. Pro srovnání výška bariéry vypočtená pomocí G2-teorie dosahuje hodnoty $E_{a,\text{th}} = 1,16$ eV, což je sice v uspokojivém souladu s experimentem, ale poukazuje to na lehké přecenění spočítané bariéry.

3.2. Aktivace C–H vazby v $\text{OV}(\text{OCH}_3)_3^+$

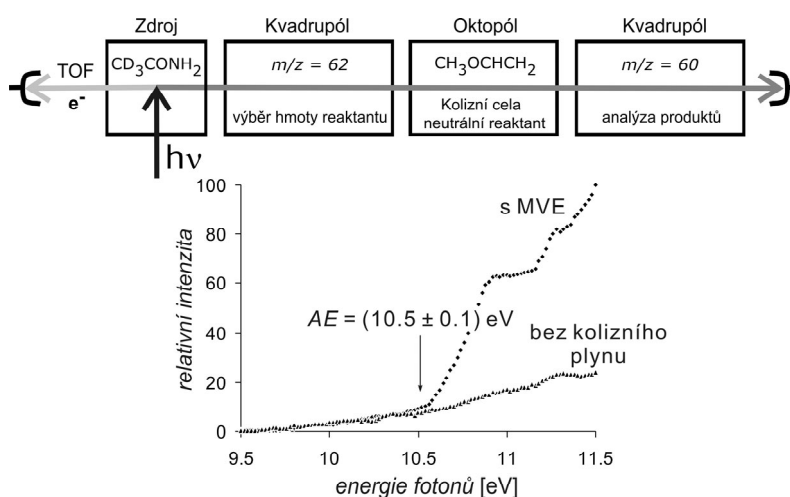
Zatímco teoretické výsledky z oblasti nepřechodných prvků jsou v současnosti rovnocenné s experimentálními daty, pokud nejsou dokonce přesnější, v oblasti přechodných kovů vykazují kvantově chemické metody stále ještě značné nedostatky. Pro vývoj účinných teoretických metod jsou naprosto nezbytná přesná experimentální data vazebných a aktivačních energií. Také v tomto ohledu mohou fotoionizační experimenty se synchrotronovým zářením poskytovat podstatné informace, které nelze zjistit jiným způsobem. Jako příklad uvádíme oxid trimethoxyvanadičný, $\text{OV}(\text{OCH}_3)_3$, který můžeme považovat za modelový systém pro aktivaci vazby C–H pomocí oxidu vysokovalenčního přechodného kovu.

Obr. 3 ukazuje výtěžek molekulárních iontů $\text{OV}(\text{OCH}_3)_3^+$ (obr. 3a) a primárního fragmentu $\text{HOV}(\text{OCH}_3)_2^+$ (obr. 3b), který vzniká po ztrátě formaldehydu a představuje tedy produkt oxidační reakce. Analýzou křivek iontových výtěžků získáme ionizační energii $9,56 \pm 0,04$ eV pro neutrální sloučeninu a prahovou hodnotu ($10,1 \pm 0,1$ eV pro disociační fotoionizaci na $\text{HOV}(\text{OCH}_3)_2^+$ (cit.¹⁷). Obě hodnoty představují vztažné hodnoty pro teoretické metody. První popisuje energii potřebnou pro odstranění jednoho elektronu z vanadičných sloučenin, což představuje analogii k vytvoření defektu v pevném stavu. Pomocí teorie lze ukázat, že druhá hodnota, prahová energie pro vznik $\text{HOV}(\text{OCH}_3)_2^+$, nepředstavuje pouze termochemickou hranici pro energetiku rozpadu, ale jedná se přímo o výšku bariéry pro aktivaci C–H vazby v $\text{OV}(\text{OCH}_3)_3^+$. Experimentálně určená výška bariéry $0,5 \pm 0,1$ eV byla zreprodukováná s dostatečnou přesností výpočty pomocí teorie hustotního funkcionálu B3LYP (0,82 eV). Ačkoliv v tomto případě i jiné funkcionály (BLYP, BP86) poskytují konzistentní energie, některé předchozí práce ukázaly, že u vyšších oxidů vanadu různé funkcionály poskytují velmi odlišné výsledky¹⁸ a právě proto jsou vztažné experimentální hodnoty důležité.

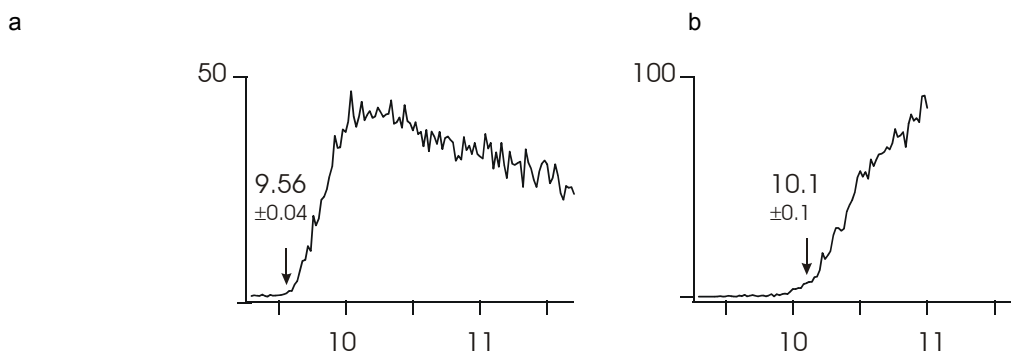
Užitečnost získaných dat byla demonstrována pozdější prací, kde kombinovaným přístupem experimentu a teorie bylo možné určit termochemické hodnoty pro $\text{OV}(\text{OCH}_3)_3$ od pevné fáze přes plynnou fázi až ke kvazi-termálním fragmentům VO^+ a VOH^+ (cit.¹⁹).

3.3. Termální reaktivita dikationtů

Předchozí příklady ukazovaly použití fotonů s relativně nízkou energií (9–12 eV), protože prahové hodnoty pro fotoionizaci a následnou fragmentaci molekulárních iontů většiny sloučenin spadají právě do této oblasti energií. Použití více energetických fotonů ukážeme na příkladu studia bimolekulární reaktivity středně velkých



Obr. 2. Schématický náčrt titrace reakce pomocí synchrotronového záření, viz text. Relativní intenzity iontů s $m/z = 60$ za a bez přítomnosti reakčního partnera methylvinyletheru (MVE) v oblasti energie ionizujících fotonů 9,5–11,5 eV



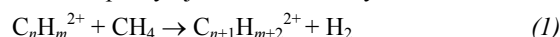
Obr. 3. Fotoionizační výtěžky (a) molekulárního iontu $\text{OV}(\text{OCH}_3)_3^+$ a (b) fragmentu $\text{HOV}(\text{OCH}_3)_2^+$ v závislosti na energii fotonů použitých pro ionizaci neutrálního plynu $\text{OV}(\text{OCH}_3)_3$ (cit.⁵)

uhlovodíkových dikationtů $\text{C}_m\text{H}_n^{2+}$ s neutrálními uhlovodíky. Tyto reakce představují možný mechanismus růstu uhlovodíků v mezihvězdném prostoru nebo planetárních atmosférách, např. v ionosféře Titanu^{20–24}.

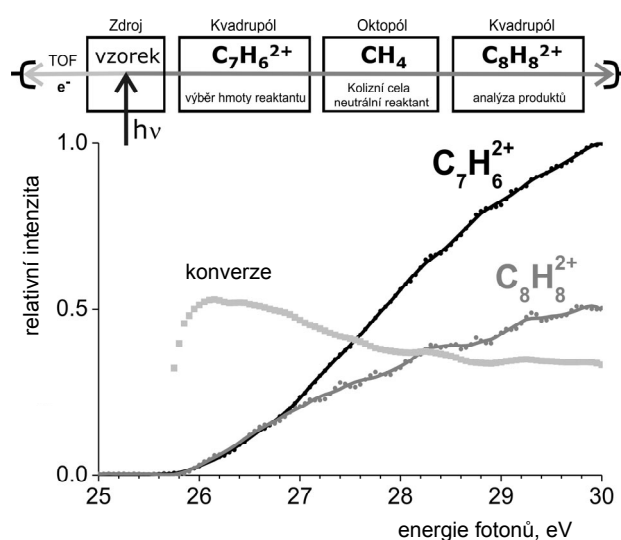
Speciální role synchrotronového záření ve výzkumu bimolekulárních reakcí násobně nabitých iontů spočívá v definování jejich vnitřní energie. Je dobře známo, že reaktivita iontů se s jejich zvyšující se vnitřní energií může značně lišit od jejich termální reaktivity. Ionty mohou vznikat ve vysoce vzbuzených vibračních stavech, nebo dokonce mohou být elektronicky excitovány. V téměř všech typech hmotnostních spektrometrů se standardně k „zchlazení“ iontů používají násobné srážky s nereaktivním plynem (obvykle vzácným plynem)²⁵. Při srážkách dochází k přerozdělení energie mezi studovanými ionty a atomy plynu, což vede ke snížení vnitřní energie iontů až na energii odpovídající teplotě prostředí (termalizace). Malé násobně nabitě ionty nesou vysokou potenciální energii, což z nich činí velmi reaktivní částice (superelektrofil), které ve skutečnosti dokonce velmi často reagují i se vzácnými plyny nemluvě o stopových nečistotách v nich obsažených. V násobných srážkách proto často nedosáhneme termalizace, ale studované ionty ztrácíme díky přenosu náboje nebo chemické reakci²⁶. Dokonce i v případě ionizace elektrosprejem, což je technika známá jako málo energetická ionizační metoda (tj. poskytuje ionty s malou vnitřní energií), představuje tvorba násobně nabitých iontů za dobře definovaných podmínek velký problém²⁷. V souhrnu lze říci, že termalizace iontů může představovat kritický bod ve výzkumu bimolekulárních reakcí násobně nabitých iontů. Jedinečné řešení nabízí synchrotronové záření, které umožňuje přesně definovat vnitřní energii iontů už při jejich tvorbě a tím jasně určit závislost mezi vnitřní energií dikationtů a jejich reaktivitou.

Atmosféra Titanu se skládá převážně z dusíku (98,4 %). Druhým nejzastoupenějším plynem je methan. Nedávno zjištěné složení atmosféry Titanu ukázalo vedle nižších uhlovodíků překvapivě vysoký výskyt uhlovodíků s šesti a více atomy uhlíku. Mechanismus jejich vzniku

nemůže být založen na reaktivitě neutrálních a jednou nabitých molekul, protože tyto částice za daných podmínek (extrémně nízká teplota a tlak) nereagují. Na druhou stranu, dvojnásobně nabitě střední uhlovodíky podstupují reakci s methanem (rovnice (1))^{23,24}, acetylenem^{20,21}, nebo benzenem²² a poskytují větší uhlovodíky.

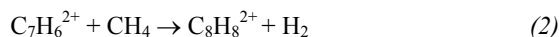


Možný mechanismus růstu uhlovodíků by tedy mohl zahrnovat tvorbu dvojnásobně nabitých iontů následovanou C–C spojením s methanem nebo jiným malým uhlovodíkem. Vzhledem k prostředí je důležité ukázat, že reakce probíhají pro základní stav dikationtů s malou vnitřní energií. Chlazení vytvořených iontů je obtížné (viz výše), proto je výhodnější tvořit ionty rovnou s definovanou vnitřní energií za pomoci ionizace fotonu. Obr. 4 ukazuje iontový výtěžek reaktantu $\text{C}_7\text{H}_6^{2+}$ v závislosti na energii



Obr. 4. Závislost iontového výtěžku $\text{C}_7\text{H}_6^{2+}$, produktu $\text{C}_8\text{H}_8^{2+}$ z reakce (2) a odpovídající konverze v závislosti na energii ionizujících fotonů

ionizujících fotonů a výtěžek produktu $C_8H_8^{2+}$ pocházejícího z reakce (2). Konverze reaktantu na produkt klesá se stoupající energií fotonů, což ukazuje, že reakce (2) je nejučinnější pro reaktanty v základním stavu s nízkou vnitřní energií.



4. Shrnutí a výhled

Představené příklady ukazují, že studie reaktivity za pomoci VUV synchrotronového záření mají velký potenciál pro výzkum důležitých témat chemie v plynné fázi, přičemž nezbytným předpokladem k provedení takových studií je přístup k synchrotronové fotonové lince s vhodnými charakteristikami fotonového svazku a vybavené vhodným koncovým zařízením ve formě multipólového hmotnostního spektrometru. Experimenty uvedené v této práci byly provedeny na aparatuře CERISES²⁸ a na synchrotronech SuperACO a SOLEIL ve Francii. Parametry a vlastnosti CERISES už nejsou pro současné MS/MS experimenty ideální a přístup k zahraničním synchrotronům je pouze omezený, proto by optimalizované koncové zařízení na možném českém synchrotronu¹⁴ představovalo obrovskou výhodu a perspektivu pro chemii v plynné fázi.

Tato práce byla podpořena Akademií věd České republiky (Z400550704) a Ministerstvem školství a tělovýchovy České republiky (MSM0021620857). JR děkuje za stipendium L'Oréal pro ženy ve vědě.

LITERATURA

- Zahradník R.: Acc. Chem. Res. 28, 306 (1995).
- Held A., Schlag E. W.: Acc. Chem. Res. 31, 467 (1998).
- Berkowitz J., Ellison G. B., Gutman D.: J. Phys. Chem. 98, 2744 (1994).
- Blanksby S. J., Ellison G. B.: Acc. Chem. Res. 36, 255 (2003).
- Armentrout P. B.: Top. Curr. Chem. 225, 233 (2003).
- Bouchoux G., Salpin J. Y., Leblanc D.: Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 153, 37 (1996).
- Brown J. R., Schwerdtfeger P., Schröder D., Schwarz H.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 13, 485 (2002).
- Wong P. S. H., Cooks R. G.: Acc. Chem. Res. 31, 379 (1998).
- Schröder D., Schwarz H.: J. Organomet. Chem. 504, 123 (1995).
- Ervin K. M.: Chem. Rev. 101, 391 (2001).
- Alcami M., Mo' O., Yañez M.: Mass Spectrom. Rev. 20, 195 (2001).
- Schwarz H.: Int. J. Mass Spectrom. 237, 75 (2004).
- Mercero J. M., Matxain J. M., Lopez X., York D. M., Largo A., Erikson L. A., Ugalde J. M.: Int. J. Mass Spectrom. 240, 37 (2005).
- <http://www.synchrotron.cz/>
- Mourgues P., Chamot-Rooke J., Nedev H., Audier, H.-E.: J. Mass Spectrom. 36, 102 (2001).
- Engeser M., Schröder D., Schwarz H.: Chem. Eur. J. 11, 5975 (2005).
- Schröder D., Loos J., Engeser M., Schwarz H., Jankowiak C., Berger R., Thissen R., Dutuit O., Döbler J., Sauer J.: Inorg. Chem. 43, 1976 (2004).
- Feyel S., Schwarz H., Schröder D., Daniel C., Hartl H., Döbler J., Sauer J., Santambrogio G., Wöste L., Asmis K.: ChemPhysChem 8, 1640 (2007).
- Schröder D., Engeser M., Schwarz H., Rosenthal E. C. E., Döbler J., Sauer J.: Inorg. Chem. 45, 6235 (2006).
- Roithová J., Schröder D.: J. Am. Chem. Soc. 128, 4208 (2006).
- Roithová J., Schröder D.: Chem. Eur. J. 13, 2893 (2007).
- Roithová J., Schröder D.: Phys. Chem. Chem. Phys. 9, 731 (2007).
- Ricketts C. L., Schröder D., Alcaraz C., Roithová J.: Chem. Eur. J. 14, 4779 (2008).
- Roithová J., Ricketts C. L., Schröder D.: Int. J. Mass Spectrom. 280, 32 (2009).
- Schröder D., Schwarz H., Clemmer D. E., Chen Y.-M., Armentrout P. B., Baranov V. I., Böhme D. K.: Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 161, 177 (1997).
- Roithová J., Schröder D., Gruene P., Weiske T., Schwarz H.: J. Phys. Chem., A 110, 2970 (2006).
- Stace A. J.: Phys. Chem. Chem. Phys. 3, 1935 (2001).
- Dutuit O., Alcaraz C., Gerlich D., Guyon P. M., Hepburn J. W., Métayer-Zeitoun C., Ozenne J. B., Schweizer M., Weng T.: Chem. Phys. 209, 177 (1996).

J. Roithová^{a,b} and D. Schröder^b (^aDepartment of Organic and Nuclear Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, ^bInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Reactive Monitoring with Synchrotron Radiation as a Unique Source of Accurate Benchmark Data for Gas-Phase Reactions**

The important role of experiments with vacuum ultraviolet (VUV) radiation from synchrotron sources for the determination of thermodynamic benchmarks for ions in the gas phase is briefly reviewed. Smoothly tunable VUV photons from a synchrotron are used to ionize neutral precursor molecules. Monitoring the ion yields as a function of the VUV photon wavelength permits an accurate determination of ionization energies and fragmentation thresholds. The ions formed on photoionization above the ionization threshold bear a precisely determined internal energy, which can be used for investigation of their reactivity in bimolecular collision processes as a function of their internal energy content. This technique is referred to as “reactive monitoring”, which, among others, allows the determination of energy barriers in chemical reactions.

Enterobacter sakazakii* ALIAS *Cronobacter sakazakii* – NOVÁ HROZBA?*KATEŘINA DEMNEROVÁ
a JARMILA PAZLAROVÁ***Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
jarmila.pazlarova@vscht.cz*

Došlo 5.2.09, přijato 2.4.09.

Klíčová slova: *Enterobacter sakazakii*, *Cronobacter saka-
zakii*, patogen, sušená mléčná výživa, D-hodnota**Obsah**

1. Úvod
2. Historie
3. Taxonomie
4. Charakteristika růstu
5. Biochemická charakteristika
6. Výskyt *Enterobacter sakazakii*
7. Odolnost k vysychání
8. Měření tepelné odolnosti
9. Patogenita
10. Závěr

1. Úvod

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter sakazakii*) je gramnegativní tyčinka náležící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o oportunního patogena, který napadá převážně novorozence a imunitně oslabené jedince a je spojen se závažným onemocněním nekrotizující enterokolitidy, meningitidy a otravy s výjimečně vysokou mírou úmrtnosti až 80 %. Ve většině případů byla nákaza *E. sakazakii* spojená s konzumací mléčné kojenecké výživy.

Sušená mléčná strava není sterilní produkt a vysoká odolnost *E. sakazakii* k vysoušení zaručuje jeho kompetitivní výhodu¹ oproti jiným bakteriálním druhům v tomto produktu. Nejběžnější cestou destrukce organismů v potravinách je tepelný záhřev, a proto poznatky o tepelné odolnosti organismu se tak stávají nejdůležitějšími parametry pro zajištění nezávadných potravin a snížení rizika nákazy.

Nezbytnými poznatky pro epidemiologické studie je správná identifikace a odlišení *Enterobacter sakazakii* od blízce příbuzných druhů čeledi *Enterobacteriaceae* a také přesné určení patogenu způsobující onemocnění. Ukázalo se, že standardní biochemické soupravy pro rozlišení *Ente-*

robacter sakazakii mohou poskytovat falešně pozitivní a stejně tak falešně negativní výsledky². Genetické metody tedy slouží jako mocný nástroj pro správnou identifikaci organismu a zjištění vzájemných evolučních vztahů. Současné metody sekvenování DNA jsou vysoce účinné, takže jsou stanoveny kompletní nukleotidové sekvence genomů mnoha bakterií. Pro určení druhové příslušnosti však postačují sekvence genu pro malou ribosomální podjednotku 16S rRNA.

2. Historie

Již ve dvacátých letech bylo zaznamenáno, že žlutě zbarvená koliformní bakterie způsobila septikémii u novorozence. Až mnohem později, v roce 1961 (cit.³) byl popsán další případ, kdy „žlutě zbarvený *Enterobacter cloacae*“ způsobil novorozeneckou meningitidu. Brenner a spol.⁴ v roce 1977 poprvé užili nynějšího názvu bakterie *Enterobacter sakazakii* pojmenované podle slavného japonského mikrobiologa Riichiho Sakazakiho.

Do dnešního dne bylo popsáno několik případů z jednotek intenzivní péče pro kojence, kdy *Enterobacter sakazakii* způsobil závažná onemocnění typu otravy (seps), zánětu mozkových blan (meningitida) nebo nekrotizujícího zánětu trávicího traktu (enterokolitida). Ačkoliv v mnoha případech zůstal zdroj infekce neznámý, ve stoupajícím počtu hlášených případů se zjistila souvislost se sušenou kojeneckou stravou.

V roce 2002 ICMSF⁵ (International Commission on Microbiological Specification for Foods – Mezinárodní komise pro mikrobiologickou specifikaci potravin) označila *Enterobacter sakazakii* jako vážně nebezpečný organismus pro vyhrazenou část populace, ohrožující její život a způsobující dlouhodobé závažné následky. *Enterobacter sakazakii* se tak zařadil mezi nebezpečné potravinové patogeny vedle *Listeria monocytogenes* nebo *Clostridium botulinum*. V listopadu 2005 vydala Evropská Komise Nařízení č. 2073/2005 a v tomto znění pak další Nařízení 1441/2007 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, ze kterého vyplývá nutnost sledovat přítomnosti *Enterobacter sakazakii* v sušené dětské výživě a podobných sušených přípravcích určených kojencům do stáří šesti měsíců⁵.

3. Taxonomie

Až do roku 1980 se věřilo, že se jedná o žlutě zbarveného *Enterobacter cloacae*, teprve Farmer a spol.⁶ dokázali základní rozdíly a definovali nový druh – *Enterobacter sakazakii*. Reklasifikace byla uskutečněna na základě DNA-DNA hybridizace, produkce žlutého pigmentu

a biochemických reakcí⁶. Při srovnání *E. sakazakii* se zástupci rodů *Enterobacter* a *Citrobacter* na základě DNA-DNA hybridizace se ukázala 50% podobnost s oběma rody. Podle fenotypových rysů bližších *E. cloacae* byl *E. sakazakii* přiřazen do rodu *Enterobacter*, čeledi *Enterobacteriaceae*⁷. V původní studii byly kmeny rozděleny podle biochemických vlastností do 15 bioskupin.

Do dnešní doby neexistuje jednotné mínění o zařazení *E. sakazakii* do rodu *Enterobacter*. Zatímco analýza plné délky genu pro 16S rRNA poukázala na dva fylogeneticky odlišné rody v rámci druhu *Enterobacter sakazakii*⁸, tak genotypizace podle 16S rRNA společně s analýzou genu pro hsp60 ukázala, že kmeny *E. sakazakii* tvoří minimálně čtyři genetické skupiny s většinou kmenů náležících do první skupiny.

Tyto zmatky v taxonomii se staly výzvou pro Carol Iversen a spol.⁹, kteří provedli analýzu 210 kmenů *E. sakazakii*. Na základě typizace podle f-AFLP, ribotypizace, analýzy genu pro malou ribosomální podjednotku 16S rRNA, jejíž celá sekvence je tvořena více než 1300 páry bází, a DNA-DNA hybridizace navrhli reklasifikaci tohoto organismu do rodu *Cronobacter*, který by obsahoval pět různých skupin a řadil by se mezi *Enterobacteriaceae*. Název rodu vychází z řecké mytologie, ve které se praví, že bůh Cronos spolknul své děti krátce po jejich narození, což symbolizuje vysokou úmrtnost novorozenců způsobenou tímto organismem. Důvod, proč organismy zařazené do druhů *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter mytjesii* a *Cronobacter dublinensis*, jsou v tomto sdělení označovány jako *Enterobacter sakazakii*, je ten, že současná platná potravinářská legislativa vycházející z nařízení Evropské Komise používá dosud tento název.

4. Charakteristika růstu

Enterobacter sakazakii je gram-negativní rovná tyčinka 0,5–1,5 μm široká, pohyblivá, díky peritrichálním bičíkům. Je to neselektivní fakultativní anaerob, který na neselektivních půdách tvoří žluté nebo bezbarvé kolonie. Čerstvě izolovaná bakterie tvoří kolonie dvou různých morfologií¹⁰. Jeden typ se popisuje buď jako suchý nebo mukoidní, vroubkovaný a po dotknutí očkovací jehlou sklouzávajícím zpátky na agar. Tato vlastnost se přisuzuje heteropolysacharidovému pouzdru, které umožňuje snad-

nější přichycení k povrchu a tvorbu biofilmu. Druhý morfologický typ je popisován jako hladký a snadno odstranitelný pomocí očkovací jehly. Při růstu v bujónu má tendenci sedimentovat. Bakterie vykazuje značnou odolnost ke kyselému pH a extrémně vysokou odolnost k vysoušení a tepelnému záhřevu.

Enterobacter sakazakii roste v širokém rozmezí teplot, přičemž minimální teplota růstu je 36 °C, maximální 47,6 °C a optimální růstová teplota činí 39,4 °C (cit.¹¹). Mnoho výzkumných pracovišť se zabývá růstovým profilem *E. sakazakii* v mléčné výživě a zaznamenaly doby zdvojení bakterie při různých teplotách, jak popisuje tabulka I.

5. Biochemická charakteristika

Produkce žlutého pigmentu spolu s α -glukosidasovou aktivitou jsou nejdůležitějšími faktory odlišujícími *Enterobacter sakazakii* od dalších kmenů rodu *Enterobacter*. Organismus redukuje nitrát, využívá jako zdroj uhlíku citrát, hydrolyzuje eskulin a arginin, dekarboxyluje L-ornithin. Tvoří kyseliny z D-glukosy, D-sukrosy, D-rafinosy, D-melibiosy, D-cellobiosy, D-mannitolu, D-mannosy, L-rhamnosy, L-arabinosy, D-trehalosu, galakturonátu a D-maltosu. Později se ovšem prokázalo, že produkce žlutého pigmentu je nestabilní se zvyšujícím se počtem pasážování a nemůže proto sloužit k věrohodné identifikaci⁶. Vyšší produkce pigmentu se projevuje při teplotách kultivace nižších než 36 °C, s optimem při 25 °C (cit.¹⁰). Za hlavní rozdíl mezi *E. sakazakii* a dalšími *Enterobacteriaceae* se dříve považovala jeho neschopnost fermentovat D-sorbitol a schopnost produkovat extracelulární deoxyribonukleasu⁶. *Enterobacter sakazakii* dává pozitivní reakci na produkci acetoinu (Voges-Proskauerova reakce). Tvorba indolu je závislá na příslušnosti k biotypu (viz nové druhy rodu *Cronobacter*).

První sekvenovaný genom *Enterobacter sakazakii* byl zveřejněn v druhé polovině roku 2007. Jedná se o sbírkový kmen *Enterobacter sakazakii* ATCC BAA-894, který pocházel z kojenecké výživy, jakou bylo krmení hospitalizované dítě, u něhož propukla infekce. Jeho genom je tvořen cirkulární DNA délkou 4,4 Mbp, kódující 4277 proteinů a ze dvou plazmidů. Obsah guaninu a cytosinu (G+C) byl stanoven pro rod *Cronobacter* 56,7 % (cit.¹²).

6. Výskyt *Enterobacter sakazakii*

6.1. Zdroje z potravin a z prostředí

Vzhledem k infekcím, které *E. sakazakii* způsobuje u novorozenců, se jeho výskyt často spojuje s kontaminací sušené mléčné výživy. Vyskytuje se však v různém prostředí, jako je voda, půda a zelenina, které jsou předpokládaným hlavním zdrojem kontaminace¹³. Jako sekundární zdroj přenosu mohou sloužit mouchy nebo hlodavci¹⁶.

Tabulka I

Generační doba (h) *E. sakazakii* při různých teplotách inkubace

	Generační doba [h] při teplotě:					Lit.
	6 °C	10 °C	21 °C	23 °C	37 °C	
	13,70		1,70		0,37	31
		5,52		0,65		20

Hamilton a spol.¹⁴ izoloval *E. sakazakii* ze střeva larvy *Stomoxys calcitrans*, která se živí krví hospodářských zvířat i lidí. Organismus byl izolován z několika zdrojů zahrnující základní potraviny jako sýr, chléb, tofu, koření a bylinky, rýže a maso. Studie také ukázaly, že *E. sakazakii* se vyskytuje v suchém a prašném prostředí továren na výrobu čokolády, zpracování obilovin, výrobu těstovin, zpracování a balení koření a také v domácím prostředí¹⁵. Jeho hlavní rezervoár se ovšem stále nepodařilo určit. Miriam Friedemann¹⁶ v roce 2007 shromáždila data o výskytu *E. sakazakii* v potravinách a nápojích, které nejsou v kategorii dětské výživy nebo sušeného mléka. Organismus byl nalezen v mnoha typech cereálních a luštěninových potravin, dále v prášku pro přípravu ledového čaje a v několika typech koření. Rovněž byl *E. sakazakii* nalezen v krájených čerstvých ovocných a zeleninových salátech, v různých typech ořechů a bramborech. Pozitivně testované masné výrobky zahrnovaly např. párky, mleté maso, kůže drůbeže čerstvě po porážce a želatinu. Mléčné výrobky byly pozitivní v případě testování syrového mléka a měkkých sýrů. V roce 2007 publikovali japoňští autoři¹⁷ H. Asakura a spol. studii, kde po mikrobiologických rozbořech 2000 typů potravin izolovali 30 kmenů, které přiřadili do *E. sakazakii*. Mezi pozitivně testovanými potravinami byly tři typy sušené dětské mléčné výživy, ale také rýže, mražený chléb, pšeničná mouka, práškový agar, různé výrobky ze soji, pohanková mouka, česnek a další potraviny, jejichž společným znakem byl rostlinný původ.

6.2. Klinické zdroje

Klinické izoláty *Enterobacter sakazakii* z infikovaných pacientů často pocházely z centrální nervové soustavy, krve, slin, krku, nosu, stolice, střeva, kůže, moči, očí a uší¹¹.

Bohužel kontaminace nemocničního prostředí a nedostatečné hygienické zabezpečení přípravy dětské mléčné stravy zůstává permanentním problémem. V mnoha případech bylo společným jmenovatelem onemocnění kontaminované nádoby pro přípravu mléčné výživy jako lžice, míchadlo a také žínka na umývání nádobí¹⁰. Nebezpečí tkví zejména ve schopnosti bakterie tvořit biofilm, tím se stává mnohem odolnější vůči čistícím prostředkům i zvýšené teplotě mytí a může tak přežívat na nemocničním nádobí po dlouhou dobu.

6.3. Sušená mléčná výživa

Infekce způsobená *Enterobacter sakazakii* byla poprvé spojena s kojeneckou mléčnou výživou v roce 1983 (cit.¹⁸). V bývalém Československu byly ve stejných letech izolovány čtyři kmeny *E. sakazakii* ze sušeného mléka a dva ze sušené kojenecké výživy¹⁹. V jednom z nejvýznamnějších průzkumů mléčné výživy²³ se zjistilo, že 52,2 % ze 141 sušených mléčných výživ ze 35 zemí světa bylo pozitivních na kmeny rodu *Enterobacteriaceae*, z toho 14 % obsahovalo *E. sakazakii*, který se umístil na třetím místě nejčastěji izolované bakterie po *E. agglomerans*

a *E. cloacae*. Při testování²⁰ 120 plechovek mléčné výživy od pěti různých výrobců bylo zjištěno, že 6,7 % z nich bylo kontaminováno, množství *E. sakazakii* buněk však často představovalo pouze 0,36 KTJ/100 g. Při takto nízké koncentraci kontaminace (méně než 1 buňka/100 g) je nepravděpodobné, že by mléčná výživa byla příčinou infekce. Ovšem při nedbalém zacházení a nedostatečných hygienických podmínkách se může riziko požití buněk *E. sakazakii* zvýšit až 30 000× (FAO-WHO, 2004, cit.²¹). Prokazatelnou spojitost mezi nákazou *E. sakazakii* a sušenou mléčnou stravou v roce 2002 oznámilo americké Centrum pro kontrolu nemocí²² (CDC – Center for Disease Control).

6.4. Výroba sušené mléčné výživy

Sušená mléčná výživa není sterilní produkt. První sušená mléčná výživa se na trhu objevila téměř před 100 lety jako náhrada mateřského mléka. Aby dosahovala stejné nutriční hodnoty, jakou má lidské mateřské mléko, je zapotřebí kravské mléko upravit snížením obsahu minerálů a proteinů, zvýšením podílu Ca/P, zvýšením množství sacharidů a proteinů ze syrovátky. Nakonec se přidávají vitamíny a upravuje se tukové složení²³.

Sušená mléčná výživa může být vyráběna dvěma způsoby, „suchou“ a „vlhkou“ cestou, které se často vzájemně kombinují podle rozpustnosti přidávaných složek. Rozpustné látky se přidávají do tekuté fáze, zatímco méně rozpustné až po ošetření směsi horkým vzduchem. Při výrobě suchou cestou se nízkotučné mléko pasteruje a odpařuje, poté se přimíchají další přísady, jako např.: esenciální mastné kyseliny, syrovátka, vitamíny, emulzifikátory a stabilizátory. Celá tato směs se zahřívá na 110 °C po dobu 60 s a pak se sprejově suší. Při této metodě hrozí vyšší nebezpečí bakteriální kontaminace a další nevýhodou je nestejnoměrné promíchání všech přísad. Při vlhké výrobě se obě složky (nízkotučné mléko a přísady) ošetří při 80–82 °C po dobu 20 s. Poté se směs zahřívá na 107 až 110 °C po dobu 60 s a tato tekutá hmota se koncentruje užitím odparky s tenkým filmem. Koncentrát se opět zahřívá na 80 °C a konečně sprejově suší²³. Kritická místa během výroby nejnáchylnější k mikrobiální kontaminaci se nachází mezi sprejovým sušením, balením produktu a dodáváním látek v pevném stavu. Předpokládá se ovšem, že na kontaminaci konečného produktu má větší vliv prostředí továrny než samotný výrobní proces.

Na základě stanoviska Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) bylo dle Nařízení komise č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny začleněn pro kojeneckou počáteční a pokračovací výživu požadavek nepřítomnosti bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v 10 g produktu. Zjištění přítomnosti *E. sakazakii* vyžaduje cílené vyšetření 10 g kojenecké výživy ze 30 vzorků. Rovněž je tímto nařízením uloženo výrobcům sušené kojenecké výživy provádět kontroly výrobního prostředí zaměřené na zjišťování bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*⁵.

Pro detekci *E. sakazakii* ve vzorcích sušené mléčné výživy byla Mezinárodní organizací pro normalizaci (ISO

– International Standards Organisation) přijata kultivační metoda (ČSN P ISO/TS 22964:2006) založená na selektivním nabohacování mikrobiální kultury²⁴.

7. Odolnost k vysychání

Sušená mléčná výživa má velice nízkou aktivitu vody (a_w) kolem 0,2. Přežití mikroorganismů v takto nepříznivých podmínkách vyžaduje vysokou odolnost k osmotickému stresu. *Enterobacter sakazakii* má neobvyklou schopnost přežít i ve velmi suchých podmínkách (v mléčném prášku až 12 měsíců)²⁵. Musí proto existovat jistý mechanismus, jak se *E. sakazakii* vyrovnává s osmotickým stresem. Iversen a Forsythe¹³ se domnívají, že zodpovědnost za přežívání v takto nehostinných podmínkách nese pouzdro, jak je popsáno dále.

Bakterie se proti zvyšování osmolarity brání rychlou akumulací iontů, zejména K^+ , následně hromaděním rozpuštěných látek, jako je prolin, glycin, betain a trehalosa. Sloučeniny jako trehalosa, neredukující disacharid glukosy, může nahradit schránku tvořenou vodou kolem makromolekul, která se ztrácí během sprejového sušení a chrání tak buňky před zničením²⁸. Předpokládá se, že trehalosa hraje roli zejména ve stabilizaci fosfolipidové membrány a proteinů.

Breeuwer a spol.¹ se zabýval vlivem suchého prostředí na *Enterobacter sakazakii*. V suchých podmínkách se

zvýší koncentrace trehalosy u *Enterobacter sakazakii* víc než pětikrát, zatímco tento jev není pozorován v stacionární fázi buněk *E. coli* za obdobných podmínek. Navíc, přidání trehalosy do kultivačního média zlepšuje schopnost *E. sakazakii* přežít za podmínek sucha. Objasní také genetický princip odolnosti *E. sakazakii* vůči suchým podmínkám. Ukázalo se, že v ochraně bakterie hraje roli sedm genů z „heat shock“ regulonu, čtyři z regulonu cyklického AMP receptoru a šest genů, jež jsou odpovědné za syntézu trehalosy a správnou funkci buněčné membrány, jako je biosyntéza lipidů a polysacharidů¹.

Díky přežívání buněk při zvýšené teplotě a schopnosti buněk růst při více než 47 °C, *E. sakazakii* je v kompetitivní výhodě oproti jiným druhům čeledi *Enterobacteriaceae*. *E. sakazakii* se tak stává dominantním v teplém a suchém prostředí, např. v blízkosti sušících zařízení ve výrobnách sušené mléčné výživy. Jeho výskyt v tomto prostředí zvyšuje riziko post-procesní kontaminace³¹.

8. Měření tepelné odolnosti

Možnost života každého mikroorganismu je ohraničena třemi základními teplotami a to T_{min} , která udává minimální teplotu při které organismus ještě roste, dále je to T_{opt} , která udává teplotu, při které je růst optimální a T_{max} pak označuje nejvyšší teplotu, při které organismus je ještě

Tabulka II

Porovnání D-hodnot^e získaných měření v různých laboratořích

Kmeny <i>E. sakazakii</i>	Médium ^{a,b,c}	D ₅₆	D ₅₈	D ₆₀	z-hodnota ^f	Lit.
Klinické izoláty	SMV	10,91 ± 1,52	5,45 ± 0,46	3,06 ± 0,12	5,6	(Nazarowec-White and Farber, 1997a)
Potravinové izoláty	SMV	9,75 ± 0,47	3,44 ± 0,35	2,15 ± 0,07		
<i>E. sakazakii</i> 1387-2	PBS	2,4	0,48		3,1	
<i>E. sakazakii</i> 1387-2	SMV		0,50			
<i>E. sakazakii</i> 16	PBS	1,1	0,40		3,6	(Breeuwer a spol., 2003)
<i>E. sakazakii</i> 1360	PBS		0,34			
<i>E. sakazakii</i> 145	PBS		0,27			
<i>E. sakazakii</i> NCTC 11467	TSB	2,7 ± 0,08	1,3 ± 0,28	0,9 ± 0,17	5,8	
S pouzdrém ^d	TSB	1,2 ± 0,01	1,7 ± 0,39	0,2 ± 0,06	5,7	(Iversen and Forsythe, 2004b)
<i>E. sakazakii</i> NCTC 11467	SMV	5,1 ± 0,27	2,6 ± 0,48	1,1 ± 0,11		
S pouzdrém ^d	SMV	3,9 ± 0,06	3,8 ± 1,95	1,8 ± 0,82		
<i>E. sakazakii</i> ATCC 51329			0,51		5,6	(Edelson-Mammel and Buchanan, 2004)
Klinický izolát			9,87			

^a SMV – rozpuštěná sušená mléčná výživa, ^b PBS – fosfátový pufr, ^c TSB – tryptónový sójový bujón, ^d kmen *Enterobacter sakazakii* s pouzdrém, ^e tepelná odolnost bakterií se vyjadřuje jako čas nezbytný k usmrcení 90 % populace při určité teplotě a v daném mediu. Číselné vyjádření tohoto jevu se nazývá D-hodnota (decimal reduction time) a udává se v minutách; ^f z-hodnota je změna teploty, která vyvolá desetinásobnou změnu D

schopen růstu. Pro *E. sakazakii* je T_{\max} 47,6 °C, což znamená, že uchovávání kultur při vyšších teplotách vede k jeho devitalizaci.

Teplná odolnost bakterií se vyjadřuje jako čas nezbytný k usmrcení 90 % populace při určité teplotě a v daném médiu. Číselné vyjádření tohoto jevu se nazývá D-hodnota (decimal reduction time) a udává se v minutách. Testovaná teplota je uvedena jako dolní index, např. D_{60} udává čas nutný pro snížení množství bakterií o jeden řád při 60 °C. Delší čas při dané teplotě znamená vyšší termální rezistenci. Se zvýšením teploty D-hodnota klesá. Tato závislost je exponenciální, neboť při vynesení koncentrace buněk v závislosti na čase v semilogaritmickém uspořádání získáme přímku. Z toho lze odvodit další významný parametr tepelného působení: z-hodnota je změna teploty, která vyvolá desetinásobnou změnu D. Tabulka II udává tyto hodnoty pro různé kmeny *E. sakazakii*.

Různorodost výsledků D-hodnot lze vysvětlit širokým rozmezím tepelné odolnosti v rámci druhu *Enterobacter sakazakii*. Srovnání termální rezistence u 12 kmenů *E. sakazakii* potvrdilo, že tato vlastnost je u různých kmenů vysoce variabilní. Vzhledem k této variabilitě by bylo možné rozdělit *E. sakazakii* na dvě skupiny podle dvou odlišných fenotypů²⁶ a toto rozdělení by vysvětlilo rozdíly v tepelné odolnosti u různých kmenů *E. sakazakii*. Dále při pátrání po tomto fenoménu²⁷ byl identifikován protein, vyskytující se pouze v tepelně-tolerantních kmenech. Tento protein byl sekvenován a označen jako homologní s proteinem *Methylobacillus flagellatus*, což je methylo- trofni organismus, který dokáže přežít vysoké teploty a nenáleží do rodiny *Enterobacteriaceae*.

Při hledání genetické charakterizace termální tolerance¹⁷ byly izoláty *E. sakazakii* rozděleny do tří skupin: na rezistentní, středně citlivé a citlivé. Po 90 minutách záhřevu při 60 °C rezistentní kmeny klesly z původních 10^8 na 10^4 , zatímco u citlivých kmenů se po inkubaci na miskách neobjevil žádný nárůst. Analýza genové exprese genů pro „heat-shock“ protein *groEL*, histone-like-proteinu *hnsB* a translačního iniciačního faktoru *infB* ukázala, že míra exprese *groEL* a *hnsB* nebyla specifická, zatímco exprese *infB* byla nápadně zvýšena u tepelně odolných kmenů. Gen *infB* by tak mohl sloužit jako cílová sekvence pro rozlišení tepelně odolných a tepelně citlivých kmenů *E. sakazakii*.

9. Patogenita

Druhy rodu *Enterobacter* způsobují až 50 % všech nosokomiálních infekcí, nejčastěji u imuno-deficientních jedinců nebo starších pacientů. Mimo *E. sakazakii* jsou dalšími častými druhy rodu *Enterobacter* způsobující infekční onemocnění např.: *E. meningitis*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. hormechele* a *E. gergovial*.

Nemoci způsobené *E. sakazakii* u dospělých jedinců zahrnují rozsáhlé spektrum příznaků, od zánětu spojivek, zánětu žlučového a močových cest přes záněty v ránách až po zápal plic. Do současnosti bylo evidováno devět případů infekce *E. sakazakii* u dospělých, přičemž se vždy jed-

nalo o slabé, imuno-deficientní jedince nebo starší občany¹¹. Riziková skupina novorozenců jsou předčasně narození jedinci s nízkou porodní váhou a potlačenou imunitou ve věku od tří dnů do čtyř let¹⁴. Navíc žaludek novorozenců, zejména předčasně narozených, nemá tak kyselé pH jako žaludek dospělých, a to napomáhá přežití buněk *Enterobacter sakazakii*²¹.

Novorozenecká onemocnění způsobená *E. sakazakii* se vyskytují vzácně, ale mají závažný a rychlý průběh s vysokým poměrem úmrtnosti. Zahrnují otravu krve (sepsy), zánět mozkových blan (meningitida) a nekrotizující enterokolitidu¹⁴. Mezi lety 1958–2003 bylo zaznamenáno 76 případů nákazy *E. sakazakii* u novorozenců, z toho 19 jedinců nepřežilo.

Zánět mozkových blan nebo-li meningitida u novorozenců může být způsobena několika druhy bakteriálních patogenů, včetně *Enterobacter cloacae*, fylogeneticky velmi blízkého *E. sakazakii*. Onemocnění způsobená *E. sakazakii* se vyznačují velmi vysokým poměrem úmrtnosti¹⁴ 40–80 % a až v 90 % vedoucích k mozkovému abscesu a následně retardaci. Nekrotizující enterokolitida se vyskytuje až 10× častěji u dětí krmených mléčnou výživou oproti těm krmených mateřským mlékem.

Některé kmeny *Enterobacter sakazakii* produkují extracelulární heteropolysacharidové pouzdro, které bakteriím napomáhá k přilnutí k povrchu a tvorbě biofilmu²⁸. Předpokládá se, že ochranné pouzdro také hraje důležitou roli v ochraně proti vysychání, protože polysacharid je vysoce hydratovaný díky inkorporaci značného množství vody²⁹. Analýzou monosacharidů tvořících extracelulární polysacharid byl zjištěn obsah glukosy, galaktosy, fukosy a glukurové kyseliny v poměru 1:1:1:0,8 a stopy mannosy.

Ačkoliv neexistují žádné epidemiologické údaje o hodnotě infekční dávky, Iversen a Forsythe¹³ předpokládali první aproximaci 1000 KTJ (kolonie tvořící jednotky), což je dávka stanovená pro *E. coli*, *Listeria monocytogenes* nebo *Neisseria meningitidis*. Infekční dávka se může lišit podle minulosti organismu, zdravotního stavu hostitelského organismu a typu potravin. Je ovšem velmi nepravděpodobné, že by infekci způsobil nízký počet organismů v sušené mléčné výživě (méně než 0,36 *E. sakazakii* buněk/100 g), z čehož vyplývá, že k nákaze dochází kvůli nedostatečným hygienickým podmínkám přípravy stravy³⁰. Pokud budeme brát v úvahu, že sušená mléčná výživa je kontaminovaná jedinou buňkou, pak podle výpočtu růstové rychlosti by bylo zapotřebí 13 h kultivace při pokojové teplotě, aby bylo dosaženo 1000 KTJ.

10. Závěr

V lednu 2006 experti FAO a WHO³¹ znovu zdůraznili nutnost preventivní strategie pro omezení infekcí *E. sakazakii* z kontaminovaných sušených přípravků pro výživu kojenců. Hlavním úkolem je nutnost vzdělávání na všech úrovních k zajištění bezpečného nakládání, skladování a používání sušené mléčné výživy (powdered infant formula, PIF) včetně omezení zdravotních rizik vyvolaných

její nevhodnou přípravou a používáním. Cílovými osobami jsou pracovníci ve zdravotnictví, rodiče a další poskytovatelé péče jak v nemocnicích, tak ve veřejnosti, neboť infekce vyvolané *E. sakazakii* se vyskytují jak v nemocnicích, tak v domácím prostředí.

Kromě toho byla zdůrazněna nutnost vybudování dohledu a sítě pro rychlou odpověď, která by usnadnila přenos informací mezi klinickými a laboratorními pracovníky na jedné straně a pracovníky orgánů veřejného zdraví a hygieny na straně druhé, s cílem rychlé diagnostiky a rozpoznání onemocnění způsobeného *E. sakazakii* a nalezení zdrojů kontaminace.

Tato práce byla podpořena z prostředků Výzkumných záměrů MŠMT MSM 6046137305 a Národního programu výzkumu II 2B06048.

LITERATURA

- Breeuwer P., Lardeau A., Peterz M., Joosten H. M.: J. Appl. Microbiol. 95, 967 (2003).
- Iversen C., Waddington M., On S. L. W., Forsythe S.: J. Clin. Microbiol. 42, 5368 (2004).
- Urmeney A. M. C., Franklin A. W.: Lancet I, 313 (1961).
- Brenner D. J., Farmer J. J., Hickman F. W., Asbury M. A., Steigerwalt A. G.: US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, CDC, Atlanta (1977).
- Narižení Komise (ES) č. 1441/2007 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.
- Farmer J. J. III, Asbury M. A., Hickman F. W.: Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 569 (1980).
- Nazarowec-White M., Farber J. M.: Int. J. Food Microbiol. 34, 103 (1996).
- Lehner A., Tasara T., Stephan R.: BMC Microbiol. 4, 43 (2004).
- Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: BMC Evolution. Biology 7, 64 (2007).
- Gurtler J. B., Kornacki J. L., Beuchat L. R.: Int. J. Food. Microbiol. 104, 1 (2005).
- Kandhai M. C., Reij M. W., Gorris L. G., Guillame-Gentil O., van Schothorst M.: Lancet 363, 39 (2004).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (staženo 17. 3. 2008).
- Iversen C., Forsythe S. J.: Trends Food Sci. Technol. 14, 443 (2003).
- Hamilton J. V., Lehane M. J., Braig H. R.: Emerg. Infect. Dis. 9, 1355 (2003).
- Kandhai M. C., Reij M. W., Grogno C., van Schothorst M., Gorris L. G., Zwietering M. H.: Appl. Environ. Microbiol. 72, 2721 (2005).
- Friedmann M.: Internat. J. Food Microbiol. 116, 1 (2007).
- Asakura H., Morito-Ishihara T., Yamamoto S., Igimi S.: Microbiol. Immunol. 51, 671 (2007).
- Muytjens H. L., Zanen H. C., Sonderkamp H. J., Koo L. A., Wachsmuth I. K., Farmer J. J.: J. Clin. Microbiol. 18, 115 (1983).
- Postupa R., Aldova E.: J. Hyg., Epidemiol. Microbiol. Immunol. 28, 435 (1984).
- Nazarowec-White M., Farber J. M.: J. Food Protect. 60, 226 (1997).
- FAO/WHO, Ženeva. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant formula. Microbiological Risk Assessment Series, No. 6. (2004). <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en/>
- Centres for Disease Control and prevention (CDC): JAMA 287, 2204 (2002).
- Nazarowec-White M., Farber J. M.: Lett. Appl. Microbiol. 24, 9 (1997).
- Anon. ČSN P ISO/TS 22964, Mléko a mléčné výrobky – Průkaz *Enterobacter sakazakii*, 2006.
- Leslie S. B., Israeli E., Lighthart B., Crow J. H., Crowe L. M.: Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592 (1995).
- Edelson-Mammel S. G., Buchanan R. L.: Food Prot. 67, 60 (2004).
- Williams T. L., Monday S. R.: Edolson-Mammel S., Buchanan R., Musser S. M.: Proteomics 5, 4161 (2005).
- Kim H., Ryu J. H., Beuchat L. R.: Appl. Environ. Microbiol. 72, 5846 (2006).
- Lehner A., Stephan R.: J. Food. Prot. 67, 2850 (2004).
- Nazarowec-White M., McKellar R. C., Piyesena P.: Food Res. Int. 32, 375 (1999).
- FAO/WHO Expert Meeting on *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula, Rome, 16-20 January 2009. Microbiol. Risk Assessment serie 10.

K. Demnerová and J. Pazlarová (Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague): ***Enterobacter sakazakii* alias *Cronobacter sakazakii* – A New Menace ?**

This survey informs about the ubiquitous opportunistic pathogen *Enterobacter sakazakii*. Its main biochemical and physiological characteristics including resistance to desiccation and to heat are presented. The newest results of taxonomy based on detailed analysis of 16S rRNA, which led to renaming the organism as *Cronobacter sakazakii*, are mentioned. Majority of *E. sakazakii* outbreaks have been strongly associated with contaminated powdered infant formula (PIF). The *E. sakazakii* contamination of PIF may be due to introduction of the organism during manufacture or may result from the use of contaminated utensils and poor hygiene in the preparation of PIF. According to an EC directive, all PIFs based on milk powder must be tested for the presence of *E. sakazakii*.

PŘÍRODNÍ DRAHÉ KAMENY A JEJICH VYUŽITÍ VE ŠPERKAŘSTVÍ, ARCHITEKTUŘE A UMĚNÍ

JAKUB JIRÁSEK^a, MARTIN VAVRO^b
a JAROSLAV JIRÁNEK^c

^a *Institut geologického inženýrství, Hornicko-geologická fakulta, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, 17. listopadu 15/2171, 708 00 Ostrava – Poruba,*

^b *Katedra stavebních hmot a hornického stavitelství, Fakulta stavební, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, Ludvíka Podéště 1875, 708 00 Ostrava – Poruba,* ^c *Česká Gemologická Laboratoř, s.r.o., Polanecká 310/18, 721 00 Ostrava - Svinov*
jakub.jirasek@vsb.cz, martin.vavro@vsb.cz,
jiraneck@gemology.cz

Došlo 26.6.08, přijato 3.11.08.

Klíčová slova: přírodní drahé kameny, gemologie, broušení, leštění

Obsah

1. Úvod – charakteristika pojmu drahý kámen
2. Dělení drahých kamenů
3. Zpracování a užití drahých kamenů
4. Cena drahých kamenů
5. Závěr

1. Úvod – charakteristika pojmu drahý kámen

Lidé vyhledávají drahé kameny a obklopují se jimi už od počátků civilizace. Byly a stále jsou využívány jako symbol postavení a moci, pro své domnělé magické a léčivé účinky nebo „jen“ pro svou krásu.

Pojem drahý kámen neměl vždy stejný obsah. V minulosti byly v Evropě za klasické drahé kameny považovány jen některé minerály (např. diamant, odrůdy korundu a berylu, spinel, turmalíny a granáty). Tato skupina má řadu společných vlastností – jde o příjemně barevné nebo naopak zcela čiré průhledné minerály s vysokým leskem, lomem světla a vysokou tvrdostí (v Mohsově stupnici nad 7). O příčku níže na pomyslném cenovém žebříčku stály polodrahokamy – nerosty, které nevyhovovaly všem výše uvedeným vlastnostem. Bylo jich daleko větší množství a byly také dostupnější (např. odrůdy křemene, opál, olivín). Nejnižší pak stály ozdobné kameny – většinou neprůhledné minerály a některé horniny dostupné i ve větších kusech, vhodné pro galantní výrobu a výrobu ozdobných a upomínkových předmětů.

Dnes už se kategorie drahokam, polodrahokam a ozdobný kámen kvůli nejasnému vymezení prakticky nepoužívají a nahradil je technický pojem drahý kámen. Jde o jakýkoli minerál, horninu (a dokonce i organickou substanci), z níž lze zhotovit drahokamový brus, jde použít do šperku v přírodním stavu nebo jde použít k výrobě dekoračních předmětů. V současnosti CIBJO (Confédération Internationale de la Bijouterie, Joaillerie, Orfèvrerie, des Diamants, Perles et Pierres – Mezinárodní klenotnická konfederace) ve své definici drahých kamenů říká, že jde o „přírodní anorganické materiály s výjimkou kovů používané ve špercích a uměleckých výrobcích“. Podle posledního seznamu uznaných drahých kamenů z ledna 2006 uznává CIBJO více jak 100 různých minerálních druhů¹.

Klasicky chápaný drahý kámen by ovšem stále měl vyhovovat několika kritériím: měl by být v přírodě vzácný, odolný a trvanlivý a měl by vyhovovat estetickému hledisku, tj. být krásný a líbivý.

2. Dělení drahých kamenů

Jednou z možností, jak rozdělit širokou skupinu drahých kamenů, je krystalochemický systém minerálů^{2,3}. Ten se používá i ve většině muzejních mineralogických sbírek. Drahé kameny je možné najít prakticky ve všech jeho devíti skupinách, i když v případě některých jde jen o netradiční a málo využívané suroviny.

Kromě minerálů v pravém slova smyslu ovšem do této kategorie patří i přírodní skla (vltavíny a další tektity, obsidián), některé horniny (např. porcelanity, serpentinity, mramory, migmatity) a dokonce i některé organické hmoty (sapropelity, korály, perly, slonovina atd.).

V praktické gemologii se drahé kameny zpravidla rozdělují do tří kategorií:

- diamant – má výsadní postavení; jako jediný z drahých kamenů má víceméně unifikovaný vlastní systém hodnocení barvy, čistoty a kvality výbrusu (spolu s hmotností tvoří takzvaná 4 C – color, clarity, cut, carat).
- rubín, safír, smaragd – tzv. velká trojka barevných drahých kamenů, které se od ostatních liší zejména výrazně vyšší cenou, založenou ovšem na tom, že předčí ostatní ve svých vlastnostech – všechny ve své vzácnosti a kráse, rubín a safír (odrůdy korundu) navíc v odolnosti.
- ostatní drahé kameny.

Další z možností dělení drahých kamenů je podle barvy. Barva je první vlastností minerálu, které si každý všimne. U barevných drahých kamenů je nejdůležitějším kritériem kvality. Barvou se řídí i obliba drahých kamenů v jednotlivých regionech (např. oblíbenost zelených kame-

Tabulka I

Příklady drahých kamenů v jednotlivých skupinách mineralogického systému s krystalochemickými vzorci. V jednotlivých skupinách jsou minerály řazeny abecedně.

prvky: diamant – C	křemičitany: andalusit – $\text{Al}_2[\text{O} \text{SiO}_4]$
sulfidy: pyrit – FeS_2 sfalerit – ZnS	beryl – $\text{Be}_3\text{Al}_2[\text{Si}_6\text{O}_{18}]$ cordierit – $(\text{Mg},\text{Fe})_2\text{Al}_3[\text{AlSi}_5\text{O}_{18}]$ diopsid – $\text{CaMg}[\text{Si}_2\text{O}_6]$ dioplas – $\text{CuSiO}_2(\text{OH})_2$ euklas – $\text{BeAl}[\text{OH} \text{SiO}_4]$ fenakit – $\text{Be}_2[\text{SiO}_4]$ granáty ^a – skupina $\text{X}_3\text{Z}_2[\text{SiO}_4]_3$ chryzokol – $(\text{Cu},\text{Al})_2\text{H}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ jadeit – $\text{Na}(\text{Al},\text{Fe})[\text{Si}_2\text{O}_6]$ kyanit – $\text{Al}_2[\text{O} \text{SiO}_4]$ labradorit – $(\text{Ca},\text{Na})[\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_8]$ lazurit – $(\text{Na},\text{Ca})_8[(\text{S},\text{SO}_4,\text{Cl}_2) \text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}]$ lepidolit ~ $\text{K}(\text{Li},\text{Al})_3(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH},\text{F})_2$ mastek – $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ mikroklin – $\text{K}[\text{AlSi}_3\text{O}_8]$ nefrit – $\text{Ca}_2(\text{Mg},\text{Fe})_5(\text{Si}_8\text{O}_{22})(\text{OH})_2$ olivín – $(\text{Mg},\text{Fe})_2[\text{SiO}_4]$ pyrofylyt – $\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ rodonit – MnSiO_3 sepiolit – $\text{Mg}_4\text{Si}_6\text{O}_{15}(\text{OH})_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ sodalit – $\text{Na}_8[\text{Cl}_2 \text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}]$ spodumen – $\text{LiAl}[\text{Si}_2\text{O}_6]$ titanit – $\text{CaTi}[\text{O} \text{SiO}_4]$ topaz – $\text{Al}_2[(\text{F},\text{OH})_2 \text{SiO}_4]$ turmalíny ^a – skupina $\text{AD}_3\text{G}_6(\text{BO}_3)_3[\text{T}_6\text{O}_{18}]\text{Y}_3\text{Z}$ zirkon – $\text{Zr}[\text{SiO}_4]$ zoisit – $\text{Ca}_2\text{Al}_3[\text{O} \text{OH} \text{SiO}_4 \text{Si}_2\text{O}_7]$
halogenidy: fluorit – CaF_2	organogenní minerály: jantar ~ 78 % C, 10 % H, 11 % O
oxidy a hydroxidy: hematit – Fe_2O_3 chryzoberyl – BeAl_2O_4 kasiterit – SnO_2 korund – Al_2O_3 křemen – SiO_2 opál – $\text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ spinel – MgAl_2O_4 rutil – TiO_2	
uhličitany: aragonit – CaCO_3 azurit – $\text{Cu}_3[\text{OH} \text{CO}_3]_2$ malachit – $\text{Cu}_2[(\text{OH})_2 \text{CO}_3]$ rodochrozit – MnCO_3 smithsonit – ZnCO_3	
sírany: baryt – BaSO_4 celestin – SrSO_4	
fosforečnany: amblygonit – $(\text{Li},\text{Na})\text{Al}[(\text{F},\text{OH}) \text{PO}_4]$ apatit – $\text{Ca}_5[(\text{F},\text{Cl},\text{OH}) \text{PO}_4]_3$ beryllonit – $\text{NaBe}[\text{PO}_4]$ brazilianit – $\text{NaAl}_3[(\text{OH})_2 \text{PO}_4]_2$ lazulit – $(\text{Mg},\text{Fe})\text{Al}_2[\text{OH} \text{PO}_4]_2$ tyrkys – $\text{Cu}(\text{Al},\text{Fe})_6[(\text{OH})_4 \text{PO}_4]_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	

^a V případě granátů a turmalínů jde o větší skupiny minerálů, kde písmena A, D, G, T, Y, X a Z představují pozici různých kationtů a aniontů, příp. jejich skupin.

nů v Asii) nebo historických obdobích (módní vlny – obli- by krvavě červených pyropů, zelených olivínů aj.). Jde ale o poněkud problematickou vlastnost pro určování kamenů. Barva je totiž vnímána subjektivně, závisí na druhu osvět- lení a navíc jeden minerál může mít často celou řadu bar- revných variet v závislosti na strukturálních defektech kry- stalové struktury, isomorfních příměsích nebo velmi jem- ných heterogenních inkluzích. Typickými příklady minerá- lů s více barevnými varietami mezi drahokamy jsou např. křemen (bezbarvý křišťál, růžový růženín, žlutý citrín, fialový ametyst, hnědá záhněda, černý morion), korund (červený rubín, modrý safír, bezbarvý leukosafír aj.) nebo beryl (zelený smaragd, modrozelený akvamarín, růžový morganit, žlutý heliodor aj.). U některých přírodních dra-

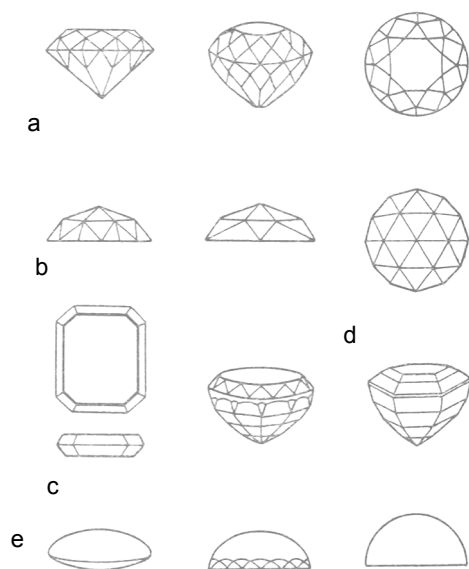
hých kamenů je možné barvu dále upravovat nebo měnit, např. zahříváním nebo vystavením radioaktivnímu záření (tepelná úprava běžnějšího ametystu na vzácnější citrín nebo ozařování některých křišťálů na záhnědu).

3. Zpracování a užití drahých kamenů

Až na výjimky nebyly ani v nejstarší historii lidstva využívány drahé kameny v surovém stavu. Mezi jejich první úpravy patřilo odstraňování kazů a dolešťování po- vrchu tak, aby byl získán vzhled dokonalého krystalu. Později tato činnost přešla do broušení, které mělo za cíl zvýraznit lom světla a lesk minerálu.

Broušení a leštění drahých kamenů jsou základní operace zušlechťování drahých kamenů. V nejstarší minulosti byla hojná výroba tzv. nepravidelných brusů, kdy šlo jen o hrubé obrušování, jehož výsledkem byl nesymetrický tvar. Výhodou byly poměrně malé ztráty suroviny při odstranění povrchových kazů. V současnosti se tato technika používá jen v průmyslovém zpracování méně cenných drahých kamenů (např. obsidián, hematit, variety křemene). Jde o tzv. tromlování neboli tamberování, kdy se velké množství připraveného polotovaru přibližně stejné velikosti nechává brousit a leštit abrazivními prášky při otáčení v motorem poháněných bubnech. V podstatě je tak napodobován proces opracování při říčním transportu, jehož výsledkem jsou také více či méně ohlazené valouny.

Nepravidelné brusy byly postupně vytlačeny hladkým brusem, využívaným zejména u průhledných kamenů (fasetové brusy) a průsvitných nebo opakných kamenů (mugle). Broušením buď na kamenech vznikají drobné rovné plošky (fasety), nebo vzniká bezfasetový vypouklý tvar čočkovce (mugle) – obr. 1. Fasetové broušení se dnes využívá jak v případě symetrických tradicionalistických brusů, kdy se s ohledem na daný minerál maximalizuje hra barev kamene díky disperzi světla procházejícího kamenem a odrazu světla od jednotlivých faset, tak i v případě fantazijních a výtvarnických brusů. Ve všech případech zůstává stejný princip opracování – řezáním nebo štípáním připravená surovina se vícetupňově brousí abrazivy stále menší zrnitosti a nakonec je vyleštěna. Existují četné variace – od broušení z volné ruky přes využívání přesných kvadrantů až po plně automatizované fasetové broušení



Obr. 1. Příklady základních výbrusů drahých kamenů⁴; fasetové brusy: a) briliant, b) rota (růžice), c) tabulkovec, d) stupňovec, bezfasetové nebo částečně fasetové brusy: e) mugle (čočkovce)



Obr. 2. Mozaika z červených jaspisů a fialových ametystů z Krušných hor a zelených chryzoprasů z území dnešního Polska. Kameny jsou zapuštěny do sádrové vrstvy, jejíž povrch je vzorkován tlačítky a pozlacen. Jde o část původní výzdoby s tematikou nebeského Jeruzaléma ze 14. století. Kaple sv. Václava ve svatovítské katedrále na Pražském hradě. Foto J. Jirásek, 2007.

bez přímé účasti člověka. Detaily ohledně základních typů výbrusů uvádí např. cit.^{4,5}, podrobněji pak cit.^{6,7}.

Samostatnou kapitolou je broušení diamantu, který lze brousit jedinec diamantovým prachem. Postup opracování diamantů má řadu stupňů (řezání, štípání, rozbrušování, briliantování), z nichž některé lze v určitých případech vynechat. Broušení diamantů vyžaduje zvládnutí přesných technologií (mj. s ohledem na velmi drahou surovinu), proto je brusíren schopných produkce kvalitních brusů poměrně málo.

Rovinné broušení a leštění drahých kamenů se využívá hlavně u neprůhledných minerálů a hornin, které jsou dostupné ve větších kusech. Velké ploché desky drahých kamenů se využívají na obklady interiérů (od středověké Svatováclavské kaple v katedrále sv. Víta na Pražském hradě až např. po stanice pražského metra), z menších kusů se skládají mozaiky a využívají se jako podklad pro rytí a řezání do kamene (viz dále).

Do oblasti leštění a broušení drahých kamenů patří i mozaiky, inkrustace a architektury. Mozaiky jsou figurální nebo ornamentální kompozice sestavené z drobnějších kousků drahokamů (ale i jiného materiálu) předem zpracovaného rovinným broušením a leštěním (obr. 2). Inkrustace je umělecká dekorativní technika, při které jsou podobné části skládány do plošných obkladů v interiérech. V případě drahokamových architektur vznikají skládáním opracovaných kamenů různých tvarů trojrozměrné objekty – oltářičky, šperkownice aj.⁵

Další z možností zpracování drahých kamenů je rytí a řezání (glyptika). Kameny zdobené plastickou rytinou se obecně nazývají gemy. Zde jsou rozeznávány dva základní technologické postupy – rytím do hloubky kamene vznikají intaglio a řezby plasticky vystupující z kamene se nazývají kameje (obr. 3a,b). Zatímco na intaglio se často využí-

a



b



Obr. 3a,b. Antikizující kamej s figurálním výjevem v prstenu; sardonyx a zlato, Evropa, 18. století. Uměleckoprůmyslové muzeum v Praze. Foto O. Kocourek, 2007.

vají průhledné kameny (např. barevné odrůdy křemene) nebo i neprůhledné minerály v případě pečetních prstenů, pro výrobu kamejí je nevhodnější různobarevná surovina s vrstevnatou stavbou (achát, onyx).

Velmi využívanou technikou zpracování drahých kamenů je plastické vybrušování. Za pomoci řezání, broušení a rytí se zhotovují většinou drobné plastiky (obr. 4) a galanterní zboží. Lze sem zařadit i výrobu dutě broušených nádob. Pro tyto výroby se používají většinou drahé kameny a horniny, které jsou dostupné ve větších kusech, nejsou průhledné a nemají příliš velkou tvrdost (malachit, aragonit, jadeit, nefrit, tyrkys, mastek aj., z hornin např. hadec nebo prachovito-jílovité břidlice).



Obr. 4. Pečetidlo ve tvaru kanelované vázy. Záhněda, Evropa, 1. čtvrtina 19. století. Uměleckoprůmyslové muzeum v Praze. Foto O. Kocourek, 2007.

4. Cena drahých kamenů

Oceňování drahých kamenů je nesmírně složitá oblast, kterou zde zmiňujeme jen velmi stručně. Neexistuje jednota v oceňování drahokamů a v podstatě finanční hodnota drahokamu závisí na nabídce a poptávce. Přesto lze nalézt několik jednotlicích faktorů, které cenu významně ovlivňují:

- o jaký minerál jde. U drahokamů se samozřejmě hodnotí jejich vzácnost. Čím méně je minerál v dané kvalitě dostupný, tím je cena vyšší. Bez spolehlivých laboratorních testů nelze často s určitostí minerál identifikovat, obzvláště v případě, že nejde o přírodní surovinu, ale o již zpracovaný drahokam,
- barva kamene – její odstín, čistota, intenzita, homogenita aj.,
- vnitřní čistota kamene (přítomnost vrostlic, bublin, prasklin aj.),
- hmotnost,
- výbrus (kvalita výbrusu nebo jiné formy zpracování).

Cenu ovšem ovlivňují také módní vlny zájmu o určité drahokam nebo jejich barevnou skupinu, původ suroviny (pro Čechy má jinou hodnotu pyrop nebo olivín z naší republiky než identické kameny z ciziny) a další faktory^{6,7}.

U broušených drahých kamenů se pro oceňování používá hmotnostní jednotka metrický karát – 0,2 gramu. Tato hmotnost je odvozena od hmotnosti semene rohovníku obecného (*Ceratonía siliqua*), jehož plody jsou též známy pod označením svatojánský chléb.

5. Závěr

Zájem o přírodní drahé kameny ve světě stále stoupá. Móda diktuje používat co nejvíce přírodní materiály. S bohatnutím východoevropské populace a rozvojem nových ekonomik v Asii výrazně přibývá lidí, kteří si mohou

drahé kameny dovolit jako šperky, v případě ozdobných kamenů potom jako dekorace obydlí apod. Věda o drahých kamenech – gemologie – řeší řadu úkolů při určování, kvalitativním oceňování a v neposlední řadě při odlišování přírodních kamenů od jejich synteticky vyrobených variant, případně od napodobenin.

Rozšířenou verzi tohoto textu doprovázenou barevnými fotografiemi ilustrujícími jednotlivé typy zpracování drahých kamenů lze nalézt na webové adrese⁸.

Je milou povinností autorů poděkovat Uměleckoprůmyslovému muzeu v Praze za svolení k reprodukci fotografií předmětů z jejich sbírkových fondů a Správě Pražského hradu za svolení fotografovat ve Svatováclavské kapli v katedrále sv. Víta a použít získaný obrazový materiál pro tento článek.

LITERATURA

1. *The Gemstone Book* [online]. CIBJO – The World Jewellery Confederation, January 2006. Dostupné na <http://www.cibjo.us/gemstone.pdf>, staženo 31.3.2008.
2. Strunz H.: *Mineralogische Tabellen: eine Klassifizierung der Mineralien auf kristallchemischer Grundlage*. 8. vyd., Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig, Leipzig 1982.
3. Bernard J. H., Rost R. a kol.: *Encyklopedický přehled minerálů*. Academia, Praha 1992.
4. Täubl K.: *Zlatnictví*. SNTL, Praha 1976.
5. Rejl L.: *Minerál 6*, 131 (1998).
6. Sinkankas J.: *Sinkankas' Standard Catalog of Gem Values*. Geoscience Press, Prescott 1968.
7. Miller A. M.: *Gems and Jewellery Appraising*. 2. vyd., GemStone Press, Woodstock, Vermont 1999.
8. <http://geologie.vsb.cz/loziska/suroviny>, kapitola Drahé kameny, staženo 31.3.2008.

J. Jirásek^a, M. Vavro^b, and J. Jiránek^c (^a *Institute of Geological Engineering, Faculty of Mining and Geology, Technical University, Ostrava*, ^b *Department of Building Materials, Faculty of Civil Engineering, Technical University, Ostrava*, ^c *Czech Geological Laboratory, Ostrava*): **Natural Gemstones and their Utilization in Jewellery, Architecture and Art**

This paper defines and specifies the groups of natural gemstones. It deals with gemstone classification with emphasis on the chemical mineralogical system of crystals. Gemstone processing is discussed – tumble polishing, facet and flat-surface grinding and polishing, engraving and cutting, plastic grinding, and others. Some examples of natural gemstones used in architecture and art are given. Problems of natural gemstone appraisal are briefly mentioned.

ELEKTROCHEMICKÉ GENEROVÁNÍ TĚKAVÝCH SLOUČENIN PRO POTŘEBY SPEKTRÁLNÍCH ANALYTICKÝCH METOD

VÁCLAV ČERVENÝ^a, PETR RYCHLOVSKÝ^a,
JAKUB HRANIČEK^a a JAN ŠÍMA^b

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2, ^b Ústav chemie a biochemie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
cerveny2@natur.cuni.cz

Došlo 5.9.08, přijato 6.11.08.

Klíčová slova: elektrochemické generování těkavých sloučenin, konstrukce generátoru, reakční mechanismus, účinnost generování, kolekce, záchyt, interference

Obsah

1. Úvod
2. Historie elektrochemického generování těkavých sloučenin
3. Experimentální uspořádání při elektrochemickém generování těkavých sloučenin
4. Elektrochemický generátor těkavé sloučeniny
5. Generační elektrody
6. Reakční mechanismus elektrochemického generování těkavých hydridů
7. Účinnost elektrochemického generování těkavých sloučenin
8. Pracovní podmínky elektrochemických generátorů
9. Technika elektrochemického generování kombinovaná se záchytem těkavé sloučeniny
10. Interference při elektrochemickém generování těkavých sloučenin
11. Stanovované analyty
12. Charakteristiky stanovení analytu technikou elektrochemického generování
13. Praktické využití elektrochemického generování těkavých sloučenin
14. Závěr

1. Úvod

Tvorba kovalentních těkavých hydridů prvků čtvrté, páté a šesté hlavní skupiny periodické tabulky je známa a využívá se již více než 170 let^{1–3}. Nejčastěji generovanými těkavými sloučeninami pro potřeby stopové prvkové

analýzy přístroji pro atomovou spektroskopii jsou v současné době kovalentní hydridy arsenu, antimonu, bismutu, selenu, teluru, germania, cínu a olova⁴. Generování těkavých sloučenin se neomezuje jen na těkavé hydridy, ale i na substituované hydridy a jiné těkavé sloučeniny. Mezi ně lze zařadit např. těkavé cheláty, alkylderiváty, karbonyly apod.⁴. Běžně se provádí generování studených par rtuti⁵, byly generovány studené páry kadmia⁶ a těkavé sloučeniny některých drahých a přechodných kovů^{7–9}. Generování těkavých sloučenin jako technika zavádění analytu, který je separovaný od matrice vzorku, může být spojena s různými detekčními technikami⁴. Metodu generování těkavých sloučenin můžeme také použít jako derivatizační techniku v plynové a kapalinové chromatografii a atomový spektrometr pak jako vysoce selektivní a citlivý detektor¹⁰.

V současné době je zdaleka nejčastěji používaným redukčním činidlem při chemickém generování těkavých hydridů NaBH₄. Reakce analytu s NaBH₄ probíhá v prostředí minerální kyseliny, obvykle HCl. Jinou možností přípravy těkavých sloučenin je jejich elektrochemické (elektrolytické) generování. Elektrochemické generování těkavých hydridů představuje alternativní techniku přípravy těkavých hydridů, kdy místo redukčního činidla je redukce provedena průchodem elektrického proudu pouze v prostředí velmi čistých minerálních kyselin. Tím odpadá možnost kontaminace analyzovaného vzorku redukčním činidlem. Koncentrace analytu ve slepém pokusu by tedy měla být velmi nízká. To umožňuje dosažení velice nízkých hodnot mezi detekce a stanovitelnosti^{11,12}. Nezanedbatelnou předností je také úspora drahého redukčního činidla, které je nestálé a musí být každý pracovní den připravováno čerstvě.

Elektrochemické generování těkavých hydridů může být, podobně jako chemické generování, kombinováno s různými analytickými detekčními technikami, jako je atomová absorpční spektrometrie s křemennými atomizátory (QF-AAS)^{13–17}, atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickými atomizátory (ET-AAS)^{18–20}, atomová fluorescenční spektrometrie (AFS)^{21–23}, atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES)^{18,24}, atomová emisní spektrometrie s mikrovlnně indukovaným plazmatem (MIP-AES)^{25,26} i hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)^{27,28}.

2. Historie elektrochemického generování těkavých sloučenin

První pokusy s elektrochemickým generováním arsenodivku byly prováděny na přelomu 19. a 20. století²⁹. Do metod atomové spektrometrie bylo elektrochemické generování těkavých hydridů zavedeno v dávkovém uspo-

řádání experimentu Riginem a spol. v 60. letech 20. století^{30,31}. Novější publikované práce představují progresivnější a praktičtější uspořádání této metody v režimu kontinuální průtokové analýzy a průtokové injekční analýzy. V současné době používá dávkové uspořádání v některých svých publikacích pouze Arbab-Zavar a spol.^{32–34}.

3. Experimentální uspořádání při elektrochemickém generování těkavých sloučenin

Metoda elektrochemického generování těkavých sloučenin může být stejně jako chemické generování používána jak v technice přímého přenosu hydridu, tak ve spojení s kolečkovou technikou. Kromě již zmíněného dávkového generování je v praxi možné při přímém přenosu těkavé sloučeniny pracovat technikou kontinuální průtokové analýzy (CFA) a technikou průtokové injekční analýzy (FIA); ve spojení s kolečkovou technikou pak dávkovým způsobem nebo technikou kontinuální průtokové analýzy.

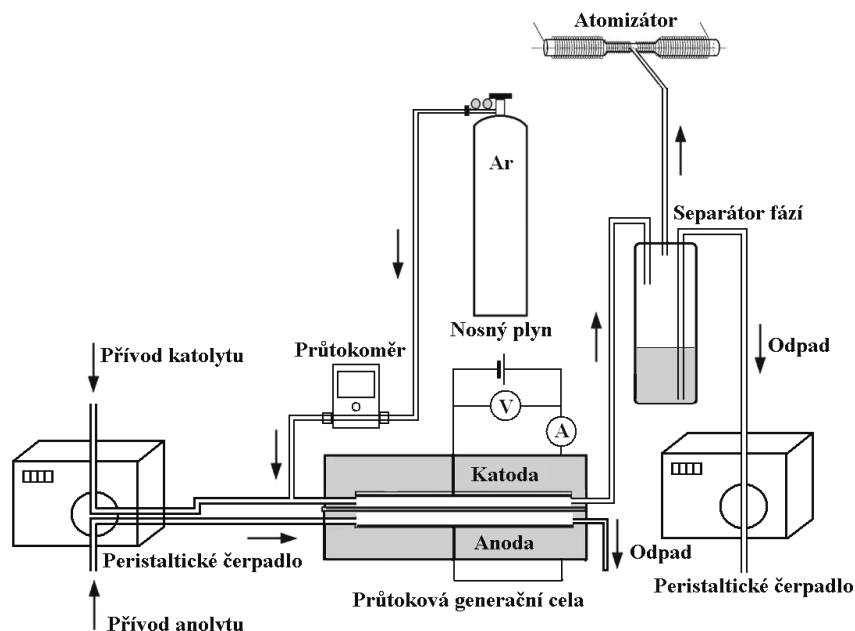
V případě dávkového uspořádání je aparatura elektrochemického generování tvořena následujícími součástmi: generátorem těkavých sloučenin (viz dále), zdrojem konstantního proudu (libovolný stabilizovaný laboratorní zdroj, který je schopný dodat potřebný příkon), zásobníkem nosného plynu s regulátorem průtoku (nosným plynem bývá argon nebo dusík; je přiváděn na vstup elektrochemického generátoru, případně až do atomizátoru) a spojovacím materiálem (veškeré spojovací vedení by

mělo být co nejkratší z důvodu zamezení transportních ztrát způsobených nejčastěji sorpcí těkavé sloučeniny na povrchu neinertního materiálu; nejvhodnějším spojovacím materiálem je teflon).

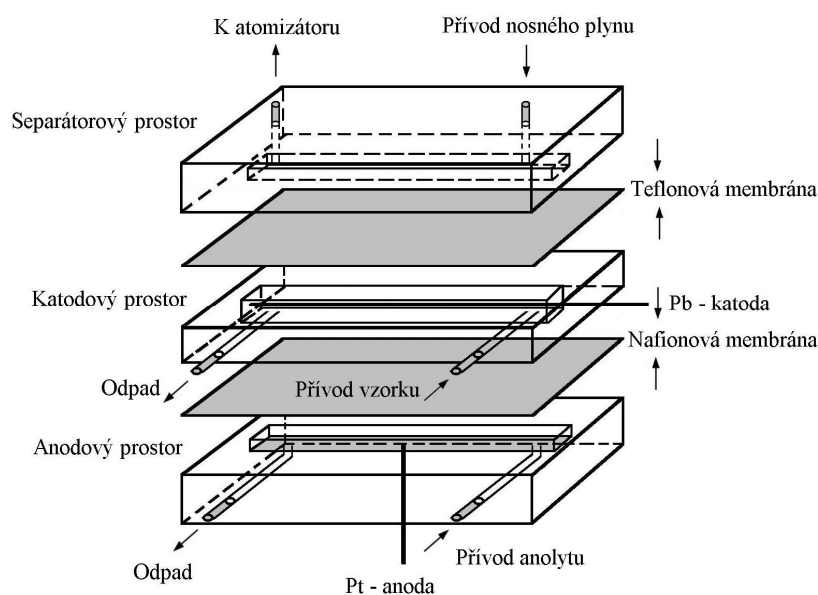
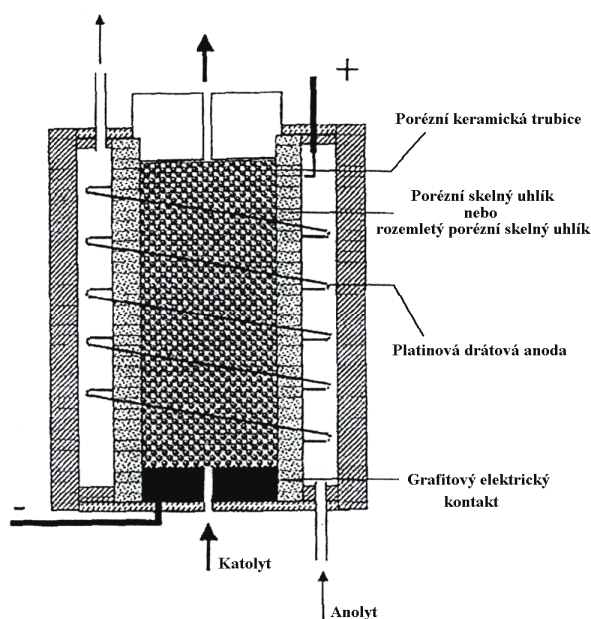
Kontinuální uspořádání se od dávkového liší: průtokovým systémem (nejčastěji je realizován multikanálovou peristaltickou pumpou), separátorem plynné a kapalné fáze (hydrostatické separátory, separátory fáze s nuceným odtažením, separátory membránové) a možností zavádět nosný plyn navíc ještě do separátoru fáze. Příklad zapojení aparatury pro přímý přenos pracující v režimu CFA je uveden na obr. 1.

4. Elektrochemický generátor těkavé sloučeniny

Průtoková elektrochemická cela pro generování těkavých sloučenin bývá většinou složena ze dvou částí, které jsou označovány jako katodový a anodový prostor. Tyto dvě části bývají nejčastěji navzájem odděleny iontově výměnnou membránou (většinou Nafion)^{14,18–20,25–27,35–41} nebo skleněnou fritou^{16,24} či keramickou porézní trubicí¹⁷. Tento separující prvek od sebe odděluje roztoky katolytu a anolytu, které proudí oběma prostory, a jeho úkolem je zabránit anodickým reakčním produktům difundovat do katodového prostoru generátoru. Byly popsány i generační cely bez iontově výměnné membrány⁴². Nejčastěji bývá používána tenkovrstvá průtoková elektrolytická cela zavedená Linem¹⁵ a Brockmannem¹⁴. Tyto cely existují v řadě modifikací, ale základem cely je vždy katodový



Obr. 1. Uspořádání kontinuálního elektrochemického generování těkavých sloučenin (detekce QF-AAS)

Obr. 2. Tenkovrstvá průtoková cela s integrovaným membránovým separátorem fázi³⁶Obr. 3. Příčný řez průtokovým tubulárním elektrochemickým generátorem; upraveno podle cit.¹⁷

a anodový prostor (zhotovený z plexiskla, teflonu, polypropylenu) různých rozměrů a tvarů, s příslušnými přívody a výstupními konektory; obě části jsou odděleny iontově výměnnou membránou a k sobě jsou spojeny nejčastěji šrouby nebo pomocí svěrek. Elektrody z různých materiálů, různých tvarů a velikostí jsou společně

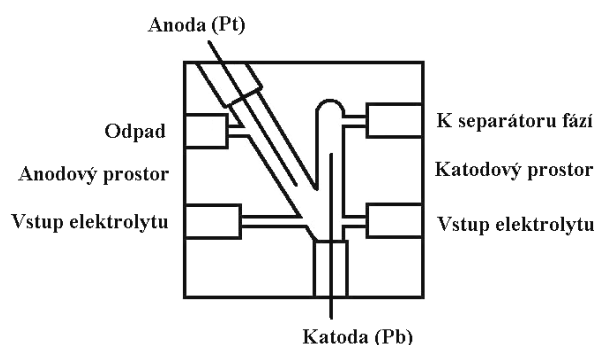
s elektrickými kontakty upevněny v katodovém i anodovém prostoru. Objem katodového a anodového prostoru je dán konstrukcí těla cely, nebo je např. vymezen pomocí těsnění¹⁵. Tento typ průtokové cely může být integrován s membránovým separátorem fázi za vzniku kompaktního elektrochemického generátoru (obr. 2); toto uspořádání vede především ke snížení transportních ztrát.

Jinou konstrukcí průtokové cely je tubulární uspořádání^{17,41,43}, kdy katoda z porézního skelného uhlíku vyplňuje keramickou porézní trubici oddělující katodový a anodový prostor (obr. 3). Anoda ve formě platinového drátku je navinuta na této trubici a celek je upevněn v teflonové trubici; katodou proudí katolyt a prostorem mezi keramickou a teflonovou trubicí pak roztok anolytu. V současnosti je snahou konstruovat generační cely jednak s minimálními vnitřními objemy (obr. 4, ~ 210 μl) při zachování dostatečné účinnosti generování (např. pro aplikace spojené s předřazeným separačním procesem)^{28,42,44,45} a cely s maximální účinností generování (obr. 5)⁴⁶.

5. Generační elektrody

V průtokových elektrochemických generátorech se používají elektrody z různých materiálů a nejrůznějších tvarů a rozměrů.

U tenkovrstvých generátorů se podle konstrukce katodového prostoru používají katody ve formě fólií nebo desek^{14,15,18–20,25,27,40,46–48}, drátů^{24,36–39}, vláken^{16,22,28,45} či granulí^{37,38}. Při použití katody ve tvaru desky může katolyt protékat pouze drážkou vyfrézovanou přímo do bloku materiálu. Při zachování minimálního vnitřního objemu se tak plocha elektrody podstatně zvětší^{46,48}.



Obr. 4. Průtoková generační cela bez iontové výměnné membrány

V případě tubulárního detektoru protéká katolyt přímo porézní elektrodou^{17,26,43}, lisovanou práškovou elektrodou²⁶ nebo na mnoha místech provrtanou trubičkou⁴¹. Anody bývají opět zhotoveny z fólie nebo drátu.

Nejdůležitější při konstrukci elektrochemické generační cely je správná volba materiálu elektrod. Ideální katodový materiál by měl poskytovat vysokou účinnost generování těkavé sloučeniny, měl by mít velký povrch, být inertní, neměl by se účastnit chemických nebo elektrochemických reakcí probíhajících na jeho povrchu. Při použití tohoto materiálu by měly být interference minimální⁴⁹. Volba materiálu anody je poměrně jednoduchá – používá se platina díky své inertnosti v silném oxidačním prostředí vznikajícího kyslíku či chloru při elektrolyze analytu.

Jako katodový materiál je nejčastěji používána platina^{14,15,18,19,24,25,27,40}, na druhém místě olovo^{18–20,24,36–39,47} (v nejnovějších publikacích i slitina olova s cínem^{50,51}), dále pak skelný uhlík^{15,26,47}, retikulární skelný uhlík^{17,26} a pyrolytický grafit^{16,18,19}.

Výběr správného katodového materiálu závisí na daném analytickém problému. Ani jeden z vyjmenovaných materiálů totiž není univerzální⁵².

Platina vykazuje nejmenší účinnosti generování hydridů. Tato účinnost je výrazně ovlivněna kondicionováním povrchu. Platina může být použita pouze pro generování hydridů z nižšího oxidačního stavu As, Se a Sb. Podobně

jako u chemického generování je pro kvantitativní zisk příslušného hydridu nutné provést předřazenou redukci vyšších oxidačních stavů těchto prvků. Naproti tomu byly při použití platiny zjištěny nejmenší interferenční efekty způsobené přítomností různých prvků v matrici vzorku^{15,16}.

Materiály s vysokým přepětím vodíku, jako jsou Cd, Hg–Ag, Pb a Pb–Sn, poskytují nejvyšší účinnost generování hydridů v různých matricích za stejných experimentálních podmínek jako při použití platinové katody. V tomto případě není nutný předredukční krok pro generování hydridů z vyšších oxidačních stavů As(V), Sb(V) a Se(VI) (cit.^{18,19,52,59}). Generování je však zatíženo interferencemi v kapalně fázi v přítomnosti vyšších koncentrací přechodných prvků v matrici vzorku^{39,47}.

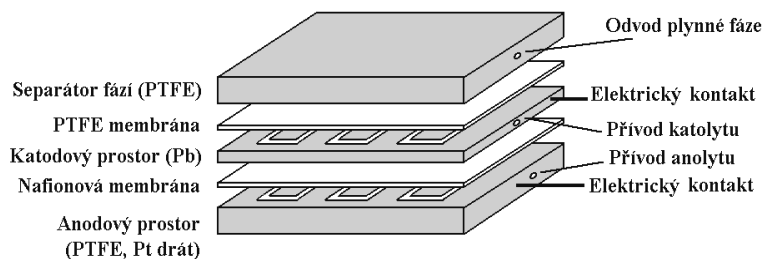
Uhlík ve všech svých formách poskytuje menší účinnost generování než materiály s vysokým přepětím vodíku a při generování z vyšších oxidačních stavů je opět nutný předredukční krok^{15,16,18,19,35,47}.

6. Reakční mechanismus elektrochemického generování těkavých hydridů

Základní představa o mechanismu elektrochemického generování těkavých hydridů vychází ze tří po sobě následujících kroků, uskutečňujících se na povrchu generační elektrody⁵²:

- v první fázi dochází k depozici analytu na povrchu katody (nebo na specifických aktivních centrech povrchu) a jeho redukci (oxidační stav 0),
- následně proběhne reakce mezi redukováným analytem a atomárním vodíkem generovaným na povrchu katody za vzniku příslušného hydridu,
- posledním stupněm elektrolytického generování je desorpce vzniklého těkavého hydridu z povrchu elektrody.

První krok reakce probíhá v silně kyselém prostředí a jde o reakci přenosu náboje. Účinnost tohoto prvního kroku závisí na velikosti aktivního povrchu elektrody a na velikosti dosaženého negativního potenciálu na katodě. Negativnějšího potenciálu je možné dosáhnout na elektrodách s největším přepětím vodíku⁵³. U uvedených elektrodových materiálů za podmínek elek-



Obr. 5. Kombinovaná elektrochemická cela se žlábkovou celoolověnou katodou a integrovaným membránovým separátorem fázi

trochemického generování hydridů roste přepětí vodíku v řadě: Pt < Au < Ag < skelný uhlík < Cd < Hg-Ag < Pb < Pb-Sn^{51,53}.

Pro druhý krok reakčního mechanismu popisuje ve své práci Denkhaus⁵² dva různé mechanismy reakce mezi redukováným analytem a atomárním vodíkem: mechanismus elektrokatalytický a mechanismus elektrochemický. O tom, kterým mechanismem reakce poběží, rozhoduje přepětí vodíku na dané katodě.

Elektrokatalytický mechanismus předpokládá tvorbu vodíkových atomů adsorbovaných na povrchu katody s nízkým přepětím vodíku a jejich reakci s nasorbovaným redukováným hydridotvorným prvkem (oxidační stav 0).

Elektrochemický mechanismus nejdříve uvažuje deprotonizaci H₃O⁺ iontů na povrchu katody s velkým přepětím vodíku. Tvorba hydridů probíhá redukcí hydridotvorného prvku deponovaného na povrchu elektrody a následnou reakcí s H₃O⁺ ionty z katolytu přes řadu meziproduktů.

U katody se střední hodnotou přepětí vodíku mohou pravděpodobně probíhat oba typy reakcí¹².

Třetí krok, tj. uvolnění vzniklé těkavé sloučeniny z povrchu katody, bývá usnadněn průtokem nosného plynu generátorem.

7. Účinnost elektrochemického generování těkavých sloučenin

Jak již bylo řečeno v předcházející kapitole, technika generování těkavých sloučenin zahrnuje minimálně následující fáze: uvolnění těkavé sloučeniny z roztoku vzorku (tj. konverzi analytu na těkavou sloučeninu a její převedení z kapalné do plynné fáze) a transport uvolněné těkavé sloučeniny proudem nosného plynu do atomizátoru / budicího zdroje / ionizačního zdroje. Pro účinnost generování těkavé sloučeniny β_g lze napsat⁴:

$$\beta_g = \beta_r \cdot \beta_t \quad (1)$$

kde β_r značí účinnost uvolnění těkavé sloučeniny a β_t účinnost transportu těkavé sloučeniny. Na základě výše uvedeného lze člen β_r dále rozepsat:

$$\beta_r = \beta_c \cdot \beta_p \quad (2)$$

kde β_c představuje účinnost konverze analytu na těkavou sloučeninu a β_p účinnost převodu generované těkavé sloučeniny z fáze kapalné do fáze plynné. Účinnost elektrochemického generování (konverze) těkavé sloučeniny β_c může být zjištěna čtyřmi způsoby.

V první metodě se měří frakce analytu – hydridotvorného prvku – v odpadu elektrolytického generátoru. Účinnost elektrochemického generování je pak definována vztahem:

$$\beta_{\text{EcHG}} = \frac{c_0 - c_1 \cdot Q \cdot f}{c_0} \quad (3)$$

kde c_0 je původní koncentrace analytu, c_1 je koncentrace analytu v odpadu, Q je průtoková rychlost katolytu a f je faktor naředění. Hodnota koncentrace c_1 může být zjištěna např. technikou chemického generování těkavé sloučeniny (předpoklad 100% účinnosti generování). V tomto případě vyjádření účinnosti generování nejsou zohledněny případné ztráty analytu v aparatuře.

Druhou metodou, jak můžeme zjistit účinnost generování, je spojením techniky elektrochemického generování těkavé sloučeniny s *in situ* záchytem těkavé formy v grafitovém atomizátoru atomového absorpčního spektrometru s následnou atomizací a detekcí AAS^{18,38}. Zde porovnáváme integrovaný signál zachyceného analytu se signálem stejného výchozího množství analytu nadávkovaného přímo do kyvety. Tímto způsobem jsme schopni zjistit celkovou účinnost generování, transportu a záchytu hydridu na modifikovaném povrchu atomizátoru. Protože se účinnost záchytu hydridu pro většinu stanovovaných hydridotvorných prvků blíží 100 % (cit.⁸), je takto vyjádřená účinnost účinností elektrochemického generování. Zahrnuje v sobě transportní ztráty, které je ale možné minimalizovat vhodným experimentálním uspořádáním⁴.

Třetí metodou je možné relativní účinnost generování vyjádřit jako poměr signálů nebo směrníc kalibračních závislostí elektrochemicky a chemicky generovaného hydridu za jinak stejných experimentálních podmínek (účinnost chemického generování se předpokládá 100 %).

Čtvrtá metoda určení účinnosti generování plyne z látkové bilance při použití příslušným radioisotopem obohaceného analytu³⁷. Porovnává se aktivita radioisotopu ve vygenerované těkavé sloučenině zachycené na aktivním uhlí s aktivitou téhož isotopu v roztoku, z kterého byla těkavá sloučenina vygenerována. Touto v současnosti nejuznávanější a neobjektivnější metodou je možné odhalit i části aparatury, na nichž dochází k sorpci či ztrátám analytu.

Účinnost elektrochemického generování těkavé sloučeniny daného analytu je obecně závislá na použité konstrukci průtokového generátoru a nastavených pracovních podmínkách. U účinností uváděných v publikacích je nutné rozlišit mezi maximálními, které byly získány při maximálních proudových hustotách a minimálních průtocích elektrolytů, a dlouhodobými pracovními. Dlouhodobá aplikace extrémních pracovních podmínek, vedoucí k maximálním účinnostem generování těkavé sloučeniny, zpravidla znamená velmi brzké zničení generační cely. Prakticky je nemožné porovnávat různými autory publikované hodnoty účinností generování. Někteří autoři totiž neuvádí, za jakých pracovních podmínek byly tyto účinnosti zjištěny a jakým způsobem jsou definovány. V těchto případech se pravděpodobně jedná o maximální účinnosti.

U klasické tenkovrstvé průtokové generační cely byly zjištěny následující účinnosti generování těkavých sloučenin: As 57 %, Se 90 % a Sb 92 % (první metoda, Pb kato-

da)³⁷, Se $80 \pm 5\%$ (druhá metoda, Pb katoda granulovaná)³⁸; v případě tubulárního generátoru byly zjištěny účinnosti generování pro As, Se a Sb lepší než 90 % (první metoda, katoda ze skelného uhlíku)¹⁷. Ding a Sturgeon uvádí celkovou účinnost generování As $86 \pm 4\%$, Se $60 \pm 5\%$ a Sb $92 \pm 2\%$ (druhá metoda)^{18,19}; Denkhaus a spol. pak celkovou účinnost pro generování arsenovodíku 97 % (druhá metoda)²⁰.

8. Pracovní podmínky elektrochemických generátorů

Pro dosažení maximální citlivosti stanovení daného prvku (dosažení maximální účinnosti generování těkavé sloučeniny) je potřeba u každého průtokového generačního systému optimalizovat složení, koncentraci a průtokovou rychlost katolytu a anolytu proudících generátorem, velikost generačního proudu a průtokovou rychlost inertního nosného plynu (většinou Ar). Je-li elektrochemické generování kombinováno se záchytem (kolekcí) těkavé sloučeniny, je třeba ještě optimalizovat přinejmenším dobu záchytu.

Jako katolyt se nejčastěji pro generování hydridů As, Se a Sb používají zředěné roztoky minerálních kyselin (HCl, H₂SO₄) o koncentraci 0,5–2,0 mol l⁻¹. Obecně platí, že účinnost generování těchto hydridů roste s klesající koncentrací kyseliny^{18,37}. Použití koncentrace kyseliny menší než 0,5 mol l⁻¹ vede k silnému zahřívání elektrolytu^{17,38}. Anolytem obvykle bývá roztok H₂SO₄ se stejnou koncentrací jako katolyt. Použití HCl je nevhodné, protože dochází k průniku vzniklého plynného chloru do katodového prostoru přes iontově-výměnnou membránu nebo fritu a ten pak působí jako silný interferent a snižuje citlivost stanovení. Chceme-li přesto použít jako anolyt HCl, je nutné přidat k ní 20% roztok hydroxylaminu^{18,19}.

Průtokové rychlosti elektrolytů v tenkovrstvých celách se zpravidla pohybují v intervalu 0,5–2,0 ml min⁻¹. Pro ostatní typy generátorů bývají průtokové rychlosti vyšší^{17,42,46}. Účinnost generování (ne však citlivost stanovení) opět roste se snižující se průtokovou rychlostí³⁷.

Účinnost elektrochemického generování těkavých sloučenin velmi závisí na velikosti vloženého generačního proudu. Obecně u tenkovrstvých generátorů se vzrůstajícím vloženým proudem účinnost výrazně stoupá. Velikost protékajícího proudu je omezena vloženým napětím a odporem elektrochemické (elektrolytické) cely. Velikost optimálního generačního proudu značně závisí na konkrétní konstrukci elektrochemického průtokového generátoru a běžně se pohybuje v intervalu 0,4–3,0 A.

Průtok nosného plynu (zpravidla bývá do generačního systému zaváděn již před průtokovou celou; napomáhá tak uvolnění vzniklého hydridu z povrchu elektrody a transportuje ho přes separátor fázi až do detekčního zařízení) se pohybuje v širokém rozsahu od jednotek až po desítky (i stovky) ml min⁻¹. Obecně použití příliš velkého průtoku

nosného plynu vede ke snížení šumu signálu, ale také ke snížení citlivosti stanovení daného prvku.

9. Technika elektrochemického generování kombinovaná se záchytem těkavé sloučeniny

Spojení techniky elektrochemického generování těkavé sloučeniny s jejím záchytem představuje (podobně jako u chemického generování) další krok pro zvýšení citlivosti a snížení meze detekce daného stanovení analytu.

Kombinace techniky elektrochemického generování s následným záchytem těkavé sloučeniny se omezuje na spojení s atomovou absorpční spektrometrií^{18–20,25,34,38,40,54}, případně na spojení s MIP-AES (cit.²⁵).

Záchyt elektrochemicky generované těkavé sloučeniny se provádí na vnitřním povrchu (zpravidla modifikovaném pomocí Pd nebo Pd/Ir pro hydridy a Au pro rtuť) grafitové kyvety elektrotermického atomizátoru^{18–20,34,38,40} nebo na vnitřním povrchu křemene miniaturní křemenné pasti⁵⁴.

Vygenerovaná těkavá forma analytu společně s nadbytkem vodíku a nosným plynem je ze separátoru fázi zavedena křemennou kapilárou dávkovacím otvorem do (předehřáté) grafitové kyvety. Po skončení akumulací fáze a vytažení kapiláry je zachycená forma analytu vypařena a atomizována přímo v grafitové kyvetě ET-AAS.

V případě křemenné pasti je zachycený analyt revolatilizován (opětovně zplyněn) zvýšením teploty pasti (ze 400 °C na 1030 °C) a zvýšením průtoku vodíku (100 ml min⁻¹) a zaveden do atomizátoru⁵⁴.

10. Interference při elektrochemickém generování těkavých sloučenin

Zatímco rozsah atomizačních interferencí lze očekávat v technice elektrochemického generování obdobný jako v případě chemického generování, interference v kapalně fázi se budou pro obě techniky lišit. V případě elektrochemického generování přichází v úvahu další typ interferencí související s elektrochemickými ději na katodě. Významnou skupinou interferentů jsou v technice elektrochemického generování hydridů (podobně jako při chemickém generování) ionty přechodných a drahých kovů pro svoji schopnost katalytického rozkladu vzniklých hydridů⁴. V případě elektrochemického generování hydridů se mohou projevit interference typů ion – ion, ion – produkt, hydrid – ion i hydrid – produkt⁴. Interference způsobené konkurenční spotřebou chemického redukčního činidla nepřipadají v úvahu, ale jsou možné interference vyplývající z konkurence dějů probíhajících na elektrodách. Nejzávažnější však jsou interference, které mají příčinu v modifikaci katodového povrchu (depozice interferujících přechodných prvků na katodě). Modifikací povrchu katody dochází ke změně přepětí vodíku na této elektrodě, mění se její vlastnosti a může dojít ke změně

Tabulka I

Dosažené hodnoty mezi detekce a mezi stanovitelnosti při elektrochemickém generování těkavých sloučenin

Analyt	Mez detekce [ng ml ⁻¹]	Mez stanovitelnosti [ng ml ⁻¹]	Typ cely	Detekce	Lit.
As	0,02	0,09	tenkovrstvá, Pb katoda	přímá QF-AAS	57
As	0,01	0,09	dle obr. 2, Pb katoda	přímá QF-AAS	36
Se	0,53	1,62	tenkovrstvá, Pb katoda	přímá QF-AAS	57
Se	50 pg (1000 µl)	200 pg (1000 µl)	tenkovrstvá, Pb katoda granulovaná	<i>in situ</i> záchyt, ET-AAS	38
Se	0,32	1,06	dle obr. 4, Pb katoda	přímá QF-AAS	42
Se	0,50	1,67	dle obr. 5 (bez integrovaného separátoru fází), Pb katoda	přímá QF-AAS	46
Sb	0,48	1,34	tenkovrstvá, Pb katoda	přímá QF-AAS	57
Te	23,0	46,2	tenkovrstvá, Pb katoda	přímá QF-AAS	57
Hg	0,33	1,10	tenkovrstvá, Pt katoda	přímá QF-AAS	40
Hg	80 pg (1000 µl)	266 pg (1000 µl)	tenkovrstvá, Pt katoda	<i>in situ</i> záchyt, Au-ET-AAS	40

účinnosti elektrochemické reakce. Tato modifikace katody je ireverzibilní. Kromě toho může být na katodě redukovatelný interferent následně dispergován v podobě jemných částic kovu v proudě katolytu a způsobovat rozpad vzniklého hydridu. Studium interferenčních vlivů přechodných a drahých kovů a jednotlivých hydridotvorných prvků navzájem se zabývali různí autoři, např.^{14,15,24,39,47,55}

11. Stanovované analyty

Podobně jako při chemickém generování, jsou nejčastěji generovanými těkavými sloučeninami hydridy As, Se a Sb. Vedle hydridů těchto prvků byly více či méně úspěšně elektrochemicky generovány hydridy Sn^{43,52}, Te^{56,57}, Ge^{43,58} a Bi^{56,58}. Kromě hydridů byly v posledních letech elektrochemicky generovány studené páry rtuti^{33,34,40,59} a těkavé formy kadmia^{50,51}.

12. Charakteristiky stanovení analytu technikou elektrochemického generování

Dosažená mez detekce a mez stanovitelnosti při analýze daného hydridotvorného prvku závisí na typu elektrochemického generátoru, materiálu a velikosti aktivní plochy katody, experimentálních podmínkách a detekčním systému. Obecně je nejmenších detekčních limitů dosaženo použitím tenkovrstvých průtokových cel s olověnou katodou a záchytem s následnou atomizací ET-AAS¹¹. Dosažená citlivost ve srovnání s chemickým generováním je zpravidla nepatrně horší; zato mez detekce, mez stanovitelnosti a opakovatelnost je lepší než v případě

chemického generování^{38,40}. Lineární rozsah kalibrace je podobný jako v případě chemického generování. Příklady námi dosažených vybraných hodnot mezi detekce a mezi stanovitelnosti jsou shrnuty v tab. I. Ve srovnání s publikovanými výsledky jiných autorů se při použití QF-AAS pohybuje s detekčními limity na přibližně stejných úrovních^{33,54}. S použitím AFS dochází ke zlepšení mezi detekce až o tři řády^{23,56,60}.

13. Praktické využití elektrochemického generování těkavých sloučenin

Elektrochemické generování těkavých sloučenin bylo zatím využito především pro analýzu obsahu As, Se a Sb ve vodách (pitné, povrchové a mořské)^{18,19,27,28,38}, v biologických vzorcích (krev, moč) a dalších materiálech (doplňky stravy, „čínská medicína“)^{15,17,25,41}. Často se elektrochemické generování těkavých sloučenin používá pro rychlé současné stanovení hydridotvorných prvků (většinou ve spojení s ICP-MS)^{28,43}. Přehled doposud publikovaných stanovení vybraných prvků v praktických vzorcích uvádí ve svém přehledném článku Laborda a spol.¹². Jako novinku lze označit stanovení teluru v pájecím cínu provedené metodou elektrochemického generování TeH₂ s atomovou fluorescenční detekcí v Číně, kde na úrovni jednotek ppm dosahovali výtěžnosti cca 100 % (cit.⁵⁶).

V poslední době je technika elektrochemického generování těkavých sloučenin využívána také při speciální analýze hydridotvorných prvků buď sekvenčně²³ nebo jako derivatizační technika po HPLC separaci^{22,61–63}. Při sekvenční analýze se vygenerují dávkovým způsobem těkavé sloučeniny nejprve z nižších oxidačních stavů

(v alkalickém prostředí), poté v kyselém prostředí těkavé sloučeniny sumárně jak z nižších, tak i z vyšších oxidačních stavů²³. V on-line uspořádání je elektrochemický generátor těkavých sloučenin napojen přímo na výstup chromatografické kolony a s příslušnou účinností jsou vygenerovány těkavé sloučeniny, které jsou následně detegovány prvkově specifickým detektorem^{22,61–63}. Dosavadní výsledky týkající se speciální analýzy vybraných sloučenin arsenu kombinovanou technikou HPLC – elektrochemické generování hydridů – QF-AAS byly prezentovány na konferencích^{62,63}.

14. Závěr

Elektrochemické generování těkavých sloučenin je poměrně mladá fyzikálně-chemická metoda, která nachází stále větší uplatnění díky rozvoji moderních instrumentálních analytických metod. Své uplatnění nalezne nejen při přímém stanovení celkového množství prvků, které lze na těkavou sloučeninu převést, její budoucnost je zejména v možnosti jejího využití při on-line speciální analýze ve spojení s chromatografickou technikou.

Při elektrochemickém generování těkavých sloučenin je dosahováno téměř shodných výtěžností jako u generování chemického. Elektrochemické generování těkavých sloučenin je tedy plně alternativní generování chemickému, dokonce má i své nesporné výhody. Nesmírnou výhodou elektrochemického generování oproti chemickému je zejména srovnatelná účinnost generování těkavých sloučenin z různých oxidačních stavů stanovovaných prvků. Chemicky lze generovat těkavé sloučeniny pouze z nižších valencí (Se, Te) nebo je účinnost generování (pro dané uspořádání chemického generátoru) závislá na výchozí valenci prvku (As, Sb,...). V obou případech je pak pro vzorky obsahující vyšší mocenství analytu vhodná předřazená redukce.

Současné práce nasvědčují tomu, že vývoj spěje cestou zvyšování účinnosti a miniaturizace generátorů ke komerčním instrumentacím, které bude možné využít pro všechny moderní detekční techniky.

Práce vznikla s podporou grantu A400310507/2005 Grantové agentury Akademie věd ČR a projektu MŠMT č. MSM0021620857 a RP MSMT 14/63.

LITERATURA

1. Marsh J.: *New Edinburgh Phil. J.* 21, 229 (1836).
2. Welz B., Sperling M.: *Atomic Absorption Spectrometry*, 3. vyd. Wiley, Weinheim 1999.
3. Brindle I. D.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 735 (2007).
4. Dědina J., Tsalev D.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, J. Wiley, Chichester 1995.
5. Thompson K. C., Reynolds G. D.: *Analyst* 96, 771 (1971).
6. D'Ulivo A., Chen Y. W.: *J. Anal. At. Spectrom.* 4, 319 (1989).
7. Pohl P., Prusisz B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 753 (2007).
8. Matoušek T.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 763 (2007).
9. Ma H., Fan X., Zhou H., Xu S.: *Spectrochim. Acta, Part B* 58, 33 (2003).
10. Tsalev D. L.: *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 147 (1999).
11. Denkhaus E., Golloch A., Guo X. M., Huang B.: *J. Anal. At. Spectrom.* 16, 870 (2001).
12. Laborda F., Bolea E., Castillo J. R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 743 (2007).
13. Wang X. O., Zhuang Z. X., Yang P. Y., Huang B. L.: *Microchem. J.* 51, 88 (1995).
14. Brockmann L., Nonn C., Golloch A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 397 (1993).
15. Lin Y. H., Wang X. R., Yuan D. X., Yang P. Y., Huang B. L., Zhuang Z. X.: *J. Anal. At. Spectrom.* 7, 287 (1992).
16. Schaumlöffel D., Neidhart B.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 354, 866 (1996).
17. Laborda F., Bolea E., Castillo J. R.: *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 103 (2000).
18. Ding W. W., Sturgeon R. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 225 (1996).
19. Ding W. W., Sturgeon R. E.: *Spectrochim. Acta, Part B* 51, 1325 (1996).
20. Denkhaus E., Golloch A., Kampen T. U., Nierfeld M., Telgheder U.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 361, 733 (1998).
21. Rigin V. I.: *Zh. Anal. Khim.* 33, 1966 (1978).
22. Liang J., Wang Q., Huang B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 366 (2005).
23. Zhang W., Yang X.: *Anal. Chim. Acta* 611, 127 (2008).
24. Hueber D. M., Winefordner J. D.: *Anal. Chim. Acta* 316, 129 (1995).
25. Schickling C., Yang J. F., Broekaert J. A. C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 739 (1996).
26. Beinrohr E., Jurica L., Manová A., Schermer: *Proc. XIVth Seminar on Atomic Spectrochemistry, Universita Košice 1998*, str. 264. Košice 1998.
27. Machado L. F., Jacintho A. O., Menegario A. A., Zagatto E. A., Gine M. F.: *J. Anal. At. Spectrom.* 13, 1343 (1998).
28. Bings N. H., Stefánka Z., Mallada S. R.: *Anal. Chim. Acta* 479, 203 (2003).
29. Laborda F., Bolea E., Castillo J. R.: *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 727 (2002).
30. Rigin V. I., Verkhoturov G. N.: *Zh. Anal. Khim.* 10, 1965 (1977).
31. Rigin V. I.: *Zh. Anal. Khim.* 34, 1569 (1979).
32. Arbab-Zavar M.H., Hashemi M.: *Talanta* 52, 1007 (2000).
33. Arbab-Zavar M. H., Rounaghu H. H., Chamsaz M., Masrournia M.: *Anal. Sci.* 19, 743 (2003).
34. Arbab-Zavar M. H., Rounaghi G. H., Chamsaz M., Masrournia M.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 50, 517 (2005).
35. Pyell U., Dworschak A., Nitschke F., Neidhart B.:

- Fresenius J. Anal. Chem. 363, 495 (1999).
36. Šíma J., Rychlovský P.: Chem. Listy 92, 676 (1998).
 37. Šíma J., Rychlovský P., Dědina J.: Spectrochim. Acta, Part B 59, 125 (2004).
 38. Šíma J., Rychlovský P.: Spectrochim. Acta, Part B 58, 919 (2003).
 39. Junková G., Šíma J., Rychlovský P.: Chem. Papers-Chem. Zvesti 57, 192 (2003).
 40. Červený V., Rychlovský P., Netolická J., Šíma J.: Spectrochim. Acta, Part B 62, 317 (2007).
 41. Zhang W., Gan W., Lin X.: Anal. Chim. Acta 539, 335 (2005).
 42. Hraníček J., Červený V., Rychlovský P.: Chem. Listy 102, 200 (2008).
 43. Bolea E., Laborda F., Castillo J. R., Sturgeon R. E.: Spectrochim. Acta, Part B 59, 505 (2004).
 44. Schermer S., Jurica L., Paumard J., Beinrohr E., Matysik F.-M., Broekaert J. A. C.: Fresenius' J. Anal. Chem. 371, 740 (2001).
 45. Ozmena B., Matysika F.-M., Bings N. H., Broekaert J. A. C.: Spectrochim. Acta, Part B 59, 941 (2004).
 46. Hraníček J., Červený V., Rychlovský P.: *Book of Abstracts of Tenth Rio Symposium on Atomic Spectrometry, VentoLeste 2008*, str. 250. Vento Leste 2008.
 47. Ding W. W., Sturgeon R. E.: J. Anal. At. Spectrom. 11, 421 (1996).
 48. Guo X., Li S., Huang B.: Can. J. Anal. Sci. Spectros. 49, 327 (2004).
 49. Vydra F., Štulík K., Juláková E.: *Electrochemical Stripping Analysis*. Ellis Horwood, Chichester 1977.
 50. Arbab-Zavar M. H., Chamsaz M., Youssefi A., Aliakbari M.: Anal. Chim. Acta 546, 126 (2005).
 51. Arbab-Zavar M. H., Chamsaz M., Youssefi A., Aliakbari M.: Anal. Chim. Acta 576, 215 (2006).
 52. Denkhaus E., Beck F., Bueschler P., Gerhard R., Golloch A.: Fresenius' J. Anal. Chem. 370, 735 (2001).
 53. Brdička R., Dvořák J.: *Základy fyzikální chemie*. Academia, Praha 1977.
 54. Menemenlioğlu I., Korkmaz D., Ataman O. Y.: Spectrochim. Acta, Part B 62, 40 (2007).
 55. Bolea E., Laborda F., Belarra M. A., Castillo J. R.: Spectrochim. Acta, Part B 56, 2347 (2001).
 56. Jiang X., Gan W., Han S., He Y.: Spectrochim. Acta, Part B 63, 710 (2008).
 57. Šíma J., Rychlovský P., Červený V.: Cent. Eur. J. Chem., zasláno k otištění.
 58. Bings N. H., Stefanka Z., Mallada S. R.: Anal. Chim. Acta 479, 203 (2003).
 59. Šíma J., Rychlovský P., Dědina J.: *Proc. 4th Euro. furnace symposium, Technical University Košice 2000*, str. 39. Košice 2000.
 60. Li X., Wang Zh.: Anal. Chim. Acta 588, 179 (2007).
 61. Liang J., Wang Q., Huang B.: Anal. Bioanal. Chem. 381, 366 (2005).
 62. Červený V., Rychlovský P.: *Book of abstracts of XVIIth Slovak Spectroscopic conference, Technical University Košice 2004*, str. 47. Košice 2004.
 63. Červený V., Hraníček J., Rychlovský P.: *Book of Abstracts of Tenth Rio Symposium on Atomic Spectrometry, VentoLeste 2008*, str. 103. Vento Leste 2008.

V. Červený^a, P. Rychlovský^a, J. Hraníček^a, and J. Šíma^b (^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, ^bInstitute of Chemistry and Biochemistry, University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice): **Electrochemical Generation of Volatile Compounds for Spectral Analytical Methods**

A comprehensive review on the history of electrochemical generation of volatile compounds, their usability and working conditions. This method is an alternative to chemical generation methods. The electrochemical generation possesses some advantages like replacement of expensive and unstable reducing agents by electric current and comparable efficiency for all oxidation states of analytes. Despite a lower sensitivity of electrochemical generation, better limits of detection and determination were obtained due to reduced contamination risks associated with the use of reducing agents. The electrochemical generation is a prospective method of decreasing detection limits and miniaturization of hydride generators. The miniature derivatization unit can be used for the coupling of a chromatographic system to selective and sensitive atomic spectral detectors as required by speciation analysis.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ON-LINE PREKONCENTRACE NA ROZHRANÍ ELEKTROLYTŮ O RŮZNÉM pH ANEB KRÁSA KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

JAN PETR*, VÍTĚZSLAV MAIER, JOANNA
ZNALEZIONA, KATEŘINA VÍTKOVÁ,
VÁCLAV RANC a JURAJ ŠEVČÍK

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Uni-
verzita Palackého v Olomouci, Třída Svobody 8, 771 46
Olomouc
secjpetr@gmail.com*

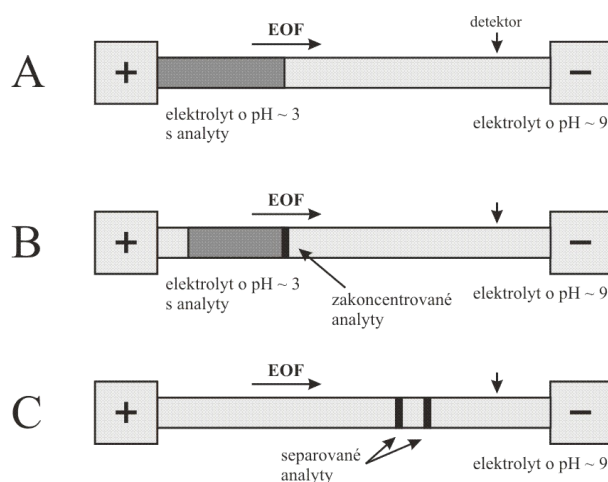
Došlo 27.9.07, přepracováno 2.7.08, přijato 25.8.08.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, prekoncentrace,
fenolické kyseliny

Úvod

Kapilární elektroforéza patří mezi moderní vysoko-účinné separační techniky, kde je separace založena na rozdílných rychlostech pohybu iontů v elektrickém poli^{1–3}. Její využití sahá od analýzy malých molekul jako jsou anorganické^{4–6} i organické ionty^{7–9} až po analýzu složitých biomolekul, jako jsou proteiny^{10–12}, polysacharidy^{13–14} či fragmenty nukleových kyselin^{15–17}. Za zmínku rovněž stojí význam kapilární elektroforézy v projektu sekvenace lidského genomu^{18,19}, v aplikacích metabolického výzkumu^{20–22} nebo pro analýzy mikroorganismů^{23–25} a jednotlivých organel buňky^{26,27}.

Krása kapilární elektroforézy nespočívá pouze v širokých možnostech aplikace této techniky, ale i v možnosti jednoduchého a účinného ovlivňování separace přidávkem určitého selektoru do základního elektrolytu (navíc v malém množství, protože objem kapiláry se pohybuje v desítkách nanolitů)^{2,28–30}. Dalším kouzlem kapilární elektroforézy je možnost volby sledu elektrolytů, resp. kroků separace, které vedou ke zkoncentrování analytů, ale zároveň i k jejich separaci³¹. Metody, které se používají pro tyto tzv. „on-line“ prekoncentrace, je možné rozdělit



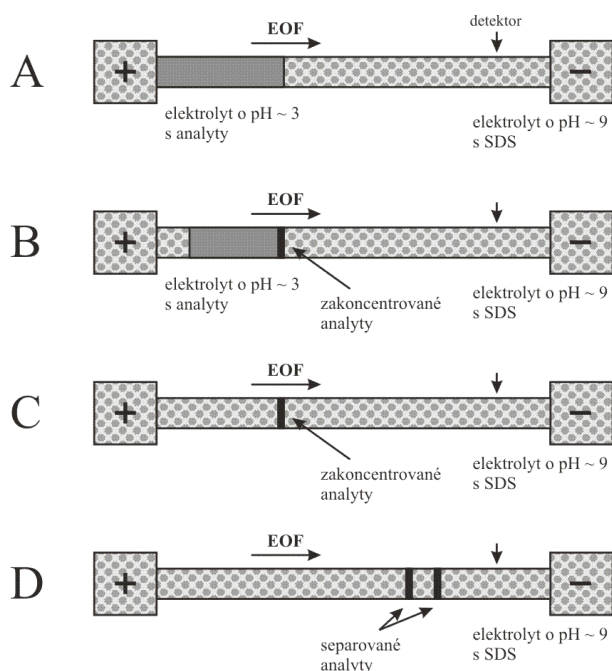
Obr. 1. Schéma prekoncentrace na rozhraní elektrolytů o různém pH („dynamic pH junction“)

do několika velkých skupin: metody zkoncentrování zesílením pole („stacking“ metody), metody využívající izotachoforetický stav, metody nametání („sweeping“ metody) a metody prekoncentrování na přechodném rozhraní pH („dynamic pH junction“ metody). Všechny tyto metody byly popsány v řadě monografií^{2,32–39} a přehledných článků^{31,40–46}.

Z uvedeného je velice zajímavá metoda prekoncentrace na rozhraní elektrolytů o různém pH (tzv. přechodné rozhraní pH), kterou poprvé použil Britz-McKibbin⁴⁷ na základě pozorování uvedeného v práci Aebersolda (cit.⁴⁸). Princip metody je pro aniontové analyty uvedený na obr. 1. Analyt je v elektrolytu o pH 3 nenabitý a je unášen elektroosmotickým tokem (1A), na rozhraní elektrolytů disociuje a začne se pohybovat k anodě. Opětovným vstupem do zóny o pH 3 se neutralizuje náboj analytu a děj se opakuje; tak vzniká úzká prekoncentrovaná zóna (1B). Po ukončení prekoncentrace se analyty rozdělí zónovou elektroforézou (1C).

Zajímavá alternativa k metodě prekoncentrace na rozhraní elektrolytů o různém pH byla publikována o dva roky později⁴⁹, jde o metodu kombinující metodu prekoncentrace neutrálních látek, tzv. nametání pomocí micelárního prostředí („sweeping“) a metodu prekoncentrace na přechodném pH rozhraní (viz obr. 2). Metodika prekoncentrace je podobná; opět aniontové analyty disociují na rozhraní elektrolytů, ovšem zároveň se i rozdělují mezi

* Jan Petr získal cenu Shimadzu 2006.



Obr. 2. Schéma prekoncentrace na rozhraní elektrolytů o různém pH v kombinaci s nametáním („dynamic pH junction – sweeping“)

Tabulka I

Přehled aplikací metody prekoncentrace na rozhraní elektrolytů o různém pH

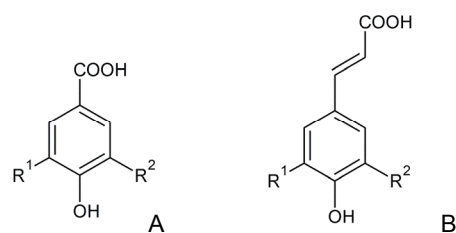
Analyty	Lit.
Katecholaminy	47
Nitrofenoly, kresoly	50
Proteiny	51-55
Ethynylestradiol	56
Flaviny	49, 57, 58
Deriváty anilinu	59
Purinové a pyrimidinové deriváty	60-64
Serotonin	65
Barbituráty, pesticidy	66, 67
Lovastatin	68
Aminokyseliny	69-72
Aminy	73
Sloučeniny arsenu	74, 75
Muramová kyselina, 2,6-diaminoheptandiová kyselina	76
Pyrolizidinové alkaloidy	77

micely a volný elektrolyt (před zkoncentrování analytu vzniká nefokusovaná zóna). Separace analytů pak probíhá metodou micelární elektrokinetické chromatografie.

Obě blíže prezentované metody se od svého vzniku

poměrně rozšířily a dodnes bylo publikováno již několik desítek prací zabývajících se těmito tématy; stručný přehled aplikací těchto metod přináší tabulka I. Zajímavá alternativa k oběma metodám byla vyvinuta v naší laboratoři pro analýzu benzoové a sorbové kyseliny (cit. ⁷⁸⁻⁸⁰); jde o metodu kombinující mechanismus prekoncentrace na rozhraní elektrolytů o různém pH (elektrokinetická akumulace analytu) a mechanismus separace micelární elektrokinetickou chromatografií (mobilizace analytu). Modelováním s použitím programu Simul 5.0 (cit. ⁷⁸) bylo prokázáno, že na pohyblivém rozhraní elektrolytů se analyt neutralizuje a vytvoří se jeho ostré zóny. Mobilizace mechanismem rozdělování neutrálního analytu mezi micely natrium dodecylsulfátu a volný elektrolyt pak vede k rozmývání piků.

V této práci se zabýváme on-line prekoncentrací metodou elektrokinetické akumulace a separací sedmi významných fenolických kyselin: 4-hydroxybenzoové, syringové, vanilové, kumarinové, kávové, ferulové a sinapové kyseliny (struktury viz obr. 3). Zároveň ukazujeme, že lze naší navrženou prekoncentrační metodu použít i pro analýzu poměrně složitých reálných vzorků.



Obr. 3. Struktury fenolických kyselin; A) R¹ = R² = H, 4-hydroxybenzoová kyselina; R¹ = CH₃, R² = H, syringová kyselina; R¹ = H, R² = OCH₃, vanilová kyselina; B) R¹ = R² = H, kumarinová kyselina; R¹ = H, R² = OH, kávová kyselina; R¹ = OCH₃, R² = H, ferulová kyselina; R¹ = OCH₃, R² = OCH₃, sinapová kyselina

Experimentální část

Chemikálie a aparatura

Složky základních elektrolytů: kyselina fosforečná, kyselina boritá, hydroxid sodný a natrium dodecylsulfát (SDS), a standardy analytů: kyselina 4-hydroxybenzoová, syringová, vanilová, kumarinová, kávová, ferulová a sinapová byly zakoupeny od firmy Sigma (St. Louis, USA) v čistotě p.a. Měření bylo prováděno na přístroji HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s detektorem s diodovým polem snímajícím při 200 nm. Pro měření byla použita nepokrytá křemenná kapilára (CACO-Silica Tubing and Optical Fibers, Slovenská republika) s vnitřním průměrem 50 μm o celkové délce 48,5 cm a efektivní délce 40 cm. Kapilára byla termostatována na 25 °C. Aplikované dávkovací a separační napětí bylo -10 kV. Každý den byla kapilára kondicionována pro-

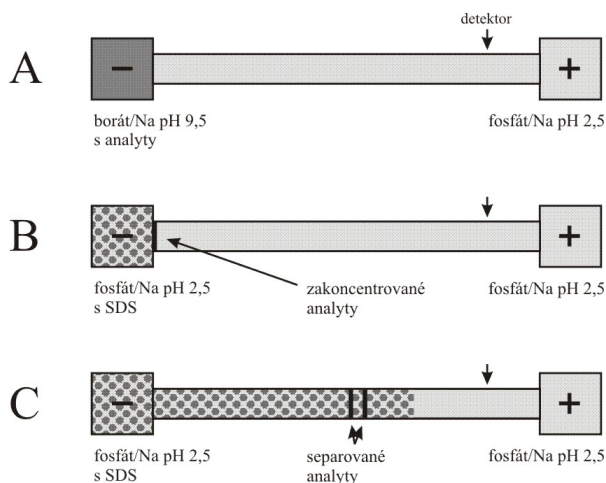
mytím 0,1 M-NaOH (5 min), vodou (10 min) a základním elektrolytem (15 min). Mezi měřeními byla kapilára promývána vodou (5 min) a základním elektrolytem (5 min). Základní elektrolyty byly připraveny rozpuštěním vypočteného množství kyseliny v deionizované vodě, pH bylo upraveno hydroxidem sodným; mobilizační elektrolyt byl připraven přidáním natrium dodecylsulfátu k připravenému elektrolytu. Vzorky byly rozpuštěny v borátovém elektrolytu o pH 9,5.

Příprava reálného vzorku

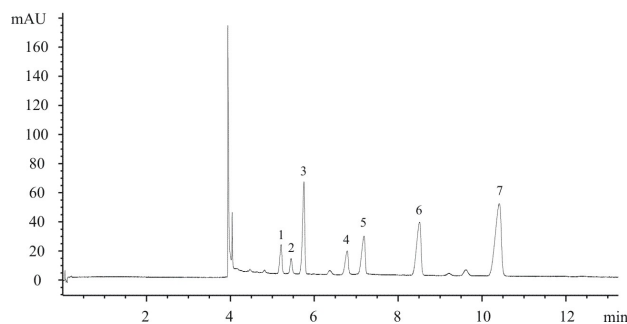
Pro přípravu extraktu majoránky zahradní (*Majorana hortensis* L.) byla použita vysokotlaká extrakce rozpouštědlem: 1,0000 g sušeného homogenizovaného rostlinného materiálu bylo naváženo přímo do extrakční patry (22 ml) a extrahováno acetonem při teplotě 150 °C a tlaku 15 MPa, dvěma statickými extrakčními cykly (2×10 min) na automatickém extraktoru *one* PSE (Applied Separations, Allentown, USA). Extrakty byly jímány do skleněných vialek, zkoncentrovány pod dusíkem, rozpuštěny ve směsi voda-methanol (90:10, v/v) a přefiltrovány přes filtr Microcon YM-10, Regenerated Cellulose 10 000 (Millipore Corporation, Bedford, USA). Takto získané extrakty byly rozpuštěny v dávkovacím elektrolytu o pH 9,5.

Výsledky a diskuse

Studované fenolické kyseliny mají hodnoty pK_a v rozmezí 4,0–4,7. Z uvedených hodnot můžeme odhadovat jejich elektroforetické chování: v elektrolytech s nízkým pH budou vystupovat jako nenabitě a separovatelné mechanismem micelární elektrokinetické chromatografie, zatímco v elektrolytech s vysokým pH se budou



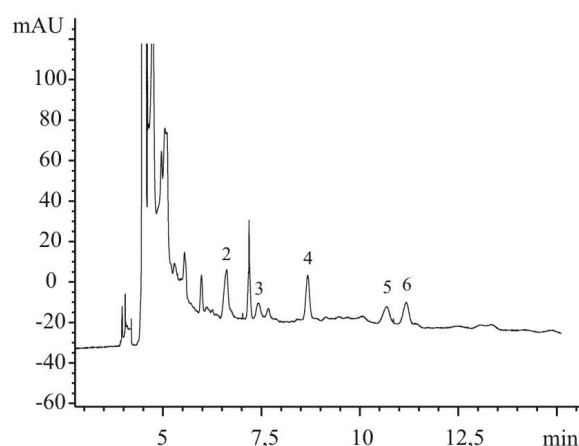
Obr. 4. Schéma akumulací/mobilizační techniky prekoncentrace



Obr. 5. Analýza standardů fenolických kyselin kapilární elektroforézou; 1 sinapová, 2 ferulová, 3 kumarínová, 4 kávová, 5 syringová, 6 vanilová, 7 4-hydroxybenzoová kyselina; dávkovací elektrolyt 50 mmol l⁻¹ borát sodný pH 9,5, základní elektrolyt 50 mmol l⁻¹ fosfát sodný pH 2,5; mobilizační elektrolyt 50 mmol l⁻¹ fosfát sodný pH 2,5 s 100 mmol l⁻¹ SDS, elektrokinetické dávkování 10 min při -10 kV; separace při -10 kV; koncentrace standardů 50 ng ml⁻¹

chovat jako anionty a budou separovatelné zónovou elektroforézou. Rozdíl v jejich disociaci umožňuje navrhnout prekoncentrační systém založený na spojení dvou elektrolytů o různém pH (obr. 4). Fenolické kyseliny jsou rozpuštěny v dávkovacím elektrolytu o pH 9,5 umístěném v dávkovací vialce. Aplikací napětí migrují do rozhraní elektrolytů o různém pH vytvořeného přítomností základního elektrolytu o pH 2,5 v kapiláře. Na vytvořeném pohyblivém rozhraní jsou kyseliny neutralizovány a zkoncentrovány (akumulační část). Po zkoncentrování výměnou dávkovacího elektrolytu za elektrolyt mobilizační o pH 2,5 obsahující SDS v koncentraci větší než je kritická micelární koncentrace, probíhá separace fenolických kyselin.

Námi navržený systém se skládá ze základního fosfátového elektrolytu o pH 2,5, mobilizačního fosfátového



Obr. 6. Analýza extraktu majoránky kapilární elektroforézou; podmínky separace stejné jako u analýz na obr. 5 vyjma elektrokinetického dávkování: 30 min při -10 kV

Tabulka II
Charakteristiky kalibrační závislosti

Kyselina	Rovnice kalibrační závislosti	R^2	LOD [ng ml ⁻¹]
Sinapová	$y = 1,32x + 0,352$	0,989	2,2
Ferulová	$y = 2,79x + 0,876$	0,991	4,2
Kumarinová	$y = 1,94x + 0,521$	0,980	0,7
Kávová	$y = 2,13x + 0,936$	0,993	2,0
Syringová	$y = 3,19x + 1,128$	0,962	1,1
Vanilová	$y = 1,09x + 0,038$	0,973	0,6
4-Hydroxybenzoová	$y = 1,84x + 1,297$	0,957	0,4

tového elektrolytu o pH 2,5 s SDS a dávkovacího borátového elektrolytu o pH 9,5. Dávkování probíhá určitou dobu (10–30 min) při –10 kV, analýza při –10 kV. Analýza standardů o koncentraci 50 ng ml⁻¹ při desetiminutovém dávkování je znázorněna na obr. 5. Kalibrační závislosti jsou lineární v oblasti 2–100 ng ml⁻¹ při třicetiminutovém dávkování s koeficienty determinace 0,957–0,993 (viz tab. II). Proti klasické metodě založené na hydrodynamickém dávkování analytu do základního fosfátového elektrolytu a SDS mobilizaci dosahuje prezentovaná metoda 720× až 5560× nižší limit detekce (při elektrokinetickém dávkování po dobu 30 min). Navržená akumulací/mobilizační metoda prekoncentrace byla rovněž s úspěchem testována na vzorku extraktu z majoránky (příklad analýzy je na obr. 6).

Závěr

V této práci byla navržena nová akumulací/mobilizační metoda pro prekoncentraci slabých kyselin kapilární elektroforézou. Analýza touto metodou umožňuje dosáhnout až 5560× nižší limit detekce než klasickou metodou micelární elektrokinetické chromatografie bez prekoncentrace. Zároveň je možno stanovit fenolické kyseliny i v poměrně složitých matricích, jak bylo ukázáno na extraktu z majoránky.

Autoři děkují Ministerstvu školství mládeže a tělovýchovy (Výzkumný záměr MSM6198959216) a Grantové agentuře České republiky (grant 203/07/P233) za finanční podporu práce.

LITERATURA

- Kašička V.: Chem. Listy 91, 320 (1997).
- Khaledi M. G. (ed.): *High-Performance Capillary Electrophoresis. Theory, Techniques, and Applications*. J. Wiley, New York 1998.
- Everaerts F. M., Beckers J. L., Verheggen T. P. E. M.: *Isotachopheresis. Theory, Instrumentation and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1976.
- Timerbaev A. R.: Electrophoresis 25, 4008 (2004).
- Timerbaev A. R., Hirokawa T.: Electrophoresis 27, 323 (2006).
- Pacáková V., Coufal P., Štulík K., Gaš B.: Electrophoresis 24, 1883 (2003).
- Ramautar R., Somsen G. W., de Jong G. J.: Anal. Bioanal. Chem. 387, 293 (2007).
- Tanyanyiwa J., Abad-Villar E. M., Hauser P. C.: Electrophoresis 25, 903 (2004).
- Padaruskas A.: Anal. Bioanal. Chem. 384, 132 (2006).
- Kašička V.: Electrophoresis 27, 142 (2006).
- Schiffer E., Mischak H., Novak J.: Proteomics 6, 5615 (2006).
- Hsieh Y.-L., Chen T.-H., Liu C.-Y.: Electrophoresis 27, 4288 (2006).
- Kabel M. A., Heijnis W. H., Bakx E. J., Kuijpers R., Voragen A. G. J., Schols H. A.: J. Chromatogr., A 1137, 119 (2006).
- Lamb D. H., Lei Q. P., Hakim N., Rizzo S., Cash P.: Anal. Biochem. 338, 263 (2005).
- Willems A. V., Deforce D. L., Van Peteghem C. H., Van Bocxlaer J. F.: Electrophoresis 26, 1221 (2005).
- Sang F., Ren J.: J. Sep. Sci. 29, 1275 (2006).
- Huang F.-C., Liao C.-S., Lee G.-B.: Electrophoresis 27, 3297 (2006).
- Gödde R., Akkad D.-A., Arning L., Dekomien G., Herchenbach J., Kunstmann E., Meins M., Wiczorek S., Epplen J. T., Hoffjan S.: Electrophoresis 27, 939 (2006).
- Fredlake C. P., Hert D. G., Mardis E. R., Barron A. E.: Electrophoresis 27, 3689 (2006).
- Adam T., Friedecký D., Fairbanks L. D., Ševčík J., Barták P.: Clin. Chem. 45, 2086 (1999).
- Van Dyck S., Kaale E., Nováková S., Glatz Z., Hogmartens J., Van Schepdael A.: Electrophoresis 24, 3868 (2003).
- Telnarová M., Vytisková S., Chaloupková R., Glatz Z.: Electrophoresis 25, 290 (2004).
- Rodriguez M. A., Armstrong D. W.: J. Chromatogr., B 800, 7 (2004).
- Kremser L., Blaas D., Kenndler E.: Electrophoresis 25, 2282 (2004).
- Szumski M., Klodzińska E., Buszewski B.: J. Chromatogr., A 1084, 186 (2005).

26. Whiting C. E., Arriaga E. A.: *Electrophoresis* 27, 4523 (2006).
27. Fuller K. M., Arriaga E. A.: *Anal. Chem.* 75, 2123 (2003).
28. Ševčík J., Tesařová E., Stránský Z.: *Chem. Listy* 95, 139 (2001).
29. Maier V., Horáková J., Petr J., Drahoňovský D., Ševčík J.: *J. Chromatogr., A* 1103, 337 (2006).
30. Righetti P. G., Gelfi C., Verzola B., Castelletti L.: *Electrophoresis* 22, 603 (2001).
31. Lin C.-H., Kaneta T.: *Electrophoresis* 25, 4058 (2004).
32. Landers J. P. (ed.): *Handbook of Capillary Electrophoresis*. CRC Press, Boca Raton 1997.
33. Lunn G. (ed.): *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*. J. Wiley, New York 2000.
34. Baker D. R.: *Capillary Electrophoresis*. J. Wiley, New York 1995.
35. Camilleri P. (ed.): *Capillary Electrophoresis. Theory and Practice*. CRC Press, Boca Raton 1998.
36. Righetti P. G. (ed.): *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton 2000.
37. Rathore A. S., Guttman A. (ed.): *Electrokinetic Phenomena*. Marcel Dekker, New York 2004.
38. Delgado A. V. (ed.): *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*. Marcel Dekker, New York 2002.
39. Guzman N. A. (ed.): *Capillary Electrophoresis Technology*. Marcel Dekker, New York 1993.
40. Horáková J., Maier V., Ševčík J.: *Chem. Listy* 100, 163 (2006).
41. Malá Z., Křivánková L., Gebauer P., Boček P.: *Electrophoresis* 28, 243 (2007).
42. Beckers J. L., Boček P.: *Electrophoresis* 21, 2747 (2000).
43. Chien R.-L.: *Electrophoresis* 24, 486 (2003).
44. Monton M. R. N., Terabe S.: *J. Chromatogr., B* 841, 88 (2006).
45. Urbánek M., Křivánková L., Boček P.: *Electrophoresis* 24, 466 (2003).
46. Petr J., Maier V., Horáková J., Ševčík J., Stránský Z.: *J. Sep. Sci.* 29, 2705 (2006).
47. Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y.: *Anal. Chem.* 72, 1242 (2000).
48. Aebbersold R., Morrison H. D.: *J. Chromatogr.* 516, 79 (1990).
49. Britz-McKibbin P., Otsuka K., Terabe S.: *Anal. Chem.* 74, 3736 (2002).
50. Kim J.-B., Britz-McKibbin P., Hirokawa T., Terabe S.: *Anal. Chem.* 75, 3986 (2003).
51. Wang S.-J., Tseng W.-L., Lin Y.-W., Chang H.-T.: *J. Chromatogr., A* 979, 261 (2002).
52. Nesbitt C. A., Lo J. T.-M., Yeung K. K.-C.: *J. Chromatogr., A* 1073, 175 (2005).
53. Monton M. R. N., Imami K., Nakanishi M., Kim J.-B., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 1079, 266 (2005).
54. Bessonova E. A., Kartsova L. A., Shmukov A. U.: *J. Chromatogr., A* 1150, 332 (2007).
55. Imami K., Monton M. R. N., Ishihama Y., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 1148, 250 (2007).
56. Britz-McKibbin P., Ichihashi T., Tsubota K., Chen D. D. Y., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 1013, 65 (2003).
57. Britz-McKibbin P., Markuszewski M. J., Iyanagi T., Matsuda K., Nishioka T., Terabe S.: *Anal. Biochem.* 313, 89 (2003).
58. Su A.-K., Chang Y.-S., Lin C.-H.: *Talanta* 64, 970 (2004).
59. Kim J.-B., Okamoto Y., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 1018, 251 (2003).
60. Britz-McKibbin P., Beaulat G. M., Chen D. D. Y.: *Anal. Chem.* 72, 1729 (2000).
61. Britz-McKibbin P., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 1000, 917 (2003).
62. Britz-McKibbin P., Nishioka T., Terabe S.: *Anal. Sci.* 19, 99 (2003).
63. Mei S. R., Yao Q. H., Cai L. S., Xing J., Xu G. W., Wu C. Y.: *Electrophoresis* 24, 1411 (2003).
64. Markuszewski M. J., Britz-McKibbin P., Terabe S., Matsuda K., Nishioka T.: *J. Chromatogr., A* 989, 293 (2003).
65. Smadja C., Le Potier I., Chaminad P., Jacquot C., Trouvin J. H., Taverna M.: *Chromatographia* 58, 79 (2003).
66. Wang Q.-L., Fan L.-Y., Zhang W., Cao C.-X.: *Anal. Chim. Acta* 580, 200 (2006).
67. Fan L., Liu L., Chen H., Chen X., Hu Z.: *J. Chromatogr., A* 1062, 133 (2005).
68. Li M., Fan L.-Y., Zhang W., Cao C.-X.: *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 2719 (2007).
69. Shih C.-M., Lin C.-H.: *Electrophoresis* 26, 3495 (2005).
70. Cao C.-X., He Y.-Z., Li M., Qian Y.-T., Gao M.-F., Ge L.-H., Zhou S.-L., Yang L., Qu Q.-S.: *Anal. Chem.* 74, 4167 (2002).
71. Cao C.-X., He Y.-Z., Li M., Qian Y.-T., Yang L., Qu Q.-S., Zhou S.-L., Chen W.-K.: *J. Chromatogr., A* 952, 39 (2002).
72. Lee R., Ptolemy A. S., Niewczas L., Britz-McKibbin P.: *Anal. Chem.* 79, 403 (2007).
73. Hsieh M.-M., Chang H.-T.: *Electrophoresis* 26, 187 (2005).
74. Yin X.-B.: *Electrophoresis* 25, 1837 (2004).
75. Jaafar J., Irwan Z., Ahamad R., Terabe S., Ikegami T., Tanaka N.: *J. Sep. Sci.* 30, 391 (2007).
76. Ptolemy A. S., Le Bihan M., Britz-McKibbin P.: *Electrophoresis* 26, 4206 (2005).
77. Yu L., Li S. F. Y.: *Electrophoresis* 26, 4360 (2005).
78. Horáková J., Petr J., Maier V., Tesařová E., Veis L., Armstrong D. W., Gaš B., Ševčík J.: *Electrophoresis* 28, 1540 (2007).
79. Horáková J., Petr J., Maier V., Znaležiona J., Staňová A., Marák J., Kaniánsky D., Ševčík J.: *J. Chromatogr., A* 1155, 193 (2007).
80. Petr J., Vítková K., Ranc V., Znaležiona J., Maier V., Knob R., Ševčík J.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 3940 (2008).

J. Petr, V. Maier, J. Znalezona, K. Vítková, V. Ranc, and J. Ševčík (*Department of Analytical Chemistry, Palacký University, Olomouc*): **On-line Preconcentration on pH Boundary – the Beauty of Capillary Electrophoresis**

The beauty of capillary electrophoresis is shown on preconcentration of some phenolics. The method is based

on the electrokinetic injection of phenolics into a sodium borate electrolyte (pH 9.5) at the pH boundary formed by sodium phosphate (pH 2.5) followed by mobilization and separation by replacing the injection vial with the vial containing micellar environment. This technique allows determination of nanomolar concentrations of phenolics.



SPECIALISTA PRODEJE A MARKETINGU

Náplň práce:

- Realizace jednotlivých obchodních případů
- Zajištění zákaznického servisu
- Marketing a prodej přiděleného portfolia výrobků
- Účast na tvorbě marketingové strategie společnosti
- Marketingové průzkumy, monitoring a vyhodnocování konkurenčních aktivit
- Udržování a posilování dobrého jména společnosti

Požadavky:

- VŠ vzdělání – chemie, biochemie, případně farmacie
- Angličtina – schopnost plynule hovořit, ostatní jazyky vítány (např. němčina, španělština)
- Schopnost práce s PC
- Min. 3 roky praxe v obchodu a marketingu, nejlépe v zahraniční společnosti
- Výborné komunikační dovednosti
- Flexibilita, ochota učit se novým věcem
- Týmový hráč
- Řidičský průkaz B
- Nástup ihned

Co nabízíme:

- Finanční ohodnocení odpovídající dosaženým výsledkům
- Odborné vzdělávání v rámci dynamického a vysoce motivovaného pracovního týmu
- Mobilní telefon
- Zázemí mezinárodní společnosti se sídlem v USA
- 5 týdnů dovolené

STANOVENÍ HYDROXYLOVÝCH A NITROXIDOVÝCH RADIKÁLŮ U DEPRESE A HYPERLIPIDÉMIE ELEKTRONOVOU PARAMAGNETICKOU REZONANCÍ

MIROSLAV ZEMAN^a, PAVEL STOPKA^c,
MAREK VECKA^a, ALEŠ ŽÁK^a, ALEXANDRA
PÍSAŘÍKOVÁ^a, ROMAN JIRÁK^b, BARBORA
STAŇKOVÁ^a, LUCIE VÁVROVÁ^a, JANA
KODYDKOVÁ^a, JANA KRÍŽOVÁ^c a JAROSLAV
MACÁŠEK^a

^a Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 4. interní klinika, ^b Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Psychiatrická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, U Nemocnice 2, 128 00 Praha 2, ^c Ústav anorganické chemie Akademie věd ČR v.v.i., 250 68 Řež u Prahy mirozem@seznam.cz

Došlo 15.9.08, přepracováno 9.2.09, přijato 12.3.09.

Klíčová slova: Oxidační stres, hyperlipidémie, deprese, EPR

Úvod

V klinické medicíně je dnes věnována velká pozornost pochodům spojeným s oxidačním stresem a působením reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS – reactive oxygen and nitrogen species). Mezi RONS patří jednak volné radikály, jednak sloučeniny, které snadno oxidují jiné látky, nebo se na radikály mění. Ke klinicky nejdůležitějším radikálům řadíme superoxidový anion $\cdot\text{O}_2^-$, oxid dusnatý, $\cdot\text{NO}$, nebo hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$. Mezi neradikálové reaktivní částice patří např. peroxid vodíku, H_2O_2 , kyselina chlorná (HOCl) a peroxyinitrit (ONOO^-) (cit. ¹⁻³).

RONS vznikají v průběhu metabolických pochodů u všech aerobních organismů; na jejich vzniku se účastní i vnější vlivy, jako je elektromagnetické záření, xenobiotika, toxiny či léky. Buňky a tkáň živých organismů jsou před poškozením těmito látkami chráněny antioxidantními ochrannými systémy (enzymovými i neenzymovými). Působení RONS hraje významnou roli při vzniku a rozvoji řady závažných onemocnění, jako jsou ateroskleróza a její komplikace, diabetes mellitus, arteriální hypertenze, neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc), psychiatrická onemocnění (schizofrenie, depresivní porucha) i zhoubné nádory^{2,4,5} a na straně druhé se tvorba volných radikálů s úspěchem využívá u některých kancerostatik, antivirových a antibakteriálních přípravků. V lidském organismu se však RONS účastní také fyziologických regulací, jako např. účast v procesech přenosu signálu, imunitní odpovědi, v regulaci

cévního tonusu a dalších⁶. Působení RONS v lidském organismu může poškozovat strukturu lipidů, přičemž dochází ke změnám složení biologických membrán a k ovlivnění funkce struktur s nimi spojených (funkce enzymů, iontových kanálů, přenosu signálu aj.). RONS poškozují také strukturu proteinů a DNA. Jsou poškozovány purinové a pyrimidinové báze i deoxyribosa. Oxidace deoxyribosy působí destrukci a přerušení řetězce DNA. Modifikace DNA vede k chybným párováním bází při replikaci DNA a ke změnám genetické informace s často fatálními důsledky pro organismus⁵.

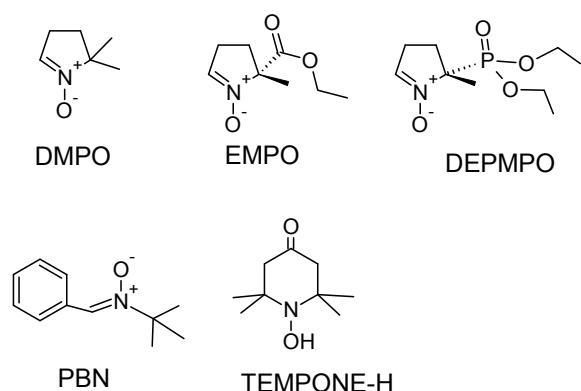
Proti patogennímu působení RONS působí v lidském organismu antioxidantní systém, zahrnující antioxidanty charakteru enzymů i antioxidanty neenzymové. Mezi enzymové antioxidanty patří např. superoxidodismutasa (SOD), katalasa (CAT), glutathion-peroxidasa (GPx), glutathion reduktasa (GR). Glutathion peroxidasa mění H_2O_2 na vodu za spoluúčasti glutathionu (GSH) jako dárce vodíku. Vznikající glutathion disulfid (GSSG) je přeměňován zpět na GSH působením GR, jejímž kofaktorem je NADPH. Mezi neenzymové antioxidanty patří vitaminy A, C a E, GSH, kyselina alfa-lipoová, dále karotenoidy, stopové prvky jako měď, zinek a selen, koenzym Q_{10} (Co Q_{10}) a kofaktory jako kyselina listová, a vitaminy B_1 , B_2 , B_6 a B_{12} , dále těž močovina i albumin. Hlavním intracelulárním antioxidantem je GSH, který působí jako přímý lapač radikálů a současně jako kosubstrát pro GPx (přehled působení antioxidantů viz cit. ⁷⁻⁹). Stav, spojený s nadměrnou tvorbou a/nebo nedostatečným odstraňováním RONS, resp. zvýšený poměr prooxidační k antioxidantní aktivitě, je označován pojmem oxidační stres (OS)¹⁰.

Pro sledování OS je možné zvolit několik přístupů¹¹: 1. měřit redoxní potenciály antioxidantních systémů, 2. kvantifikovat přítomné radikály ve vzorku, 3. sledovat přítomnost markerů oxidačního poškození systému a 4. měřit aktivitu antioxidantního systému. Jako nejlepší přímá metoda detekce volných radikálů je dostupná (vedle přístupů polarografických, HPLC nebo UV-VIS) elektronová paramagnetická rezonance (EPR), která dovoluje měřit přímo relativně stabilní radikály¹². Ve spojení s metodou spinového záchytu („spin-trapping“) je pak možné identifikovat a kvantifikovat i některé méně stabilní radikály, jako např. hydroxylový. Cílem této pilotní studie bylo stanovit koncentrace hydroxylového a nitroxidového radikálu v séru nemocných s depresivní poruchou (DP) s hyperlipidemiemi a u zdravých kontrolních osob metodou EPR.

Experimentální část

Metodika EPR

EPR spektroskopie je založena na sorpci mikrovlnného záření nepárovými elektrony za přítomnosti silných magnetických polí. Tím je umožněno studovat: a) volné radikály různých typů, např.: hydroxylové, superoxidové, nitroxidové radikály, b) paramagnetické komplexy (např. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} a další), c) excitované stavy (molekuly



Obr. 1. Činidla zachycující radikálové sloučeniny (spin trap činidla)

s vybuzeným elektronem). V případech, že se jedná o relativně stabilní radikály, je možné jejich přímé měření v plynném, kapalném i pevném stavu. U nestabilních radikálů s krátkou dobou života se používá metoda spinového záchytu („Spin Trapping“). Je to metoda chemické stabilizace radikálů, která prodlužuje dobu jejich života. Krátkodobě žijící radikály reagují s nitrososloučeninami nebo s nitrony a tím se převedou na stabilní radikály. Nejčastěji používané radikálové lapače jsou: 5,5'-dimethyl-1-pyrrolin-*N*-oxid (DMPO), 5-(diethoxyfosforyl)-5-methyl-1-pyrrolin-*N*-oxid (DEPMPO), 2-ethoxykarbonyl-2-methyl-1-pyrrolin-*N*-oxid (EMPO), *N*-*tert*-butyl- α -fenylnitron (PBN) a 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxopiperidin (TEMPONE-H) (viz obr. 1). Spektra EPR těchto aduktů s volnými radikály jsou pro určité druhy radikálů charakteristická. Metoda umožňuje zjistit druh radikálů, jejich koncentraci i časové změny.

Zkoumané vzorky zpravidla nejsou stabilní. Krev byla proto odebírána do zkumavky Vacutainer® obsahující draselnou sůl EDTA (koncentrace 1 mg ml⁻¹ krve), jež byla ihned uložena do ledové tříště. Po oddělení plazmy centrifugací (4 °C, 10 min, 1500 g) se odebralo 100 ml plazmy do kryozkumavek s napipetovaným činidlem zachycujícím radikály („spin trap“) (10 ml DMPO) a dále přechovávány při teplotách –80 °C, nebo při teplotě kapalného dusíku –196 °C pro transport. Vzorky jsou rozmraže-

ny, převedeny do ploché křemenné kyvety a ta je umístěna do rezonátoru (měřicí komůrka) EPR spektrometru. Poté je provedeno při teplotě 25 °C vlastní měření. Spektra jsou vyhodnocována pomocí PC a grafických programů, blíže viz též cit.¹³.

Soubory nemocných

V této pilotní studii jsme v době od června 2006 do dubna 2008 vyšetřili 3 skupiny postupně přicházejících osob.

1. Soubor 42 nemocných z ambulance Psychiatrické kliniky VFN a 1. LF UK Praha, u kterých byla diagnostikována depresivní porucha (DP) podle manuálu Americké psychiatrické společnosti (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4. vydání)¹⁴;
2. Soubor 60 dosud neléčených nemocných s dyslipidemiemi (koncentrace sérového LDL-cholesterolu $\geq 4,1$ mmol l⁻¹ a/nebo triacylglycerolu $\geq 1,7$ mmol l⁻¹ a/nebo koncentrace HDL-cholesterolu $\leq 1,0$ mmol l⁻¹ u mužů, resp. 1,3 mmol l⁻¹ u žen);
3. Soubor 49 zdravých dobrovolníků, dosud neléčených pro kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus, renální či jaterní onemocnění.

Ze studie byly vyloučeny osoby se známkami endokrinopatie a osoby požívající antioxidanty, antidepresiva, potravinové doplňky vícenenasycených mastných kyselin či ethylalkohol v dávce vyšší než 20 g denně. Byli také vyloučeni nemocní, kteří v uplynulých šesti měsících prodělali operační zákrok či infekční onemocnění. Základní charakteristiky sledovaných souborů jsou uvedeny v tab. I.

Klinická a základní biochemická vyšetření

U osob ve sledovaných souborech jsme vypočetli hmotnostní index („body mass index“ – BMI) podle rovnice BMI = hmotnost (kg)/výška (v m)². U všech zúčastněných jsme provedli základní biochemická a hematologická vyšetření, z nichž je uvedena v tab. I pouze koncentrace celkového cholesterolu (TC). Krev byla odebírána po celonočním lačnění do zkumavky Vacutainer® obsahující draselnou sůl EDTA (1 mg ml⁻¹ krve). Koncentrace TC byly stanovovány enzymovou metodou (CHOD/PAP, Test

Tabulka I
Základní charakteristiky sledovaných souborů

Parametr	HLP ^d (n = 60)	DP ^e (n = 42) ^b	KON ^f (n = 49)
Věk, roky	54,8 ± 10,7 ^a	61,0 ± 15,8	56,1 ± 14,5
Pohlaví, muži/ženy	35/25	7/35	19/30
BMI ^c , kg m ⁻²	29,9 ± 4,1	26,6 ± 4,7	25,3 ± 4,1
Celkový cholesterol, mmol l ⁻¹	6,24 ± 1,44	5,79 ± 1,45	5,47 ± 0,93

^a Průměr ± S.D.; ^b n = počet vyšetřených, ^c BMI – hmotnostní index, ^d HLP – hyperlipidémie, ^e DP – depresivní porucha, ^f KON – kontrolní skupina

Combination, Boehringer Mannheim). Pro statistické hodnocení byl použit software STATISTICA (Tulsa, OK, U.S.A., 2000).

Stanovení nitroxidových a hydroxylových radikálů v séru metodou EPR

Vzhledem k tomu, že většina těchto radikálů je velmi nestabilní, rozhodli jsme se použít metodu spinového zachytu za použití lapačů DMPO, případně PBN. Po vyhodnocení spektrálních parametrů zjištěných radikálů se zjistí dvojitou integrací 1. derivace EPR spekter relativní koncentrace studovaných radikálů a její změny v čase. Výsledné hodnoty se porovnávají se spektry standardů (Mn^{2+}/ZnS , příp. Cr^{3+}/MgO) o známém počtu spinů.

K záznamu spekter jsme používali Elexsys E-540 spektrometr od firmy Bruker (Bruker-Biospin, Rheinstetten, Německo), a magnetické pole na 1H NMR magnetometru s čítačem mikrovlnných frekvencí. Vlastní podmínky měření byly: výkon mikrovlnného pole 20 mW, modulační amplituda 0,1 mT, faktor zeslabení 20 dB, časová konstanta 0,5 s, rychlost záznamu 0,3 mT min⁻¹. Software pro záznam, zpracování a hodnocení naměřených spekter pocházel od firmy Bruker. Záznam 1. derivace spekter EPR byl počítačově zpracováván (program Origin, Origin-Lab Corporation, Northampton, MA, U.S.A.) a spektra byla interpretována za použití databázi z National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA. Paralelně byly měřeny kontrolní vzorky, t.j. slepé pokusy.

Pro zjištění časové stability vzorků byly proměřeny náhodně vybrané vzorky. Od okamžiku rozmrazení vzorků z kapalného dusíku, kde byly přechovávány a transportovány, byly vzorky měřeny do 5 min. Změřená spektra se neměnila po dobu 50 min, během dalších 30 min došlo k poklesu intenzity spekter o cca 10 až 12 %. Jedná se spíše o časovou stabilitu radikálů a jejich spekter. Kalibrace byla provedena pomocí firemních standardů Weak Pitch, Strong Pitch, (Bruker-Biospin), dále Mn^{2+}/ZnS a Cr^{3+}/MgO (Magnetech GmbH Berlin, Německo).

Koncentrace hydroxylových radikálů byla kalibrována pomocí srovnávacích měření, kdy jako zdroj přesného množství OH radikálu byl použit peroxid vodíku o známé koncentraci a množství. Koncentrace nitroxidových radikálů byla kalibrována pomocí stabilního radikálu Tempolu (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidinu, Sigma-Aldrich). V oblasti měřených množství volných radikálů (OH, NO)

ve vzorcích byla závislost intenzity signálů na množství/koncentraci zcela lineární, nad tuto hranici dochází k negativním odchylkám od linearity. Přesnost metody byla testována opakováním kompletního měření, tj. pipetování, ředění, ladění spektrometru a měření třikrát, v některých případech až pětkrát. Mez stanovitelnosti byla brána jako hodnota intenzity signálu, která byla dvakrát vyšší než poměr amplitudy/intenzity šumu (při akumulaci spekter třicetkrát vyšší) při uvedených nastavených hodnotách. Akumulace signálu byla vhodná pro měření hydroxylových radikálů, pokud byla koncentrace příliš nízká.

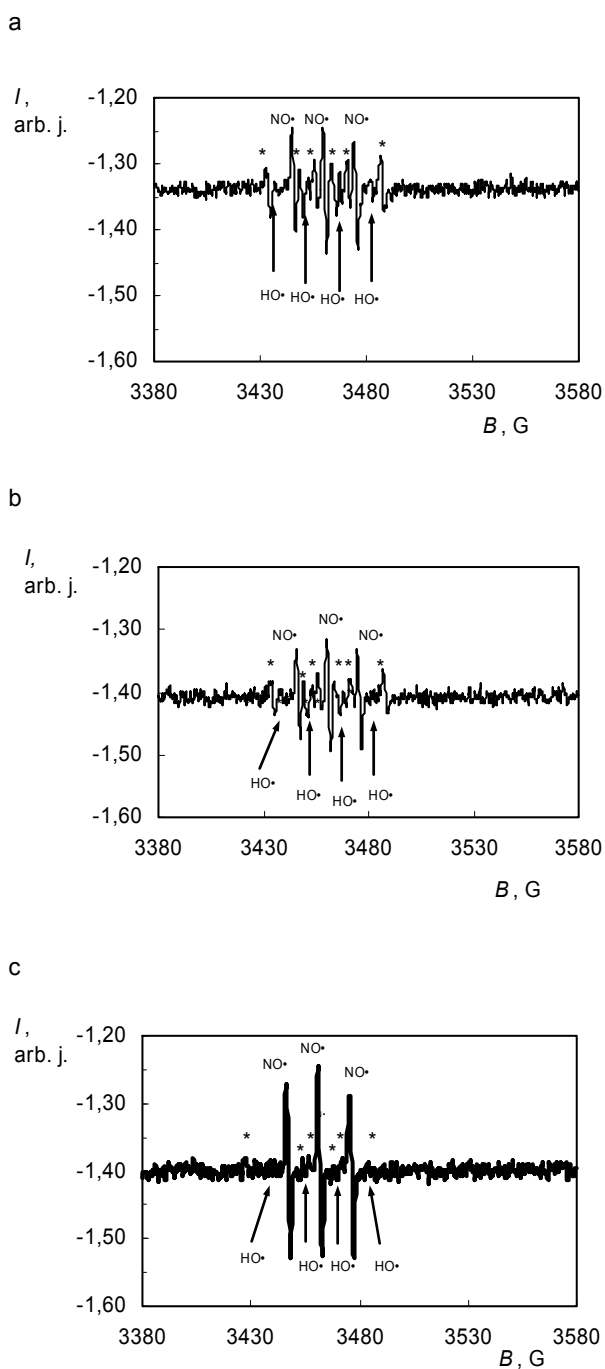
Výsledky a diskuse

Získané výsledky měření nitroxidových a hydroxylových radikálů, měřených metodou EPR jsou uvedeny v tab. II. Osoby ve skupině pacientů s depresivní poruchou (DP) měli statisticky významně vyšší koncentrace nitroxidových radikálů ve srovnání s hyperlipidemickými osobami ($P < 0,05$), rozdíl od kontrolní skupiny nedosáhl statistické významnosti. Ve skupině DP i hyperlipidémie jsme ve srovnání s kontrolní skupinou zjistili vyšší koncentrace OH radikálů, rozdíl však opět vzhledem k velikosti rozptylu nedosáhl statistické významnosti ($P = 0,131$ resp. $P = 0,110$). Ukázky získaných spekter jsou uvedeny na obr. 2a–c. U hypercholesterolemie i hypertriacylglycerolemie je zjišťována zvýšená tvorba $\cdot O_2^-$ (cit.^{15–17}) zřejmě v důsledku zvýšené aktivity xantinoxidasy, (enzymu, redukujícího kyslík na $\cdot O_2^-$) a NAD(P)H oxidasy (enzym, vázaný na buněčnou membránu, který používá elektrony, pocházející z NADPH k redukcí molekulárního kyslíku na $\cdot O_2^-$) (cit.^{18,19}). Léčba hypercholesterolemie statiny (inhibitory klíčového enzymu syntézy cholesterolu, HMG-CoA reduktasy), je provázena snížením úrovně oxidačního stresu (OS). Působení statinů²⁰ vede mimo jiné k inhibici aktivity enzymu NAD(P)H oxidasy a k poklesu tvorby angiotenzinogenu II, s následným snížením tvorby $\cdot O_2^-$. Základními farmaky, užívanými k léčbě hypertriacylglycerolemie^{21,22} jsou fibráty (deriváty kyseliny fibrové), jejichž podávání rovněž vede k poklesu OS. Fibráty, podobně jako statiny, ovlivňují více metabolických dějů; mimo jiné aktivují jaderný transkripční faktor PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) α (cit.²³) s následnou indukci exprese a aktivace antioxidantních enzymů SOD a GPx a inhibicí indukce enzymu cyklooxygenasy 2

Tabulka II
Nitroxidové a hydroxylové radikály, měřené metodou EPR v plazmě

Parametr ^{f,g}	HLP ^c (n = 60)	DP ^d (n = 42)	KON ^e (n = 49)
NOx, $\mu\text{mol l}^{-1}$	2,06 ± 0,90 ^a	2,80 ± 1,55 ^b	2,38 ± 1,49
$\cdot\text{OH}$, $\mu\text{mol l}^{-1}$	0,83 ± 0,53	0,82 ± 0,53	0,59 ± 0,26

^a Průměr ± S.D., n = počet vyšetřených, ^b $P < 0,05$; rozdíl mezi skupinou DP a KON; analýza rozptylu, ^c HLP – hyperlipidémie, ^d DP – depresivní porucha, ^e KON – kontrolní skupina, ^f NOx – nitroxidový radikál, ^g $\cdot\text{OH}$ – hydroxylový radikál



Obr. 2. Elektronová paramagnetická spektra; a) vzorek osoby z kontrolní skupiny, b) vzorek osoby ze skupiny hyperlipidémie, c) vzorek osoby ze skupiny depresí; $\text{NO}\cdot$ – nitroxidový radikál (triplet), $\text{HO}\cdot$ – hydroxylový radikál (kvartet), * – „six lines“ signál (sextet), zřejmě struktura konjugovaných dvojných vazeb

(COX-2) (cit.²⁴), který katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandin G_2 , který je následně redukován na prostaglandin H_2 za vzniku $\cdot\text{O}_2^-$.

Etiopatogeneze depresivní poruchy (DP) je složitá. Mezi jinými faktory zde hrají roli chronický stres se zvýšením aktivity hypothalamus-hypofýza-nadledvina a chronický zánětlivý proces. Recidivující chronický stres působí v mozku pokles hladiny tkáňových antioxidantů a zvýšení lipoperoxidace²⁵. Chronický subklinický zánět, často přítomný u pacientů s depresivní poruchou, vede rovněž ke zvýšené tvorbě RONS²⁶. Závažnost symptomů DP korelovala s hladinou lipoperoxidů v séru²⁷. U nemocných s DP byly popsány zvýšené hladiny malondialdehydu (výsledný produkt oxidace polynenasycených mastných kyselin v důsledku působení RONS), aktivita SOD a pokles koncentrace kyseliny askorbové, které se po léčbě antidepresivy vracely k normě, současně s ústupem deprese²⁸. Oxidační stres může zřejmě vést k poklesu hladiny mozkového neurotrofického faktoru BDNF (brain derived neurotrophic factor). BDNF je protein, který usnadňuje růst neuronů, neurogenezi a moduluje neurotransmisí²⁹. V posledních letech byly publikovány práce, které ukazují na význam OS i v patogeneze dalších neuropsychiatrických onemocnění (schizofrenie, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba a další). Mozek je totiž vůči OS vysoce citlivý, protože využívá 20 % kyslíku spotřebovaného organismem³⁰ a také obsahuje velké množství vícenasycených mastných kyselin i železa; v mozku je současně nízká aktivita antioxidantních enzymů.

Význam nálezů zvýšených koncentrací nitroxidového radikálu u depresivních osob v naší studii nelze zatím přesně posoudit. Za fyziologických okolností vzniká $\cdot\text{NO}$ působením syntáz oxidu dusnatého (NOS) oxidací L-argininu. Významně se podílí na regulaci cévního tonusu, má protizánětlivé účinky, inhibuje agregaci krevních destiček a adhezi leukocytů i destiček na endotel, reguluje proliferaci a diferenciaci buněk cévní stěny a v mozkové tkáni působí jako neuropřenašeč. V podmínkách OS za současně zvýšené tvorby $\cdot\text{O}_2^-$ vzniká z $\cdot\text{NO}$ toxický peroxyinitrit (ONOO^-) s řadou nepříznivých účinků. Peroxyinitrit reaguje s CO_2 a vytváří jednoelektronové oxidanty $\cdot\text{NO}_2$ a $\text{CO}_3^{\cdot-}$, které oxidací aminokyseliny tyrosinu vedou ke vzniku tyrosylového radikálu Tyr \cdot a pak k tvorbě 3-nitrotyrosinu, 3- NO_2 -Tyr (cit.³¹). Z ONOO^- může také vzniknout $\cdot\text{OH}$, působící peroxidací lipidů, mutace DNA, jejich fragmentaci nebo modifikace proteinů. Radikál $\cdot\text{NO}$ může reagovat s peroxylovým radikálem ($\text{ROO}\cdot$), hydroxylovým radikálem ($\cdot\text{OH}$) nebo NO^- za vzniku alkyl peroxyinitritu (ROONO), kyseliny dusité (HNO_2) nebo oxidu dusného (N_2O).

Závěrem lze říci, že v této pilotní studii jsme prokázali možnost přímého měření koncentrace hydroxylového a nitroxidového radikálu v lidském séru metodou EPR. Zjistili jsme zvýšení koncentrací nitroxidového radikálu v séru nemocných s depresí, což podporuje hypotézu o působení oxidačního stresu v patogeneze deprese, která je v současné době intenzivně studována. EPR metoda se používá většinou pouze v základním výzkumu orientovaném na chemii, nicméně výsledky práce ukazují na možnost jejího využití i v oblastech klinického výzkumu one-

mocnění, spojených s oxidačním stresem – ateroskleróza, neurodegenerativní onemocnění, diabetes mellitus a další.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR, č. NR 8806-3.

Seznam zkratk

DP	depresivní porucha
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-koenzym A
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
OS	oxidační stres
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku

LITERATURA

- Halliwell B., Whiteman M.: *Br. J. Pharmacol.* 142, 231 (2004).
- Štípek S. (ed.): *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada publishing, Praha 2000.
- Racek J., Holeček V.: *Chem. Listy* 93,11A – 780 (1999).
- McCord J. M.: *Am. J. Med.* 108, 652 (2000).
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M. T. D., Mazura M., Telser J.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44 (2007).
- Dröge W.: *Physiol. Rev.* 82, 47 (2002).
- Hensley K., Robinson K. A., Gabbita S. P., Salsman S., Floyd R. A.: *Free Radical Biol. Med.* 28, 1456 (2000).
- Hodgson J. M., Watts G. F.: *Biofactors* 18, 129 (2003).
- Heller R., Unbehaun A., Schellenberg B., Mayer B., Werner-Felmayer G., Werner E. R.: *J. Biol. Chem.* 276, 40 (2001).
- Sies H.: *Exp. Physiol.* 82, 291 (1997).
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (ed.): *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ. Press, New York 1999.
- Weil J. A., Bolton J. R., Wertz J. E. (ed.): *Electron Paramagnetic Resonance, Elementary Theory and Practical Applications*. J. Wiley and Sons, New York 1994.
- Rokyta R., Stopka P., Holeček V., Křikava K., Pekárková I.: *Neuroendocrinol. Lett.* 25, 252 (2004).
- American Psychiatric Association.: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4. vyd. American Psychiatric Association, Washington, D.C 1994.
- Ohara Y., Peterson T. E., Harrison D. G.: *J. Clin. Invest.* 6, 2546 (1993).
- Guzik T. J., West N. E., Black E., McDonald D., Ratanunga C., Pillai R., Channon K. M.: *Circ. Res.* 86, E85 (2000).
- Kusterer K., Pohl T., Fortmeyer H. P., März W., Scharnagl H., Oldenburg A., Angermüller S., Fleming I., Usadel K. H., Busse R.: *Cardiovasc. Res.* 42, 783 (1999).
- Harrison R.: *Drug. Metab. Rev.* 36, 363 (2004).
- Madamanchi N. R., Vendrov A., Runge M. S.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 39 (2005).
- Jasińska M., Owczarek J., Orszulak-Michalak D.: *Pharmacol. Rep.* 59, 483 (2007).
- Tkáč I., Molčányiová A., Javorský M., Kozárová M.: *Pharmacol. Res.* 53, 261 (2006).
- Zeman M., Žák A., Vecka M., Tvrzická E., Romaniv S., Konárková M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 336 (2002).
- Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J. C., Staels B.: *J. Clin. Invest.* 116, 571 (2006).
- Bordet R., T. Ouk T., Petrault O., Gelé P., Gautier S., Laprais M., Deplanque D., Duriez P., Staels B., Fruchart J. C., Bastide M.: *Biochem. Soc. Transact.* 34, 1341 (2006).
- Hibbeln J. R., Salem N., Jr.: *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1 (1995).
- Maziere C., Auclair M., Maziere J. C.: *FEBS Lett.* 338, 43 (1994).
- Tsuboi H., Shimoi K., Kinae N., Oguni I., Hori R., Kobayashi F.: *J. Psychosom. Res.* 56, 53 (2004).
- Khanzode S. D., Dakhale G. N., Khanzode S. S., Saoji A., Palasodkar R.: *Redox Rep.* 8, 365 (2003).
- Wu A., Ying Z., Gomez-Pinilla F.: *Eur. J. Neuroscience* 19, 1699 (2004).
- Juurlink B. H., Paterson P. G.: *J. Spinal Cord Med.* 21, 309 (1998).
- Peluffo G., Radi R.: *Cardiovasc. Res.* 75, 291 (2007).

M. Zeman^a, P. Stopka^c, M. Vecka^a, A. Žák^a, A. Písaříková^a, R. Jiráček^b, B. Staňková^a, L. Vávrová^a, J. Kodydková^a, J. Křížová^c, and J. Macáček^a
^aDepartment of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, ^bPsychiatric Clinic, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, ^cInstitute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež): **Electron Spin Resonance Determination of Hydroxyl and Nitroxide Radicals in Depressions and Hyperlipidemia**

Increasing attention has been paid to clinical manifestation of oxidative stress and reactive oxygen and nitrogen species (RONS), e.g. in atherosclerosis, diabetes mellitus, hyperlipidemia, neurodegenerative and psychiatric diseases. The most clinically significant RONS are free radicals (superoxide anion, hydroxyl and nitroxide radicals) and non-radical species (peroxynitrite, hydrogen peroxide). The aim of this study was to investigate by EPR the concentrations of hydroxyl and nitroxide radicals in blood serum of patients with hyperlipidemia and with depressions and to compare them with healthy persons. Nitroxide radical concentrations were significantly higher in the depressive patients compared with controls. The clinical significance of this finding is not quite clear, but it supports the hypothesis on the participation of oxidative stress in pathogenesis of depressive disorders.

SEPARACE NĚKTERÝCH LOKÁLNÍCH ANESTETIK KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU ZA PŘÍTOMNOSTI POLYETHYLENGLYKOLU

PAVEL ADAMOVSÝ a ZDENĚK STRÁNSKÝ

*Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc
padamovsky@svuol.cz, stransky@prfnw.upol.cz*

Došlo 25.7.07, přepracováno 10.4.08, přijato 18.5.08.

Klíčová slova: CZE separace, lokální anestetika, polyethylenglykol

Úvod

Poly(ethylenglykol) (PEG) s vysokou molekulovou hmotností je silný selektor při separaci organických sloučenin, stejně tak jako anorganických iontů. Byly postulovány čtyři základní pochody při separaci v jeho přítomnosti¹:

1. kationizace PEG a tvorba komplexu s anorganickými nebo organickými kationty,
2. distribuce mezi objemnou vodnou fází a PEG pseudofází,
3. vodíková vazba PEG s H-donory,
4. síťový efekt vysokomolekulárního PEG nebo neiontových tenzidů.

První efekt – kationizace a tvorba komplexů podobných crownovým komplexům – se nejvýrazněji uplatňují při separaci kationtů. Tyto pochody byly velmi úspěšně použity při dělení anorganických kationtů izotachoforézou (ITP)² nebo CZE^{3–5}. Vliv PEG je dán uspořádáním PEG řetězce kolem kationtu, podobně jako u crownových komplexů⁶. Tvorba komplexu je založena na principu „kationizace“ etherových atomů kyslíků v polyethylenovém řetězci, jež je již dlouho známa⁷. Tyto produkty s proměnlivou stechiometrií bývají označovány jako pseudocrownové komplexy⁸.

Řetězec poly(ethylenglykolu) tvoří smyčky kolem kationtu kovu podle jeho velikosti⁹ a stabilita pseudocrownových komplexů koresponduje s velikostí náboje, symetrií a rozložením náboje na povrchu kationtu. Stabilita pseudocrownových komplexů organických kationtů je obecně menší, větší je u kationtů se symetricky delokalizovaným nábojem v důsledku mezomerního efektu. Proto např. separační pořadí lididinu a chinolinu může být změněno rostoucí koncentrací PEG v základním elektrolytu (BGE)^{10,11}.

Rozdělení mezi vodu a pseudofázi PEG je velmi účin-

ný jev při separaci velkých molekul. Jako známý příklad může být uvedena separace motilinů lišících se pouze v jednom aminokyselinovém zbytku¹². Zde hraje důležitou roli velikost a hydrofilně-lipofilní rovnováha.

Třetí efekt, vodíková vazba s H-donory, může být využit spíše při separaci kyselých látek a byl aplikován např. pro rozlišení chlorfenolů izotachoforézou¹³ nebo separaci derivátů benzoové kyseliny CZE¹⁴.

Konečně síťový efekt umožňuje separaci polyaniontů včetně oligonukleotidů¹⁵; PEG se přitom chová jako gelová fáze.

Tento článek demonstuje užitečnost PEG při rozlišování relativně velkých molekul – lokálních anestetik, které jsou rozdílné struktury nejen chemickým typem (estery, amidy, karbamáty), ale také okolím protonizovaného dusíku. Pouze první a druhý separační efekt je navržen pro studované sloučeniny, tedy tvorba komplexu a distribuce mezi vodou a PEG pseudofází.

Obě metody, ITP a CZE, byly použity při kontrole farmaceutických preparátů obsahujících lokální anestetika^{16,17}, při určení jejich pohyblivosti^{18,19}, při jejich separaci v modelové směsi²⁰, při stanovení lokálních anestetik a jejich metabolitů v krevní plazmě nebo moči^{21,22} a při separaci enantiomerů za přítomnosti cyklodextrinů²³.

Experimentální část

Chemikálie

Kyselina fosforečná a PEG ($M_r = 2000$) byly analytické čistoty (E. Merck, Darmstadt, Německo), hydroxid sodný a oktan-1-ol rovněž (Lachema, Brno, ČR). Lokální anestetika – amylokain, bupivakain, diperodon, β -eukain, fomokain, kokain, leucinokain, lidokain, mesokain (trimekain), prokain, psikain, tetrakain a tropakokain byly standardní vzorky získané ze Státního ústavu pro kontrolu léčiv, Praha.

Jako základní elektrolyt sloužil 0,05 M fosfátový pufr o pH 2,5. Elektrolyty s 12,5, 25, 30 a 33 hm.% PEG 2000 byly připraveny smícháním 0,2 M fosfátového pufru s deionizovaným 50% vodným roztokem PEG 2000 a deionizovanou vodou. Koncentrace fosfátu byla konstantní (0,05 mol l⁻¹). Roztok PEG (50%) byl deionizován vsádkově směsným ionexem, jak bylo popsáno dříve¹⁰. Zásobní roztoky lokálních anestetik o koncentraci 0,02 mol l⁻¹ byly připraveny z jejich hydrochloridů (leucinokain byl methylsulfát) a pak byly dohromady smíchány na výslednou koncentraci anestetika 5·10⁻⁴ mol l⁻¹. Připravená směs lokálních anestetik byla dávkována pro modelovou separaci.

Přístroje

Byl použit systém SpectraPHORESIS 100 s rychle skenujícím UV-VIS detektorem. Jako optimální byla zvolena vlnová délka 230 nm. Separace byly provedeny v křemenné kapiláře (bez pokrytí) 72 cm × 75 μ m s efek-

tivní délkou 45 cm. Před každou sadou měření byla kapilára promývána vodou, 0,1 M hydroxidem sodným, vodou a BGE (vždy 5 min). Před následující analýzou byla kapilára kondicionována 10 min základním elektrolytem pod separačním napětím a promyta vodou a základním elektrolytem (vždy 5 min). Konstantní napětí během měření bylo 25 nebo 30 kV, dávkování bylo prováděno vakuem po dobu 0,5 s. Analyty byly identifikovány metodou standardních přídavek a srovnáním UV spekter. Měření pH bylo provedeno skleněnou elektrodou kalibrovanou vodnými roztoky pufrů s použitím pH metru Pracitronic MV 870 (Dresden, Německo). Voda byla deionizována na zařízení ELGA (Buchs, UK). Distribuční konstanty byly měřeny spektrofotometricky v UV oblasti spektrofotometrem Philips PU 8750 (Philips, Nizozemí).

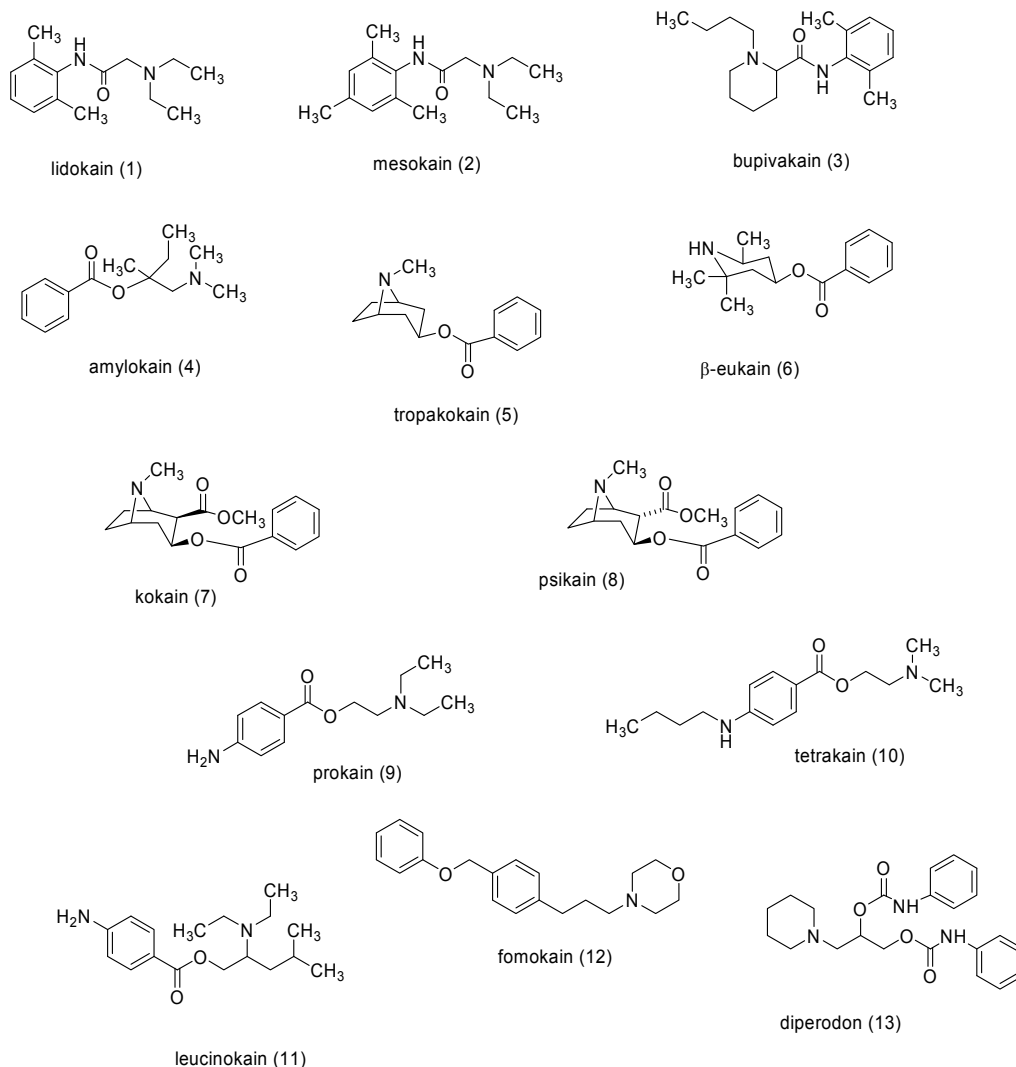
Měření rozdělovacích konstant

Přibližně $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ roztok hydrochloridu anestetika ve fosfátovém pufru o pH 2,5 byl extrahován stejným objemem oktan-1-olu. Absorbance vodní vrstvy byla měřena při 230 nm před a po extrakci. Pro estery 4-amino-benzoových kyselin (prokain, tetrakain, leucinokain) byla absorbance měřena v intervalu 290 až 310 nm. Distribuční konstanta byla počítána podle rovnice $K_D = c_{\text{okt}}/c_{\text{voda}}$.

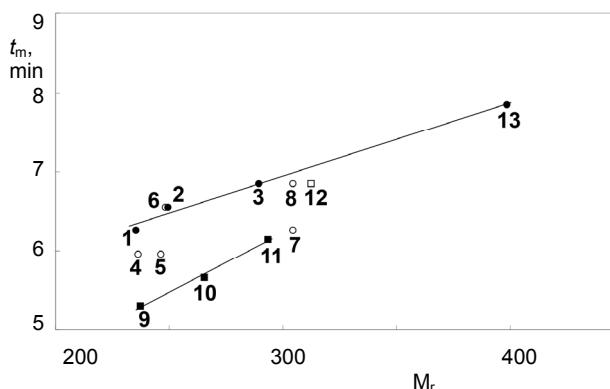
Výsledky a diskuse

Separace vybrané řady lokálních anestetik může být ovlivněna:

- strukturou analytu (hydrofobností),



Obr. 1. Struktury lokálních anestetik



Obr. 2. Závislost migračního času na relativní molekulové hmotnosti dělených látek; migrační čas t_m byl měřen v 0,05 M fosfátovém pufru o pH 2,5. Napětí 25 kV, UV detekce při 230 nm. 1 – lidokain; 2 – mesokain; 3 – bupivakain; 4 – amylokain; 5 – tropakokain; 6 – β -eukain; 7 – kokain; 8 – psikain; 9 – prokain; 10 – tetrakain; 11 – leucinokain; 12 – fomokain; 13 – dipiperodon. ● amidy, ○ estery benzoové kyseliny, ■ estery 4-aminobenzoové kyseliny, □ ethery

- molekulovou hmotností,
- stupněm disociace (protonizací – bazicitou),
- podmínkami separace (pH, protiiontem, teplotou, napětím)

a v přítomnosti PEG dále:

- tvorbou pseudocrownových komplexů,
- hydrofobními interakcemi mezi analytem a PEG pseudofází,
- koncentrací PEG, která ovlivňuje čtyři uvedené efekty.

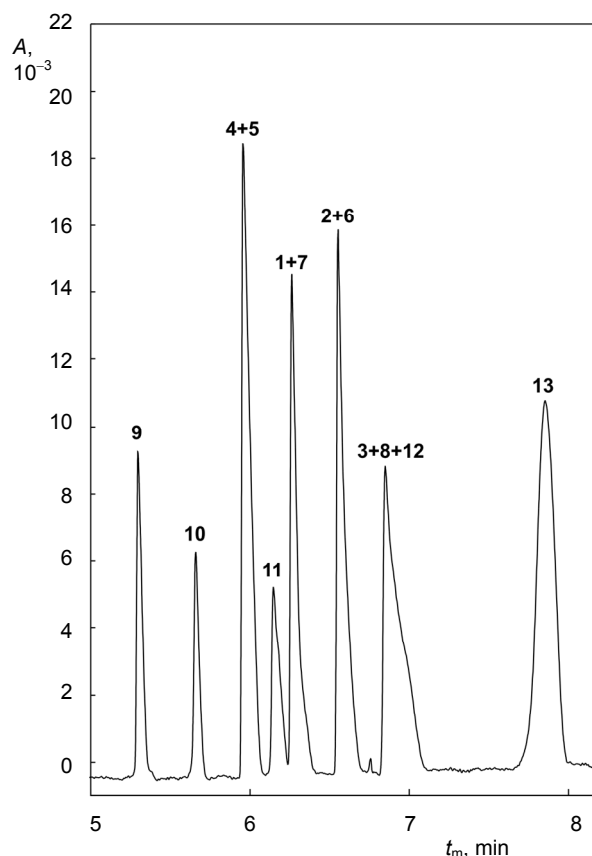
Struktura třinácti lokálních anestetik je zobrazena na obr. 1. Sloučeniny 1, 2 a 3 jsou amidy, sloučeniny 4–8 estery kyseliny benzoové. Látky 9–11 jsou estery 4-aminobenzoové kyseliny. Látka 12 je ether a 13 je karbamát.

Pro běžné organické molekuly s podobnou strukturou můžeme použít jednoduchý vztah mezi pohyblivostí a molekulovou hmotností²⁴

$$\mu_i = \frac{a \cdot z_i}{M_r} + b \quad (1)$$

kte z_i je efektivní nábojové číslo, M_r je relativní molekulová hmotnost, a , b jsou empirické konstanty. Elektroosmotický tok (EOF) byl zanedbatelný při pH 2,5 v základním elektrolytu bez PEG. Migrační čas je tedy přímo úměrný molekulové hmotnosti separovaných úplně protonizovaných bází (nebo úplně disociovaných kyselin). Na obr. 2 je zobrazen vztah mezi M_r a migračním časem t_m pro jednotlivé strukturální typy v pufru o pH 2,5 bez přídavku PEG.

Z tohoto obrázku je patrné, že amidy (včetně karbamátu) a estery 4-aminobenzoové kyseliny splňují rovnici (1), ale estery kyseliny benzoové nikoliv. Rozpor mezi oběma stereoisomery kokainu a psikainu je velice význam-



Obr. 3. Separace lokálních anestetik v pufru bez přídavku PEG; 0,05 M fosfátový pufr; koncentrace anestetika $5 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} . Separací napětí 25 kV, UV detekce při 230 nm

ný, tvorba kruhu s bazickým dusíkem je příčinou neregulárnosti v chování těchto esterů. Pohyblivosti 4-aminobenzoátů 9, 10 a 11 jsou značně vyšší než ostatní. Tento fakt je evidentně způsoben dvoustupňovou protonizací obou bazických dusíků. Z rovnice (1) lze snadno spočítat, že stupeň protonizace 4-aminobenzoátů leží mezi 1,15 a 1,20, za předpokladu, že $z_i = 1$ pro ostatní lokální anestetika. Celková disociace (protonizace) alifatických nebo alicyklických dusíků vyplývá z jejich disociačních konstant, které jsou uvedeny v tabulce I společně s dalšími významnými konstantami.

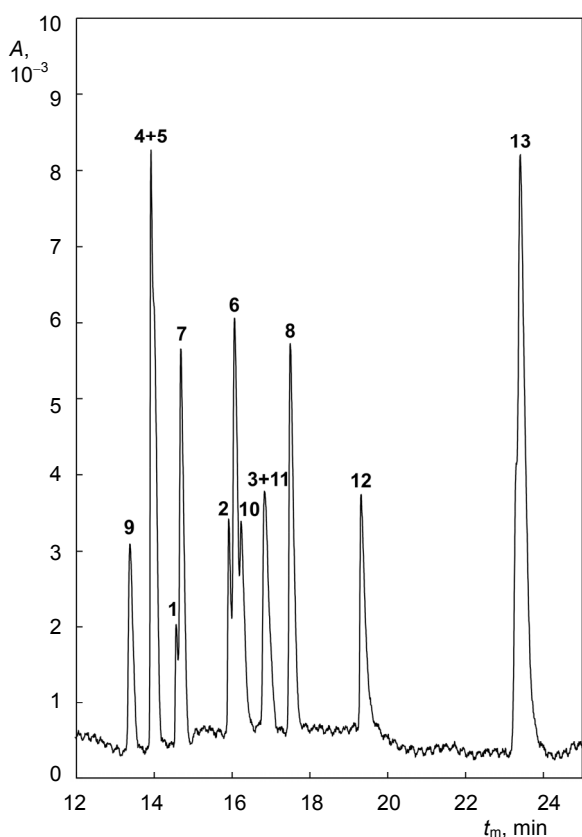
Z tab. I a obr. 3 je zřejmé, že v kyselém pufru bez aditiv existují některé neseparované páry (amylokain–tropakokain; lidokain–kokain; mesokain– β -eukain) a jedna neseparovaná trojice (bupivakain–psikain–fomokain). Separace v zásaditém pufru není možná kvůli srážení některých slabých bází při pH mezi jejich konstantami kyselosti (pH 7–9). Separace v oblasti pH od 2,5 do 5 nezlepšovala účinnost, navíc nad pH 4 vystupuje významná role EOF. Proto byl testován poly(ethylenglykol) jako aditivum jen při pH 2,5.

Rostoucí koncentrace PEG umožňuje separovat

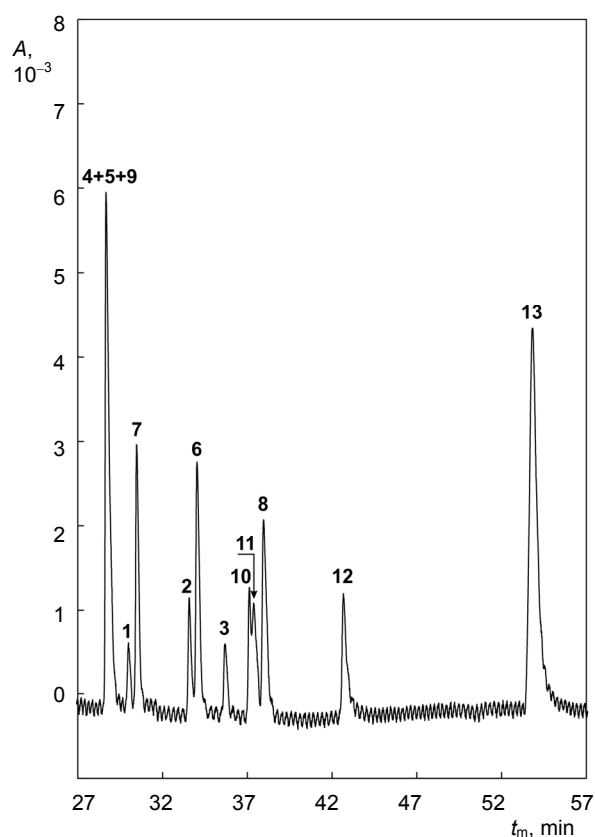
Tabulka I
Základní vlastnosti lokálních anestetik

Č.	Název sloučeniny	M_r^a	$pK_a^{[18]}$	K_D^b	$u_i^c [10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}]$
1	lidokain	235,3	7,85	0,08	35,9
2	mesokain	249,4	7,95	0,14	34,4
3	bupivakain	289,4	8,19	0,21	32,8
4	amylokain	236,3	7,96	0,08	37,8
5	tropakokain	246,3	9,36	0,02	37,8
6	β -eukain	248,3	9,50	0,14	34,4
7	kokain	304,4	8,69	0,02	35,9
8	psikain	304,4	8,54	0,45	32,8
9	prokain	237,3	9,01 (pK_1)	® 0	42,5
10	tetrakain	265,4	8,29 (pK_1)	0,20	39,8
11	leucinokain	293,4	9,21 (pK_1)	0,08	36,6
12	fomokain	312,4	-	0,74	32,8
13	diperodon	398,5	6,97	3,42	28,6

^a Relativní molekulová hmotnost protonizované sloučeniny, ^b distribuční (rozdělovací) koeficient mezi oktán-1-olem a 0,05 M fosfátovým pufrům pH 2,5, ^c mobilita ve fosfátovém pufru pH 2,5 bez přídavku PEG



Obr. 4. Separace lokálních anestetik v pufru s 12,5 % PEG; 0,05 M fosfátový pufr obsahující 12,5 % PEG 2000. Ostatní viz obr. 3



Obr. 5. Separace lokálních anestetik v pufru s 25 % PEG; 0,05 M fosfátový pufr obsahující 25 % PEG 2000. Ostatní viz obr. 3

všechny kritické páry (obr. 4–6). Nejhůře separovatelný pár amylokain–tropakokain vyžaduje koncentraci PEG vyšší než 30 %.

Jak bylo uvedeno výše, rostoucí koncentrace aditiva může podporovat tvorbu komplexu, hydrofobní interakce a rovněž měnit stupeň protonizace. Efekt tvorby pseudocrownových komplexů lze ilustrovat na migraci velice podobných molekul, např. homologů s blízkou polaritou. Takovým párem derivátů je lidokain a mesokain. Účinek zvýšení koncentrace PEG na rozlišení jmenovaného páru a všech kritických párů je zobrazen na obr. 7. Rostoucí rozlišení páru lidokain–mesokain naznačuje, že tvorba pseudocrownových komplexů hraje nezanedbatelnou roli v separačním mechanismu. Zároveň s touto možností hydrofobnost mesokainu roste směrem k lidokainu; vyšší rozpustnost v PEG pseudofázi musí rovněž zvyšovat rozlišení.

K určení, zda se uplatňuje hydrofobní efekt, byla měřena distribuční konstanta mezi oktan-1-olem a vodným roztokem pufru. Analyty byly separovány jako kationty, ale soli objemných iontů se přitom mohou chovat jako iontový pár rozpustný v organické poly(ethylenglykolové) pseudofázi.

Ze zkušenosti ze soudních analýz je známo, že hydrochloridy objemnýchází léčiv jsou částečně extrahova-

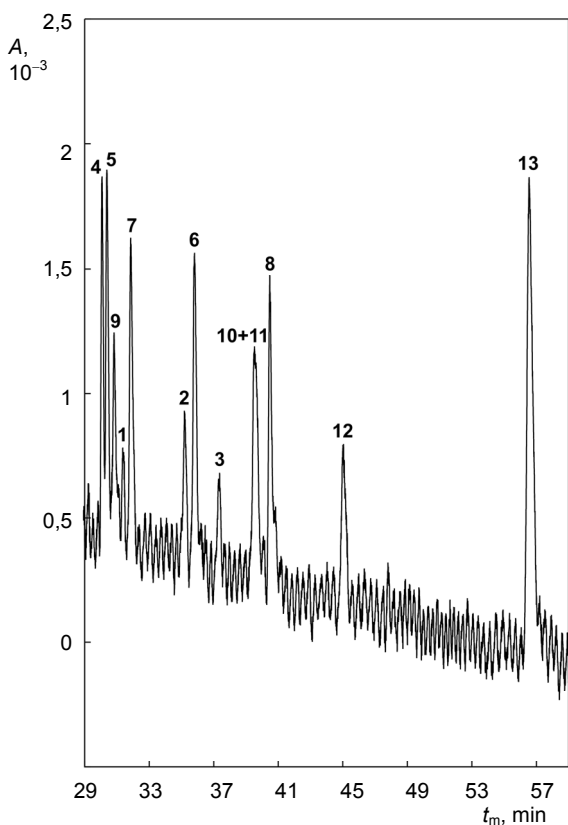
telné do organických rozpouštědel v pořadí jejich hydrofobnosti. Z naměřených rozdělovacích konstant (tab. I) je vidět, že tři hydrochloridy jsou značně extrahovány do oktan-1-olové fáze, a to diperon, fomokain a psikain. Hydrofobní interakce s PEG pseudofází je charakterizována rozdílným prodloužením migračních časů s rostoucí koncentrací PEG. To je v souladu s rychle rostoucím poměrem migračního času mezi základním elektrolytem s přísadkou a bez přísadky PEG (tab. II).

Diperon, fomokain a psikain migrují nejpomaleji ve všech elektrolytických systémech a diperon jako látka s největší distribuční konstantou se vyznačuje maximálním přírůstkem poměru migračních časů. Relativní hydrofobnost může být vyjádřena porovnáním migračních časů s migračním časem nejhydrofobnější sloučeniny – diperonu. Rozdělení trojice bupivakain–fomokain–psikain (obr. 3) je umožněno hydrofobními interakcemi s PEG pseudofází, jak je zřejmé z obr. 8. Největší pokles reprezentuje nejnižší hydrofobnost.

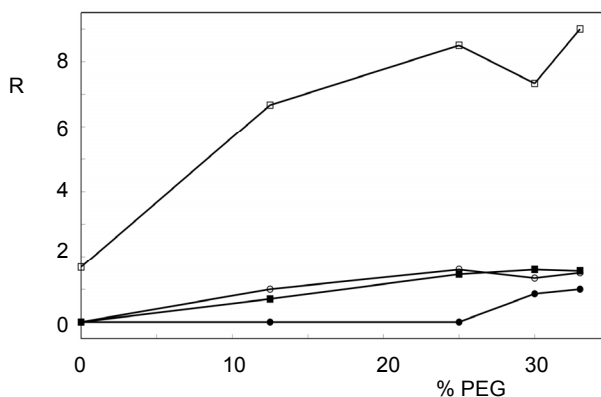
Skupina esterů 4-aminobenzoové kyseliny vykazuje vysoký poměr migračních časů. Přírůstek migračního času je srovnatelný s fomokainem nebo diperonem. Tento efekt není výsledkem nepolárnosti nebo hydrofobnosti, ale je způsoben potlačením disociace (protonizace). Organické rozpouštědlo a přísadka organické pseudofáze oslabuje, jak známo, kyseliny i báze a protonizace do druhého stupně vůbec neprobíhá.

Závěr

Rozdíly v migračních časech organickýchází, jako jsou lokální anestetika, mohou být využity k identifikaci individuů nebo složek ve směsi. Ve vybrané sadě 13 lokálních anestetik bylo dosaženo dokonalé separace využitím tří systémů – vodný roztok pufru, pufr s 25 % a s 33 % PEG 2000. Kvůli vysoké viskozitě, dlouhému času analý-



Obr. 6. Separace lokálních anestetik v pufru s 33 % PEG; 0,05 M fosfátový pufr obsahující 33 % PEG 2000; koncentrace anestetika $5 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} ; separační napětí 30 kV, UV detekce při 230 nm

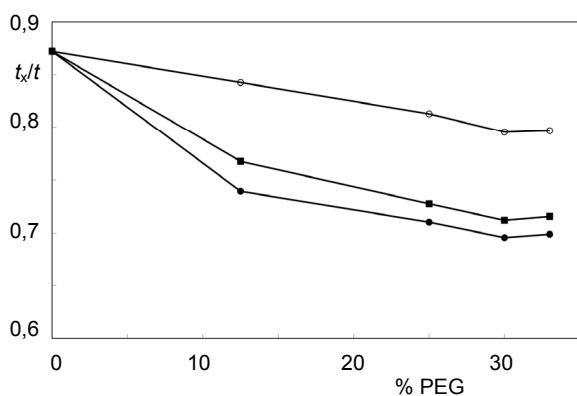


Obr. 7. Vliv rostoucí koncentrace PEG na rozlišení lokálních anestetik; ● amylokain + tropakokain, ○ lidokain + kokain, ■ mesokain + β -eukain, □ lidokain + mesokain

Tabulka II
Vliv koncentrace PEG na migrační časy lokálních anestetik

Sloučenina	t_m^0 ^a [min]	t_m/t_m^0 ^b			
		12,5 % PEG	25 % PEG	30 % PEG	33 % PEG
Lidokain	6,26	1,56	3,09	4,39	5,01
Mesokain	6,55	1,62	3,28	4,71	5,37
Bupivakain	6,85	1,64	3,33	4,78	5,45
Amylokain	5,96	1,58	3,12	4,43	5,05
Tropakokain	5,96	1,58	3,12	4,47	5,10
β-Eukain	6,55	1,64	3,34	4,79	5,46
Kokain	6,26	1,58	3,14	4,47	5,09
Psikain	6,85	1,71	3,53	5,17	5,91
Prokain	5,30	1,71	3,51	5,08	5,82
Tetrakain	5,66	1,95	4,17	6,11	6,98
Leucinokain	6,15	1,83	3,84	5,62	6,43
Fomokain	6,85	1,87	3,95	5,77	6,58
Diperodon	7,86	1,94	4,23	6,33	7,20

^a Migrační čas ve fosfátovém pufru, ^b poměr migračního času ve fosfátovém pufru s přidavkem PEG k migračnímu času v pufru bez PEG



Obr. 8. Závislost poměru migračních časů anestetik k času diperodonu na obsahu PEG v základním elektrolytu; ● bupivakain, ○ fomokain, ■ psikain

zy a rovněž rostoucímu šumu základní linie jsou ke kvantifikaci vhodné pouze systémy obsahující méně než 25 % PEG.

Distribuce mezi vodou a PEG pseudofází určuje mechanismus separace v systému s přidavkem PEG. Tvorba pseudocrownových komplexů není významným příspěvkem k separaci vzhledem k lokalizovanému stericky stíněnému kladnému náboji. Molekuly PEG nejsou schopny obklopit velké kationtové molekuly s lokalizovaným nábojem. Druhý stupeň protonizace aromatické skupiny u analogů prokainu může být využit pro jejich separaci a zkrá-

cení doby analýzy v kyselém pufru s minimálním obsahem PEG.

LITERATURA

1. Bednář P., Stránský Z., Barták P., Adamovský P.: *ITP '98: 11th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, Lido of Venice, 4-7 October 1998*, Book of Abstracts (bez editora), str. 58.
2. Kaniansky D., Zelenský I., Valášková I., Marák J., Zelenská V.: *J. Chromatogr.* 502, 143 (1990).
3. Ito K., Hirokawa T.: *J. Chromatogr., A* 742, 281 (1996).
4. Sathakis C., Cassidy R. M.: *Analyst* 121, 839 (1996).
5. Thornton M. J., Fritz J. S.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 20, 653 (1997).
6. Stover F. S.: *J. Chromatogr.* 298, 203 (1984).
7. Wurzschnitt B.: *Z. Anal. Chem.* 130, 105 (1950).
8. Stránský Z.: *Analytika, chemie a technologie tensidů a detergentů, Ostrava, 23.-24. listopadu 1976*. Sborník referátů (bez editora), str. 149, Dům techniky ČVTS, Ostrava 1976.
9. Bednář P., Stránský Z., Barták P., Adamovský P.: *ITP '98: 11th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, Lido of Venice, 4-7 October 1998*. Book of Abstracts (bez editora), str. 57.
10. Bednář P., Stránský Z., Barták P., Adamovský P.: *J. Chromatogr., A* 838, 89 (1999).
11. Bednář P., Barták P., Adamovský P., Stránský Z.: *J. Chromatogr., A* 917, 319 (2001).
12. Matsubara N., Terabe S.: *Chromatographia* 34, 493 (1992).

13. Praus P., Dombek V.: *Anal. Chim. Acta* 283, 917 (1993).
14. Esaka Y., Goto M., Haraguchi H., Ikeda T., Kano K.: *J. Chromatogr., A* 711, 305 (1995).
15. Auriola S., Jaaskelainen I., Regina M., Uriti A.: *Anal. Chem.* 68, 3907 (1996).
16. Klein H.: *Drug Res.* 32, 795 (1982).
17. Fanali S., Foret F., Boček P.: *J. Chromatogr.* 330, 436 (1985).
18. Polášek M., Gaš B., Hirokawa T., Vacík J.: *J. Chromatogr.* 596, 265 (1992).
19. Bednář P., Stránský Z., Ševčík J., Dostál V.: *J. Chromatogr., A* 831, 277 (1999).
20. Chmela Z., Čížmárik J., Stránský Z.: *Pharmazie* 40, 731 (1985).
21. Stránský Z., Chmela Z., Peč P., Šafařík L.: *J. Chromatogr.* 342, 167 (1985).
22. Schieferecke M. A., McLaughlin K. J., Faibushevich A. A., Lunte C. E.: *Electrophoresis* 19, 2997 (1998).
23. Amini A., Jäverfalk E., Bastami S., Westerlund D.: *Electrophoresis* 20, 204 (1999).
24. Fujishita O., Higuchi S., Yoshikawa M., Aoyama T., Horioka M.: *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2134 (1983).

P. Adamovský and Z. Stránský (*Department of Analytical Chemistry, Palacký University, Olomouc*): **Separation of Some Local Anesthetics by Capillary Zone Electrophoresis in the Presence of Poly(ethylene glycol)**

Separations of inorganic cations and organic compounds by capillary zone electrophoresis (CZE) can be favourably influenced by addition of poly(ethylene glycol) (PEG) to the background electrolyte. Local anesthetics, organic bases, were selected as models for testing the influence of PEG on migration and resolution of analytes.

VÝVOJ METODIKY EXTRAKCE NA TUHÉ FÁZI A HPLC-MS PRO STANOVENÍ DEOXYNIVALENOLU V JEČMENI A SLADU

ALENA JEŽKOVÁ^a, JANA ŽDÁROVÁ KARASOVÁ^b, VLASTIMIL DOHNAL^{a,b,c} a IVANA POLIŠENSKÁ^d

^a Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^b Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třeběšská 1575, 500 01 Hradec Králové, ^c Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, České mládeže 8, 400 96 Ústí nad Labem, ^d Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž
dohnal@mendelu.cz

Došlo 4.3.08, přepracováno 17.10.08, přijato 6.11.08.

Klíčová slova: mykotoxin, deoxynivalenol, HPLC-MS, ječmen, slad

Úvod

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, vyvolávající různé toxické syndromy, souhrnně nazývané mykotoxikózy. Mykotoxiny se vyskytují na všech úrovních potravního řetězce¹. Současné výzkumy dokazují, že riziko mykotoxinů existuje na celém světě, včetně průmyslově vyspělých států². Z chemického hlediska se mykotoxiny řadí mezi vysoce stabilní nízkomolekulární organické sloučeniny nebilkovinné povahy³.

Deoxynivalenol (DON) je mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*), které jsou běžnými patogeny obilnin⁴. DON patří k celosvětově nejrozšířenějším trichothečenům⁵. Z toxikologického hlediska jsou akutní negativní zdravotní účinky deoxynivalenolu charakterizovány zejména střevními potížemi a zvracením². Během výroby piva deoxynivalenol přechází z kontaminovaného ječmene do sladu a následně pak do sladiny. V průběhu dalších kroků zpracování již nedochází k jeho odstranění či degradaci. Částečně se jeho koncentrace v pivu může snížit sorpcí na komponenty buněčné stěny (zejména β -D-glukomanany) pивních kvasinek. Není zcela jisté, jak dalece může konzumace piva obsahujícího mykotoxiny ohrozit lidské zdraví⁶, ale jeho přítomnost, kromě jiných faktorů, může vést ke vzniku nežádoucího jevu zvaného „gushing“, nebo-li přepěňování piva^{7,8}. Tento úkaz je velmi komplexní a může souviset i s produkcí specifických metabolitů plísní, mezi

kteří patří např. relativně malé proteiny zvané hydrofobiny^{9,10}.

Přímé stanovení DON ve vzorcích rostlinného původu bez jejich předchozí úpravy je vzhledem ke složitosti matrice velmi obtížné. Proto jsou pro přípravu vzorku k analýze užívány různé postupy, které mají za úkol vliv této matrice minimalizovat. Nejčastěji používanou metodou je extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction, SPE)¹¹. Zde bývá s různou výtěžností aplikována celá řada sorbentů, jako jsou např. aktivní uhlí-alumina, iontově výměnné pryskyřice, silica, Florisil¹², grafitizované saze (GCB), MycoSep kolonky a imunoafinitní kolonky¹³.

K vlastnímu stanovení DON v potravinách se v poslední době používají chromatografické metody, jako je např. plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (ECD)¹² nebo s hmotnostním detektorem, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí či superkritická fluidní chromatografie¹⁴. Kromě těchto metod jsou často aplikovány imunologické postupy, např. radioimunologická analýza (RIA) či enzymová imunoanalýza (ELISA)¹⁵.

Cílem práce bylo vyvinutí a zavedení metodiky pro extrakci mykotoxinů z ječmene a sladu a následně i jejich stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Metodika byla poté využita k hodnocení kontaminace zrna ječmene a z něj vyrobeného sladu a k posouzení vlivu sladování na obsah DON.

Experimentální část

Přístroje

Stanovení obsahu DON ve vzorcích bylo prováděno na kapalinovém chromatografu Agilent HP1100 (Agilent, Palo Alto, USA), sestávajícího z vakuové odplyňovací jednotky (model G1322A), kvartérního čerpadla mobilní fáze (G1311A), automatického dávkovače vzorku (G1313A), UV-VIS detektoru s nastavitelnou vlnovou délkou (G1314A), fluorescenčního detektoru (G1321A) a kvadrupólového hmotnostního detektoru (G1946VL) s ionizační elektrosprejem.

Standard DON byl zakoupen u firmy Sigma-Aldrich, s. r. o. (Praha, ČR). Z něj byl poté rozpuštěním v acetonitrilu připraven zásobní roztok o koncentraci 0,2 mg ml⁻¹. Roztok byl uchováván při teplotě -18 °C. Metoda HPLC-MS stanovení DON byla vyvíjena s roztoky čistého standardu. Ty byly připravovány vždy čerstvé ze zásobního roztoku DON v acetonitrilu o koncentraci 0,2 mg ml⁻¹ ředěním. Veškeré použité chemikálie odpovídaly chromatografické čistotě a byly dodány firmou Sigma-Aldrich, s. r. o.

Vzorky ječmene a sladu

Vzorky ječmene a sladu byly získány od firmy Agrotest fyto, s.r.o (Kroměříž, Česká republika). Jednalo se o vzorky několika odrůd ječmene pěstovaných v různých

oblastech České republiky a po různých předplodinách. Sladování bylo prováděno v laboratoři VÚPS a.s., Sladařského ústavu v Brně. Pro kontrolu byl u všech vzorků obsah DON stanoven nejprve komerčními kity ELISA (RIDASCREEN® FAST DON; výrobce R-Biopharm, Darmstadt, Německo) s limitem detekce (LOD) pro ječmen $12 \mu\text{g kg}^{-1}$, pro slad $62 \mu\text{g kg}^{-1}$ a limitem kvantifikace (LOQ) pro ječmen $42 \mu\text{g kg}^{-1}$ a pro slad $190 \mu\text{g kg}^{-1}$. Výtěžnost metody pro obě matrice odpovídá 110 %.

Příprava vzorku

Navážka 1 g ječmene byla jemně rozemleta a extrahována 10 ml směsí acetonitril (ACN)/voda (84/16, v/v) po dobu 2 min na míchačce (MS2 Minishaker IKA, USA) a vzniklá suspenze byla centrifugována při $10\,000 \text{ ot min}^{-1}$ po dobu 10 min (centrifuga Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, Německo). Pevný zbytek byl opět extrahován $2 \times 7 \text{ ml}$ směsí ACN/voda (84/16, v/v), centrifugován, extrakty spojeny a odpařeny do sucha na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml směsí ACN/voda (84/16), smíchán s 5 ml vody a přefiltrován přes membránový polytetrafluorethylenový filtr (SMI-LabHut Ltd., UK) o velikosti pórů $0,20 \mu\text{m}$. Takto připravený roztok byl přečištěn extrakcí na tuhé fázi (SPE) na vakuovém manifoldu (Supelco, USA). K extrakci byly na základě dat z literatury¹³ vybrány kolony Envicarb (Supelco, USA). Ty byly předem kondicionovány 10 ml vody a 0,3 ml methanolu. Matrice byla vymyta 3 ml směsí ACN/voda (84/16) a následně byl DON vymyt 2,5 ml methanolu, 5 ml methanolu okyseleného 0,095 ml kyseliny mravenčí a nakonec opět 2,5 ml methanolu. Získaný extrakt byl po odpaření pod mírným proudem dusíku do sucha rozpuštěn v 0,75 ml mobilní fáze (1 mmol l^{-1} kyselina mravenčí/ACN, 90/10, v/v). Takto připravený vzorek byl použit k vlastnímu stanovení na HPLC/MS.

Analýza pomocí HPLC/MS

K separaci byla použita dle cit.¹⁶ chromatografická kolona LUNA C18(2) o rozměrech $250 \times 4,6 \text{ mm}$, plněná částicemi o velikosti $5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, USA). Mobilní fáze pro eluci DON měla složení 1 mmol l^{-1} kyselina mravenčí/ACN (90/10, v/v) a průtok 1 ml min^{-1} . Detekce probíhala na MS detektoru v pozitivním módu (DON jako

$[\text{DON} + \text{H}]^+$, $m/z = 297$ a $[\text{DON} + \text{Na}]^+$, $m/z = 319$). Nalezené optimální hodnoty jednotlivých parametrů MS detektoru jsou uvedeny v tabulce I. Čas potřebný k analýze činí 15 min a eluční čas deoxynivalenolu je roven 10,9 min. Proces separace byl prováděn při laboratorní teplotě.

Kalibrace

Kalibrační křivka byla sestavena metodou standardního přídatku. Postup zpracování vzorku pro kalibraci odpovídal postupu použitého pro úpravu reálného vzorku. Před vlastním zpracováním vzorku bylo k navážce obiloviny přidáno požadované množství standardu DON. Více k problematice kalibrace pomocí metody standardního přídatku např. v publikaci¹⁷.

Výsledky a diskuse

Extrakce a čištění vzorku

Při zpracování rostlinné matrice bylo vycházeno z publikovaného postupu¹³. Podle potřeby byly jednotlivé kroky modifikovány na námi použitou instrumentaci. Extrakce DON byla nejprve vyvíjena s čistým standardem a teprve poté aplikována na reálné vzorky. K extrakci byly vybrány SPE kolony Envicarb od firmy Supelco, LiChrolut EN od firmy Merck s. r. o. (Říčany, ČR) a komerční jednorázová kolonka MycoSep 225 (Romer Labs, Tulln, Rakousko). U všech typů kolonek byla sledována výtěžnost DON a také reprodukovatelnost extrakčního procesu. Dále byl testován i vliv objemu rozpouštědla, ve kterém byl vzorek rozpuštěn před průchodem kolonou, na množství zachyceného DON. Výtěžnost byla sledována pro tři koncentrační hladiny, a to podlimitní ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$), limitní ($1250 \mu\text{g kg}^{-1}$) a nadlimitní ($5000 \mu\text{g kg}^{-1}$). Nejvyšší výtěžnost DON v oblasti koncentrací kolem $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$ obilniny (maximální povolený limit z Nařízení Komise Evropského společenství č. 1881/2006 (cit.¹⁸)) vykazovaly kolony Envicarb (84,6 %), zatímco kolony LiChrolut a MycoSep měly hodnoty výtěžností velmi podobné (65,9 a 64,1 %). Jako nejvhodnější pro další práci byla proto zvolena kombinace kolony Envicarb a vzorku rozpouštěného v 5 ml vody. K vymytí DON sloužil methanol a methanol okyselený kyselinou mravenčí (0,19 ml/10 ml

Tabulka I
Parametry hmotnostního detektoru

Parametr	Optimální hodnota	Rozmezí sledovaných hodnot
Průtok sušícího plynu, l min^{-1}	13	5 až 13
Tlak rozprašovače, kPa (Psig)	345 (50)	138 až 414 (20 až 60)
Napětí na kapiláře elektrospreje, V	4500	1500 až 6000
Teplota, °C	350	150 až 350
Fragmentor, V	125	0 až 400

methanolu). Byl studován vliv objemu elučního činidla na výtěžnost DON. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 2,5 ml methanolu, 5 ml okyseleného methanolu a nakonec opět 2,5 ml methanolu.

Chromatografické stanovení deoxynivalenolu

Důležitým krokem při vývoji chromatografické separace bylo stanovení nevhodnějšího složení mobilní fáze. Byla použita izokratická eluce při poměru vodné fáze a ACN (90:10). U vodné fáze byl sledován vliv přidavku kyseliny mravenčí o různé koncentraci (0; 0,01; 0,1 a 1 mmol l⁻¹). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití mobilní fáze s 1 mmol l⁻¹ kyselinou mravenčí. Ta za použitých podmínek metody nejvíce podporovala ionizaci molekuly DON, potřebnou pro její stanovení na hmotnostním detektoru. Citlivost metody byla dále zvýšena opětovnou optimalizací jednotlivých parametrů hmotnostního

detektoru (viz výše).

LOD vyvinuté metody pro stanovení obsahu DON ve vzorcích ječmene (sladu) je roven 25 µg kg⁻¹ = 0,033 µg ml⁻¹ (30 µg kg⁻¹ = 0,040 µg ml⁻¹) a limit kvantifikace 83 µg kg⁻¹ = 0,110 µg ml⁻¹ (100 µg kg⁻¹ = 0,133 µg ml⁻¹). V porovnání s výchozí prací¹⁶, kde sloužil k analýze systém HPLC-UV, se nám LOD s roztokem čistého standardu podařilo snížit téměř desetkrát (LOD HPLC/UV = 0,095 µg DON/ml, LOD HPLC/MS = 0,01 µg DON/ml). Limit detekce publikovaných metod určených k analýze obilovin je následující: ve vzorcích pšenice LOD = 50 µg kg⁻¹ (cit.¹⁹), LOD = 40 µg kg⁻¹ (cit.²⁰), kukuřice LOD = 60 µg kg⁻¹ (cit.¹¹).

Byla provedena validace metody v rámci jednoho dne (10 měření), kdy relativní směrodatná odchylka (RSD) nepřesáhla 6,08 % a v rámci pěti dnů (25 měření) s RSD 6,54 %.

Tabulka II

Srovnání metod ELISA a HPLC-MS při stanovení obsahu deoxynivalenolu ve vzorcích ječmene a sladu (množství DON v µg kg⁻¹)

Odrůda ječmene	Předplodina	ELISA ^{a,b}		HPLC/MS ^{a,b}	
		ječmen	slad	ječmen	slad
Bojos	kukuřice	138	pod LOQ	pod LOQ	pod LOQ
Diplom	cukrovka	pod LOQ	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Jersey	pšenice	51	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Jersey	kukuřice	pod LOQ	pod LOD	pod LOD	pod LOQ
Jersey	mák	pod LOD	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Malz	cukrovka	92	pod LOD	104	pod LOQ
Malz	cukrovka	50	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Malz	pšenice ozimá	58	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Malz	kukuřice	53	349	pod LOD	112
Prestige	cukrovka	56	pod LOD	103	109
Prestige	cukrovka	pod LOQ	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Prestige	pšenice ozimá	55	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Prestige	pšenice	pod LOQ	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Prestige	ječmen jarní	835	295	641	499
Prestige	slunečnice	42	pod LOD	pod LOQ	127
Prudentia	kukuřice	pod LOQ	pod LOQ	177	231
Sebastian	–	53	193	pod LOD	pod LOQ
Sebastian	cukrovka	63	pod LOQ	pod LOQ	pod LOQ
Sebastian	kukuřice	59	299	pod LOQ	pod LOQ
Tolar	soja	103	pod LOD	pod LOQ	pod LOQ
LOQ ^b		42	190	83	100
LOD ^a		12	62	25	30

^a LOD – limit detekce; ^b LOQ – limit kvantifikace

Výsledky měření

20 vzorků ječmene a z nich vyrobených 20 vzorků sladu bylo analyzováno na obsah DON. Při použití SPE extrakce a HPLC-MS analýzy převyšovalo množství DON LOQ v devíti případech (viz tab. II). Analýzami provedenými pomocí kitů ELISA RIDASCREEN® FAST DON, se podařilo kvantifikovat DON celkem v 18 vzorcích. Při porovnávání výsledků je nutné přihlídnout k faktu, že LOQ byl nižší u vzorků ječmene než u sladu (ELISA 5,2× nižší, HPLC/MS 1,2× nižší), tudíž nebylo možné vyhodnotit velmi nízké koncentrace DON v materiálu po sladování. V případech, kdy se množství DON pohybovalo pod LOQ ve výchozím materiálu, nebylo jeho množství s jedinou výjimkou stanovitelné ani po procesu sladování. Z naměřených hodnot u pozitivních variant je zřejmé, že obsah DON ve sladu někde převýšil jeho obsah v korespondujících vzorcích ječmene, v některých případech byl naopak nižší. Schwarz a spol.²¹ sledovali změny obsahu ergosterolu a DON v průběhu sladování. Hodnoty obsahu DON v zeleném sladu činily 18–114 % hodnoty obsahu DON v původních vzorcích ječmene, u uhvozdného sladu bylo rozpětí těchto hodnot 16–100 %. U kontaminovaného ječmene se může obsah DON zvýšit v průběhu máčení, klíčení a na počátku hvozdní ječmene, kdy jsou nastoleny ideální podmínky pro růst plísní a další produkci mykotoxinů^{4,5,22}. Na straně druhé může dojít k poklesu množství DON a to při máčení zrna, díky odstranění prachu a splavků, a také vyloužením deoxynivalenolu do máčecí vody^{6,10}. Vztahy mezi obsahem DON v ječmeni a ve sladu jsou obecně velmi různorodé a závisí jak na odrůdě ječmene, tak také na technologických podmínkách sladování²³.

Závěr

Cílem práce bylo vyvinutí a zavedení metodiky pro extrakci a stanovení DON v obilovinách dostupnou instrumentací. K SPE extrakci DON z rostlinného materiálu byla vybrána velmi účinná kolonka Envicarb (Supelco). K vlastnímu stanovení byl použit kapalinový chromatograf s hmotnostní detekcí. LOD pro vzorky ječmene (sladu) je roven 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (30 $\mu\text{g kg}^{-1}$) a LOQ 83 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Doba analýzy odpovídá 15 min, což ji předurčuje jako vhodné řešení pro větší série analýz. Vyvinutá metoda je relativně levná, rychlá a má dostatečnou citlivost, zaručující stanovení nízkých koncentrací DON v obilovinách. Aplikací tohoto postupu jsme získali hodnoty obsahu DON ve vzorcích ječmene a z něj vyprodukovaného sladu. Naměřené výsledky jednoznačně neprokázaly pokles nebo nárůst obsahu DON v procesu sladování. Obsah DON ve všech analyzovaných vzorcích byl pod maximálním povoleným limitem daným legislativou.

Autoři děkují Grantové agentuře Ministerstva obrany České republiky za finanční podporu tohoto projektu (grant č. OPUOFVZ200604).

LITERATURA

1. Žabka M., Jegorov A.: Chem. Listy 96, 607 (2002).
2. Malif F., Ostrý V.: *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských oborů, Brno 2003.
3. Suchý P., Herzig I.: <http://www.vuzv.cz/vyziva/studie14.rtf>, staženo 17. 9. 2007.
4. Klem K., Váňová M., Hajšlová J., Lancová K., Sehnalová M.: Plant Soil Environ. 53, 421 (2007).
5. Havlová P., Lancová K., Váňová M., Havel J., Hajšlová J.: J. Agric. Food Chem. 54, 1353 (2006).
6. Wolf-Hall C. E.: Int. J. Food Microbiol. 119, 89 (2007).
7. Linko M., Haikara A., Ritala A., Penttilä M.: J. Biotechnol. 65, 85 (1998).
8. Schwarz P. B., Beattie S., Casper H. H.: J. Inst. Brew. 102, 93 (1996).
9. Sarlin T., Nakari-Setälä T., Linder M., Penttilä M., Haikara A.: J. Inst. Brew. 111, 105 (2005).
10. Laitila A.: *Microbes in the Tailoring of Barley Malt Properties. Academic dissertation in Microbiology*, <http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2007/P645.pdf>, staženo 20.12.2007.
11. Abramović B., Jajić I., Jurić V., Gaál F. F.: J. Serb. Chem. Soc. 70, 1005 (2005).
12. Radová Z., Holadová K., Hajšlová J.: J. Chromatogr., A 829, 259 (1998).
13. Cavaliere C., D'ascenzo G., Foglia P., Pastorini E., Samperi R., Lagana A.: Food Chem. 92, 559 (2005).
14. Langseth W., Rundberget T.: J. Chromatogr., A 815, 103 (1998).
15. Usleber E., Martlbauer E., Dietrich R., Terplan G.: J. Agric. Food Chem. 39, 2091 (1991).
16. Jedličková L.: *Diplomová práce*. Masarykova univerzita, Brno 2007.
17. Dohnal V., Kaderová I., Ježková A., Skládanka J.: Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun. 15, 9 (2007).
18. *Narižení Komise č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách*, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:CS:PDF>, staženo 15. 3. 2007.
19. Kotal F., Holadová K., Hajšlová J., Poustka J., Radová Z.: J. Chromatogr., A 830, 219 (1999).
20. Krska R.: J. Chromatogr., A 815, 49 (1998).
21. Schwarz P., Casper H., Beattie S.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53, 121 (1995).

22. Wolf-Hall C. E., Schwarz P. B., v knize: *Mycotoxins and Food Safety* (DeVries J. W., Trucksess M. W., Jackson L. S., ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2002.
23. Sypecká Z., Havlová P., Nevrková M.: *Kvasný Průmysl* 49, 146 (2003).

A. Ježková^a, J. Karasová^b, V. Dohnal^{a,b,c}, and I. Polišenská^d (^a *Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*, ^b *Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové*, ^c *Department of Chemistry, Faculty of Science, J.E. Purkyně University, Ústí nad Labem*, ^d *Agrotest Fyto Ltd, Kroměříž*): **Development of Solid-Phase Extraction and HPLC/MS Methods for Deoxynivalenol Determination in Barley and Malt**

A method for the determination of deoxynivalenol (DON) in cereals has been developed and tested. The method is based on solid phase extraction in a column and subsequent separation by HPLC-MS. DON was detected with a MS detector in positive mode. The method is inexpensive, fast and highly sensitive. The method was used for the determination of deoxynivalenol in barley and malt, with the detection limit 25–30 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Changes in the DON content after malting were followed using the method.



SPECIALISTA PRODEJE

Náplň práce:

- Vyhledávání a udržování kontaktů se zákazníky
- Marketing a prodej přiděleného portfolia výrobků
- Marketingové průzkumy, monitoring a vyhodnocování konkurenčních aktivit
- Organizace a vedení marketingových akcí a kampaní
- Udržování a posilování dobrého jména společnosti

Požadavky:

- VŠ vzdělání – chemie, biochemie, případně farmacie
- Angličtina – schopnost plynule hovořit i na odborné úrovni
- Předchozí zkušenost z obchodu a marketingu
- Výborné obchodní a prezentační dovednosti, dobrý mluvený i psaný projev pro komunikaci s představiteli výzkumných ústavů, lékaři, obchodními manažery
- Ochota často cestovat
- Řidičský průkaz B
- Nástup ihned

Co nabízíme:

- Finanční ohodnocení odpovídající dosaženým výsledkům
- Odborné vzdělávání v rámci dynamického a vysoce motivovaného pracovního týmu
- Služební automobil, mobilní telefon
- Zázemí mezinárodní společnosti se sídlem v USA
- 5 týdnů dovolené

CHEMICKÝ PRŮMYSL

ZVYŠOVÁNÍ ÚČINNOSTI
ODFENOLOVÁNÍ NAFTALENOVÉHO
OLEJEQUIDO SMEJKAL^a, MARTIN ZGABAJ^b
a JAROSLAV OBERMAJER^b^a QUIDO-Engineering Berlin, Wassermannstr. 52, D-12489 Berlin, Německo, ^b DEZA, a.s., Masarykova 753, 757 28 Valašské Meziříčí
info@quido-engineering.com

Došlo 20.3.08, přijato 12.9.08.

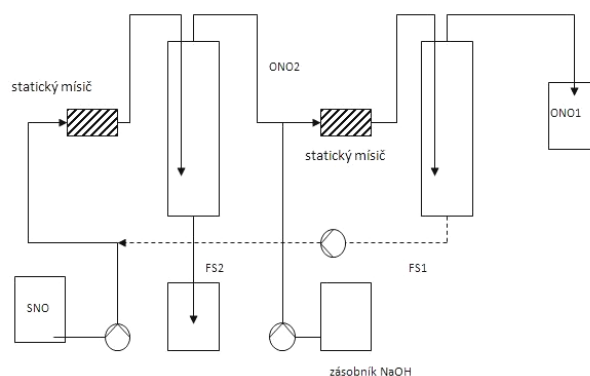
Klíčová slova: fenol, dehet, naftalen

Úvod

Podnik Deza, a.s. je tradičním zpracovatelem černouhelného dehtu a surového benzolu, které ve svém výrobním zařízení separuje na jednotlivé olejové frakce sloužící dále k výrobě čistých aromatických chemikálií. Jednou z izolovaných olejových frakcí z destilace dehtu je naftalenový olej, ze kterého je destilací a následnou krystalizací získáván naftalen. Před těmito operacemi jsou oddělovány fenoly a zásady (odfenolování) s cílem zvýšit koncentraci naftalenu, odstranit složky způsobující nemožnost rektifikačního koncentrování naftalenu tvorbou azeotropických směsí a částečně oddělit látky, které mají teplotu varu blízkou naftalenu.

V provozních podmínkách výroby DEZA, a.s. probíhá odfenolování surového naftalenového oleje (SNO) protiproudě ve dvou stupních pomocí vodného roztoku NaOH. Surový naftalenový olej je přímo odebírán z kontinuální destilace dehtu a přiváděn na jednotku výroby naftalenu. V prvním stupni odfenolování probíhá částečné odfenolování pomocí parciálně nasyceného fenolátu sodného (FS1) z druhého stupně. Do druhého stupně je pak přidáván čerstvý roztok hydroxidu sodného a surovina je hlouběji odfenolována. Surový naftalenový olej (SNO) obsahuje podle zpracovávané suroviny až 4 % kyselých fenolických olejů (KO). Blokové schéma odfenolování je znázorněno na obr. 1.

Při běžném odfenolování dosahuje koncentrace zbytkových KO asi 0,6 %. Přitom je prokázáno, že je při příznivých podmínkách a optimálním nástřiku možno v odcházejícím odfenolovaném naftalenovém oleji 1 (ONO1)



Obr. 1. Zjednodušené blokové schéma odfenolování surového naftalenového oleje; FS – fenolát sodný

dosáhnout podstatně nižšího obsahu fenolů. Z důvodu zvýšené potřeby produkce je v zařízení zpracováno výrazně více suroviny, než bylo při návrhu technologie původně uvažováno. Předimenzovaný nástřik spolu s mimořádně jednoduchou konstrukcí děliček (bez zarážek, koalescenčních zón apod.) vede k problémům při oddělování vodné fáze (VF) z ONO1 a ke tvorbě emulze. Jako důsledek nekvantitativního oddělení VF jsou kapénky vodné fáze strhávány do ONO1. Následně dochází v přehříváči ONO1 před destilací k prudkému odpaření vody z kapének a k usazování anorganických úsad na stěnách zařízení. Mechanismus usazování anorganických solí, který však není předmětem této studie, je přítom velmi komplikovaný. Bilance naznačují, že na teplosměnné ploše se skokově mění v důsledku prudkého vypaření vody pH, které ještě podporuje vytváření vrstvy solí. Tvorba úsad vede následně k výraznému snížení koeficientu přestupu tepla na výměňkových trubkách a zařízení musí být nákladně čištěno.

Cíle projektu

Jednou z prvních řešených otázek byla proto rychlost sedimentace v kontinuálním a diskontinuálním uspořádání. Řešení problému je komplikováno faktem, že zpracovávaná surovina je neprůhledná a není jednoduché, i při laboratorních testech např. rozeznat tvorbu kapének/koalescátů vodné fáze při jejím odsazování z organické fáze. Dalším cílem projektu bylo posoudit možnosti technologických změn stávajícího odfenolování a navrhnout úpravy, které by vedly jak ke snížení koncentrace fenolů v ONO1, tak k nižšímu zanášení teplosměnných ploch v navazujících výměňcích.

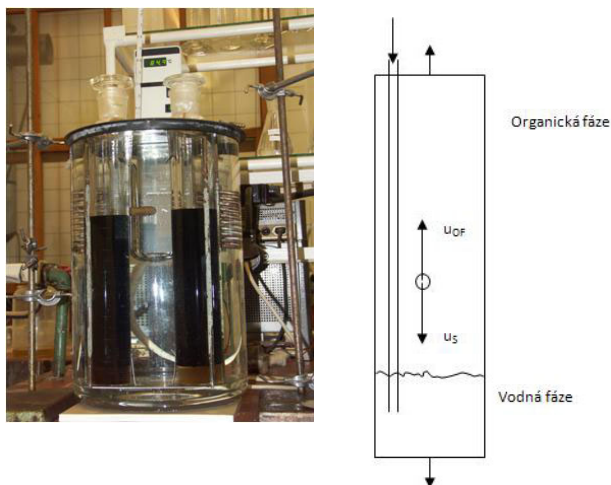
Výsledky a diskuse

Bilance sedimentační rychlosti

Cílenými laboratorními experimenty byly stanoveny sedimentační rychlosti kapének vodné fáze v naftalenovém oleji na $5,2 \cdot 10^{-4} - 8,4 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$ v závislosti na rychlosti proudění. Dále byla z bilancí provozních údajů a z údajů o geometrii zařízení vypočítána rychlost únosu vodné fáze ve studované děličce. Byla odhadnuta hodnota $5,6 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$. Bylo zjištěno, že rychlost únosu vodné fáze je srovnatelná s rychlostí sedimentace a zákonitě tedy musí docházet k strhávání vodné fáze do hlavního proudu oleje. Řešením problému mohlo proto být buď zvýšení rychlosti sedimentace vodné fáze nebo snížení rychlosti toku naftalenového oleje v popisovaném separačním systému. Průběh sedimentačního experimentu je dokumentován v obr. 2, kde je navíc znázorněna bilance sedimentační rychlosti kapénky VF v naftalenovém oleji.

Systém odfenolování SNO je mimořádně komplexní a jednotlivé kroky jsou mezi sebou úzce svázané. Proto bylo nutné uvažovat nejen o možnostech úprav samotné děličky, ale i o modifikacích ostatních aparátů, které by vedly ke zlepšení odsolování či k lepšímu odsazení vodné fáze z ONO1. Po hlubší analýze byly zvoleny dvě možnosti technologických úprav, které budou nyní v detailu prodiskutovány:

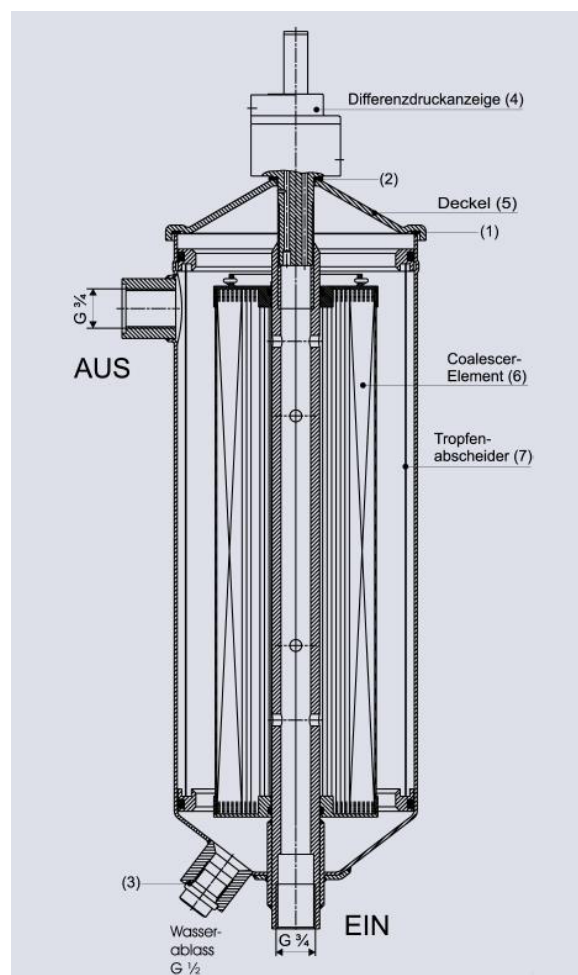
- použití orientované struktury podporující koalescenci kapének vodné fáze,
- kontinuální odběr vodné fáze ze zásobníku odfenolovaného naftalenového oleje.



Obr. 2. Sedimentační test v laboratorním měřítku a bilance rychlostí sedimentace, $u_{OF} = 5,6 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$, $u_S = 5,2 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$ až $8,3 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$

Orientovaná struktura náplně děličky

Instalace orientované výplně v celém průřezu děličky by byla velmi složitá, pracná a nákladná procedura s nejistým výsledkem. Z tohoto důvodu byla zvolena varianta externího koalesceru, který pracuje jako samostatný segment. Vlastní aparát tvoří ocelový válec, ve kterém je ukotvena orientovaná náplň napomáhající koalescenci kapének vodné fáze. Na orientovaném elementu jsou zachycovány přednostně kapénky vodné fáze, které se shlukují do kapének velikosti řádově několik milimetrů a dále přecházejí společně s olejem na speciální hydrofobní tkaninu. Tam dochází k oddělení oleje a vodná fáze se hromadí ve sběrné komoře, ze které je podle potřeby vypouštěna. Obr. 3 dokumentuje konstrukci použitého koalesceru pro oddělení kapének vodné fáze.



Obr. 3. Schéma koalesceru pro oddělení vodné fáze z naftalenového oleje

Poloprovozní ověření. K provedení poloprovozních testů bylo odvětvováno 0,3–1 m³ hod⁻¹ suroviny (ONO1). Pro zhodnocení účinnosti koalesceru byl analyzován obsah vody na odkalovacím ventilu, vstupu a výstupu z koalesceru. V provedených testech nebylo dosaženo na výstupu z koalesceru významného snížení obsahu vodné fáze oproti vstupní surovině. Stanovené hodnoty se měnily kolem 0,1 hm.%, na výstupu z odkalovacího ventilu bylo v ustáleném stavu detegováno pouze 0,2 hm.% vody.

Příčinu neuspokojivých výsledků je možno spatřovat ve velmi malém rozdílu hustot v kombinaci s nízkou koncentrací vody, která může být z části také rozpuštěna v naftalenovém oleji. Všechny uvedené skutečnosti vedou pravděpodobně k vytvoření velmi malé hnací síly procesu usazování. Použití orientovaných výplní není vhodné pro systémy kapalin s blízkými hustotami. Z tohoto důvodu nebyly provedeny žádné další kroky v tomto technologickém směru.

Kontinuální odtah vodné fáze

Základní problém celé technologie, tj. vytváření vrstvy anorganických solí na teplosměnné ploše výměníku před rektifikací je způsoben tím, že je část vodné fáze (VF) z děličky strhávána do proudu ONO1. Mezi děličkou a výměníkem je ještě zařazen mezizásobník. Jeho funkcí je akumulovat ONO1 při najíždění jednotky po odstávce. V těchto případech je možné právě v tomto tanku selektivně odebrat nahromaděnou část vodné fáze VF, která bývá normálně odčerpána spolu s proudem ONO1 do dalšího zpracování. V praxi je před spuštěním destilace s předřazeným výměníkem tepla jednoduše odčerpána část suroviny ze dna mezizásobníku (tzv. odstřík) jako odpad zpět do technologie odfenolování. Velmi důležitý je přídatný efekt stavu tohoto technologického zařízení. Složení ONO1 z mezizásobníku bylo totiž po odstříku testováno na obsah vody s cílem bilancovat množství strhávané vodné fáze do ONO1. Právě obsah vodné fáze před výměníkem je zodpovědný za tvorbu anorganických úsad. Bylo zjištěno, že tato koncentrace je mimořádně nízká. Stanovení vodné fáze v ONO1 je však zatíženo velkou experimentální chybou, a proto bylo nutné tuto bilanci upřesnit. To bylo možné díky realizaci kontinuálního odběru spodní vodné frakce ze zásobníku, která byla jímána a analyzována. Další výhodou kontinuálního odtahu vodné fáze VF je potom přesně definovaný odběr spodní frakce z mezizásobníku, a tím také výrazně jednodušší provoz (bez složitého rozehrívání potrubí před odstříkem apod.) této části technologie.

Po dokončení stavebních úprav a převzetí zařízení byla provedena celá sada provozních experimentů v různých provozních režimech. Při dostatečně dlouhé době zdržení se jednoznačně potvrdil pozitivní vliv kontinuálního odtahu VF na sníženou tvorbu anorganických úsad při předehřevu ONO1.

Požadovaná kapacita (rychlost) produkce neumožňuje zajistit v existujícím zařízení potřebnou dobu zdržení ma-

teriálu v zásobníku. Potřebný čas k odsazení vodné fáze by mohl být zajištěn pomocí dvou dostatečně velkých zásobníků s kontinuálním odtahem vodné fáze pracujících v periodickém režimu. Inženýrský návrh tohoto řešení bude založen na spojení matematických modelů obou zásobníků.

Závěry

Zvýšení výrobní kapacity přimělo technické pracovníky Deza, a.s. se detailněji zabývat intenzifikací oddělení vodné fáze VF od odfenolovaného naftalenového oleje ze stupně ONO1 s cílem snížit rychlost tvorby úsad na stěnách výměníků. Ve spolupráci s firmou QUIDO-Engineering Berlin byly proměřeny a vypočítány rychlosti odsazování vodné fáze VF z odfenolovaného naftalenového oleje ONO1, celý systém byl bilancován a na základě získaných poznatků byla navržena možná technologická řešení.

Bylo zjištěno, že použití orientovaných struktur na systémy s blízkými hustotami a nízkou koncentrací jedné z fází není vhodné z důvodu vytvoření velmi malé hnací síly procesu.

Jedno z možných řešení uvedeného problému spočívá v zajištění dostatečné doby zdržení materiálu ve dvou periodicky pracujících zásobnících.

Autoři tohoto příspěvku děkují provozu naftalen pod vedením pana Sedláře za systematickou podporu při řešení problematiky, stejně jako vedení firmy DEZA, a.s. za profesionální záštitu celé problematiky.

Seznam zkratk

KO	kyselé fenolové oleje
SNO	surový naftalenový olej
FS1	parciálně nasycený fenolát sodný
ONO1	odfenolovaný naftalenový olej ze stupně 1
VF	vodná fáze

Q. Smejkal^a, M. Zgabaj^b, J. Obermajer^b (^a QUIDO-Engineering, Berlin, Germany, ^b DEZA Co., Valašské Meziříčí, Czech Republic): **Improving Effectiveness of Separation of Phenols from the Naphthalene Fraction**

The regime of the unit for separation of phenols from the naphthalene oil fraction was analysed. It was found that the critical problem of the unit is a solid deposition on the heat transfer surface. The solid formation is due to a low sedimentation rate of water from naphthalene oil due to a high flow rate in the equipment. To solve the problem, installation of two additional sedimentation tanks was proposed.

VÝUKA CHEMIE

JAKÝMI VELIČINAMI POPSAT REAKČNÍ RYCHLOST?

KAMIL WICHTERLE a JANA WICHTERLOVÁ

Katedra chemie, Fakulta metalurgie a materiálového inženýrství, VŠB – Technická univerzita Ostrava, 708 33 Ostrava Poruba

kamil.wichterle@vsb.cz

Došlo 20.9.07, přijato 11.10.07.

Klíčová slova: Reakční rychlost, reakční kinetika, koncentrace, aktivita

Připomeňme některé problémy definice reakční rychlosti, jak se s ní chemik setkává v různých kontextech.

Označíme-li symbolem n_i látkové množství chemické látky i , pak časová změna tohoto množství

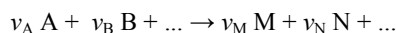
$$R_i \equiv \frac{dn_i}{dt}$$

tedy rychlost přeměny látky i , je klíčovou veličinou reakční kinetiky. R_i je extenzivní veličinou, závislou na velikosti systému, přičemž zkušenost říká, že průběh reakce závisí jen na intenzivních stavových proměnných, jako jsou koncentrace, teplota a tlak. Proto je vhodné vztáhnout rychlost přeměny R_i na některou extenzivní veličinu, nejčastěji na objem V systému. Potom je rychlost přeměny jako intenzivní veličina definována vztahem

$$r_i \equiv \frac{1}{V} \frac{dn_i}{dt}$$

Teprve studiem rychlosti přeměny všech zúčastněných látek včetně meziproductů můžeme odhalit reakční mechanismus a vybrat k jeho popisu vhodné chemické rovnice.

Jakmile dojdeme k přesvědčení, že v systému probíhá jediná reakce obecně zapsaná např. formální rovnicí

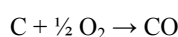


kde vzorce reaktantů byly nahrazeny symboly A, B, ..., vzorce produktů M, N, ... a kde ν_i jsou stechiometrické koeficienty příslušných sloučenin, dostaneme se na začátek obvyklých úvah učebnic chemické kinetiky. Přidáme-li další předpoklady, že se látkové množství složek nemění přítokem či odtokem, dá se zavést pojem rychlost přeměny r (jinak též počet obrátů reakce), která říká, kolikrát tato reakce proběhne v jednotce objemu za jednotku času (v základních jednotkách mol m⁻³ s⁻¹). Tato rychlost pak

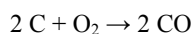
souvisí s rychlostí zániku (rate of disappearance) reaktantů a s rychlostí vzniku (rate of appearance) produktů

$$r = \frac{-1}{\nu_A V} \frac{dn_A}{dt} = \frac{-1}{\nu_B V} \frac{dn_B}{dt} = \dots = \frac{1}{\nu_M V} \frac{dn_M}{dt} = \frac{1}{\nu_N V} \frac{dn_N}{dt} = \dots$$

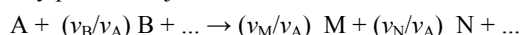
Kromě toho, že platnost těchto rovností je podmíněna tím, že smí probíhat právě jen jediná reakce, takto definovaná rychlost reakce r závisí také na zápisu její chemické rovnice. Je to vidět třeba na jednoduchém příkladu, kdy hodnota r reakce



je za stejných podmínek dvojnásobná než hodnota r pro tutéž reakci, zapsanou rovnicí



Této nejednotnosti se v praxi reaktorového inženýrství předchází tím, že subjektivně vybereme jednu látku za klíčovou a u ní nastavíme stechiometrický koeficient na jednotku. Obvykle není problémem, kterou látku zvolit, protože je praktické vybrat některý z reaktantů a to ten, který je nejsledovanější, nejcennější a většinou nebývá v přebytku. Klíčové látce přiřadíme písmeno A a rychlost přeměny pak vztahujeme k rovnici



případně k dalším probíhajícím reakcím, v nichž látka A vystupuje.

Reakční rychlost jako intenzivní veličinu r pak odvozuje od rychlosti zániku reaktantu A

$$r = r_A \equiv \frac{-1}{V} \frac{dn_A}{dt}$$

Tak zavádí pojem reakční rychlost (rate of reaction) prvoplánově většina standardních učebnic obecné a fyzikální chemie a inženýrství chemických reaktorů. Uvedme zde knihy dostupné v češtině a slovenštině^{1–10} a přidejme fundamentální^{11–13}. Překladaťel Moorovy knihy² k tomu doporučují, aby se pojem ještě rozšířeně konkretizoval jako „rychlost reakce v jednotkovém objemu“.

Vztažení reakční rychlosti na objem reakční směsi se hodí výborně pro běžné homogenní reakce. U katalytických reaktorů bývá účelnější vztáhnout rychlost přeměny třeba na hmotnost katalyzátoru, sypaný objem nebo aktivní povrch heterogenního katalyzátoru a další veličiny se nabízejí v kontextu reaktorů vícefázových; takové varianty zavedení pojmu reakční rychlost ukazuje např. Kraus, Schneider a Beránek¹⁰, avšak obecně to patří až do specializovaných kapitol pokročilejších monografií o reakční kinetice a jejím praktickém použití.

Zavedení reakční rychlosti r (v jednotkovém objemu) je vrcholně užitečné již proto, že s tímto pojmem je možno využít existující bohatý aparát^{5–13} vzorců a algoritmů přenosu dat mezi laboratoří a reálnými reaktory i třeba za

podmínek, že systémy jsou otevřené, kontinuální nebo semikontinuální, se změnami tlaku a teploty. (Pozn.: po zavedení dalších pojmů, jako je např. výtěžek a selektivita je možno pomocí (r_A) obsáhnout také situace, kdy probíhá více souběžných anebo následných reakcí.)

Ve zvláštním případě když se nemění reakční objem, platí pro koncentraci

$$c_A \equiv \frac{n_A}{V}$$

a reakční rychlost r se dá vyjádřit jako

$$r_I \equiv - \frac{dc_A}{dt}$$

Avšak v žádném případě nedoporučujeme rychlost změny koncentrace r_I pokládat za obecnou definici reakční rychlosti, jako se toho dopouštějí některé, v příslušné kapitole trivializované učebnice nebo příručky^{14–18}. Je to asi dáno tím, že za autorství stojí takoví chemici, kteří znají kinetiku jen platonicky, aniž by s ní někdy něco komplikovanějšího museli řešit. Atkins ale v novějším vydání¹⁹ tento nedostatek již napravuje. Chemický inženýr by nebyl zřejmě příliš potěšen tím, že musí např. pracovat se vztahem

$$n_A(t) = n_A(t_0) - \int_{t_0}^t V r_I dt + \int_{V(t_0)}^{V(t)} c_A dV$$

místo běžného

$$n_A(t) = n_A(t_0) - \int_{t_0}^t V r dt$$

atd., atd. (i když ani to jistě není nepřekonatelné).

Dalším problémem při zápisu vztahů pro rovnováhy a kinetiku reakcí je s oblibou používaný symbol $[A]$, který jednou označuje (jako v definici IUPAC¹⁸) skutečné koncentrace c_A ; jindy je to jen bezrozměrné číslo nazývané relativní koncentrace (např. v základní příručce Vacíka a spol.¹⁴), někdy jsou to dokonce aktivity. Zvyklosti s hranatými závorkami a s jejich významem v chemických příručkách jsou nejen nejednotné, ale jsou i v konfliktu s doporučeními ISO²¹. (Před webovou verzí Zlaté knihy IUPAC^{18,20} varujeme uživatele obecně, neboť je natolik nedbalá, že např. s tamní „definicí“ vychází pro vodu cosi jako $\text{pH} = -7 \pm 0,05$)

V oboru, ve kterém se prolínají přírodověda s fyzikou a inženýrskými disciplinami, budou pravděpodobně přetrvávat stále určité názvoslovné střety. Bylo by rozumné, kdyby se zavádění pojmu reakční rychlost poněkud ujednotilo. Pokládali bychom přitom za užitečné, kdyby se to přizpůsobilo zvyklostem inženýrské chemické kinetiky.

LITERATURA

- Hála E., Reiser A.: *Fyzikální chemie 2*. Academia, Praha 1966.
- Moore W. J.: *Fyzikální chemie*. SNTL, Praha 1981.
- Klikorka J., Hájek B., Votinský J.: *Obecná a anorganická chemie*. SNTL, Praha 1985.
- Benešová M., Satrapová H.: *Odmaturuj z chemie*. Didaktis, Brno 2002.
- Levenspiel O.: *Teorie a výpočty chemických reaktorů*. SNTL, Praha 1967.
- Bafnec M., Báleš V., Langfelder I., Longauer J.: *Chemické inženýrstvo I.* Malé centrum, Bratislava 1999.
- Horák J., Pašek J.: *Návrh průmyslových chemických reaktorů z laboratorních dat*. SNTL, Praha 1980.
- Ditl P.: *Chemické reaktory*. Vydavatelství ČVUT, Praha 2000.
- Hasal P., Schreiber I., Šnita D.: *Chemické inženýrství I*. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha 2007.
- Kraus M., Schneider P., Beránek L.: *Chemická kinetika pro inženýry*. SNTL, Praha 1978.
- Perry R. H., Green D. W.: *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. 7. vyd. McGraw-Hill, 1997.
- Richardson J. F., Peacock D. G.: *Chemical Engineering*, Vol. 3. Butterworth-Heinemann, Oxford 1994.
- Scott Fogler H.: *Elements of Chemical Reaction Engineering*. Prentice Hall PTR, Boston 2006.
- Vacík J.: *Přehled středoškolské chemie*. SPN, Praha 1999.
- Mareček A., Honza J.: *Chemie pro čtyřletá gymnázia*. 1. díl. Nakladatelství Olomouc, Olomouc 2002.
- Gažo J.: *Všeobecná a anorganická chemie*. Alfa, Bratislava 1981.
- Atkins P. W.: *Fyzikální chemie*. Časť 1. Slovenská technická univerzita Bratislava, Bratislava 1999.
- IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Electronic version. <http://goldbook.iupac.org/R05156.html>, staženo 30.5.2007.
- Atkins P., dePaula J.: *Atkins' Physical Chemistry*. 8. vyd. Oxford Univ. Press, Oxford 2006.
- Nič M., Jiráť J., Košata B.: *Chem. Listy 101*, 337 (2007).
- Juláková E.: *Chem. Listy 99*, 250 (2005).

K. Wichterle and J. Wichterlová (*Department of Chemistry, Faculty of Metallurgy and Material Engineering, Technical University, Ostrava*): **How To Define the Reaction Rate**

Various definitions of the reaction rate are discussed. It is strongly recommended to accept the concept of reaction rate as generally used by chemical engineers. The trivialized definition by IUPAC appears to be impractical.

DISKUSE

Necháme si vytunelovat i českou vědu?

Roku 1769 vznikla v českých zemích Společnost učená, jejíž náplní bylo věnovat se vědecké práci a výsledky publikovat. V průběhu uplynulých 240 let se tato Společnost párkrát přerodila do nových moderních organizací, avšak se stejným záměrem – pěstovat v českých zemích vědu na vysoké úrovni, a současná Akademie věd ČR je posledním článkem, jež z původní Společnosti učené postupně vznikly (viz Wikipedie).

Královská česká společnost nauk (1784–1952)

Česká akademie věd a umění (1890–1952)

Československá akademie věd (ČSAV) (1953–1992)

Akademie věd České republiky (AV ČR) (1992 – ?)

Důležitost existence vědecké instituce typu akademie si po dlouhá léta jejího trvání uvědomovala řada českých buditelů, mecenášů a velikanů průmyslu, kteří štědrě dotovali vědu odkazem budov a dalších pozemských statků, protože si uvědomovali, že věda je nedílnou součástí růstu sebevědomí národa a jeho začleňování do vyspělé Evropy. Lze konstatovat, že se díky pomoci řady vzdělaných a uvědomělých donátorů podařilo udržet bez přerušení vědeckou práci v českých zemích i přes historické přelomy, které v dobrém i špatném zásadně změnily zdejší společenské uspořádání (1918, 1939, 1948). Za německé okupace akademie ilegálně nahrazovala uzavřené vysoké školy, v období komunistické perzekuce Akademie věd umožňovala i „neprověřeným“ badatelům a hlavně učitelům vysokých škol přežít politickou diskriminací. Po roce 1990 se Akademie úplně zreformovala na základě přísného auditu zahraničních odborníků, o třetinu zeshňovala a zbavila se komunistických pohrobků, což bohužel na vysokých školách neproběhlo.

Nemovitosti patřící Akademii z výše zmíněných darů mají nyní hodnotu několika desítek miliard Kč a právě ty se staly v současné době centrem pozornosti developerů, protože ostatní majetky (např. dříve existujících organizací ROH, SSM, atd.) už byly zprivatizovány, vytunelovány (a mnohdy i rozkradeny). Scénář zrušit akademii jako instituci není tudíž překvapující ani nový, protože během posledních 20 let se nápady, jak dosáhnout na její majetek, už objevily. Současný pokus se trochu odlišuje, protože je zřejmě výsledkem práce lobbistů a dosazených úředníků, kteří mnohdy mají jen povšechné povědomí, jak se věda dělá, jak funguje a co celospolečensky reprezentuje, a jehož cílem může být rozeštvat akademickou obec a prostě rozbít stávající a využít vhodný okamžik třeba právě pro zákulisní majetkové tahy. Takovýto ekonomický záměr je usnadňován zaštitěním se statistikami a formálním vyhodnocováním výsledků vědy, které jsou často účelově zkonstruovány tak, aby právě sloužily určitému záměru (vrstvě) hodnotitelů a někdy neodrážejí skutečný stav věcí. Má smysl takto „konkurovat“ seriózním vědeckým výstupům

a zneužívat citační balast, jako je třeba mechanické zlepšení softwaru či navržení užitého vzoru? Nedostáváme se tím na neblahou úroveň vynucovaného a vždy kladného zhodnocování „zlepšovacích návrhů“? I základní teze Hospodářské komory ČR lze vidět v obdobném socialistickém duchu – cituji „*požadované změny přispějí k růstu konkurence schopnosti našich podnikatelů v éře globální ekonomiky s účelem docílení ekonomického růstu jednotlivých regionů ve snaze přiblížit se průměru zemí EU*“ – se záměrem převést výzkumné pracovníky do sféry vysokých škol, kde tato dělná generace chybí anebo je propustit, stejně jako námezdné dělníky na stavbách. Zásadní rozdíl je však v tom, že námezdné dělníky nemusí nikdo vychovávat, zatímco vytváření špičkového badatele je dlouhodobý proces a nelze s nimi manipulovat ze dne na den, a jejich existence je navíc i chloubou národa.

Uvažujme, k čemu by zrušení Akademie věd, jako jediné české mezinárodně uznávané vědecké instituce, mohlo vést:

- Bude opravdu znamenat rozbití či rozkouskování akademie a zprětrhání vazeb na vysoké školy, zvýšení prestiže vysokých škol (jejichž nejlepší reprezentanti jsou někde až ve třetí stovce celosvětově srovnávaných vysokých škol?)
- Zlepší to citační rejstřík vysokých škol, když řada vysokoškolských pracovníků převážně publikuje v domácích časopisech, sbornících či konferencích, i když nelze přehlédnout, že i vysoké školy mají velice kvalitní výzkum?
- Je vhodné posílit vysoké školy, které se v regionech kvapně rodí a ustavují někdy na úrovni odborných škol?
- Můžeme přelit peníze na vědu do peněz na aplikovaný výzkum, který neexistuje a který bude potřeba nejprve vybudovat v horizontu mnoha let?
- Můžeme si dovolit rozbít renomovanou instituci, která patří k těm nejlepším, jen na základě práce lobbistů, kteří i o svém výsledku už sami předem pochybují?
- Nehraje se opravdu jen o majetky a nejsou vedoucí pracovníci vysokých škol nevědomky zneužíváni v této hře, když zde existuje dlouholetá vzájemná důvěra a spolupráce *důležitá pro přežití obou subjektů*?

Celkový objem na výzkum a vývoj v roce 2010 je téměř 25 miliard Kč, přičemž dotace Akademii by měly klesnout o miliardu na cca 4,9 miliard Kč a do roku 2012 dále spadnout na pouhých 3 miliardy Kč. Tyto uspořené 3 miliardy také představují připravované a státem dotované šrotovné, které potřebují naše (ale vlastně cizácké) montovny všeho možného k přežití, zejména proto, že nemají svůj vlastní vědecký výzkum. Ušetřené 3 miliardy (reprezentující jen několik km výstavby předražené dálnice) by měly být věnovány vysokým školám – kdo však zaručí, že školy toto

relativně malé finanční zvýhodnění svého celkového rozpočtu opravdu využijí *jen a jen na zkvalitnění výzkumu!* Není potřeba předstírat, že školy (stejně jako třeba automobilky) peníze nepotřebují nebo že je nevyužijí – peněz není nikdy dost! Před očima máme neblahou situaci hospodářské krize, která je ve své podstatě *krizí důvěry* v přerozdělování peněz. Bankovní systém se stal nedůvěryhodný a pro jeho očistu se nám servíruje šetrnost, na které opět vydělávají ti bankéři a jejich lobbisti, co nám šetrnost servírují a kteří to vlastně způsobili. Ano, v případě hospodářské krize je záhodné šetřit, ale je potřeba vědět, kde šetřit! Chytré státy nepodporují absurdní šetření formou lobbistických projektů šrotovného a zvýhodňování montoven (od železa až po elektroniku), ale sázejí na rozvoj vědy a na svoji *odbornou soběstačnost*, založenou právě na vzrůstu vědeckého potenciálu. Místo tohoto moudrého uvažování u nás vláda (prostřednictvím svých lobbistických komisí) vědu předkládá jako jakousi malichernou a dokonce nedůvěryhodnou činnost, jak je vidno třeba z příspěvku státu na vědu, kde např. Finsko namísto českých 0,7 % HDP dává na vědu plně 3 %. A tak se hledají důvody, proč tolerovat takové elementy, kteří při ekonomické povodni rabují a naopak se hledají důvody, jak potlačit hasiče-vědce, co zachraňují (možná co se ještě zachránit dá).

Věda přináší pro mnohé často samozřejmé výsledky, které můžeme vidět např. v moderním lékařství. Původní základ takových výsledků se ovšem skrývá v teoretické práci, která se často dostává do aplikační sféry s mnohaletým zpožděním, což však význam základního vědeckého výzkumu nijak nesnižuje. V celosvětovém hodnocení má věda pro společnost mimořádný přínos, i když se využije pouhé procento výsledků! Politici a zejména jejich lobbisti přidali ČEZu několik desítek miliard, které samozřejmě chybí někde na trhu, mnoho miliard se promarnilo zaváděním běžných technologií a daňovými prázdninami firmám, které postavily haly pro manuální robotickou práci, ale které si nechávají samy pro sebe to nejdůležitější, vývoj a výzkum (*know how*, jak se nyní s oblibou říká). Dobrovolně vědu a výzkum na sebe nikdo nevezme, protože výrobní podniky na vývoj peníze dávají nerady, ale ochotně dotace rozpouštějí ve svém účetnictví

– a kdo by v průmyslu, za tak nízkou mzdu jako pracovníci akademie, chtěl, pracovat? Neuvážené přelévání peněz do aplikovaného výzkumu výrobní sféry je tak motivováno spíše lobbíngem než seriózní analýzou cílenou na posílení výzkumu a technologických inovací, což by se následovně mohlo ukázat škodlivé pro rozvoj (moderní – doufám) společnosti.

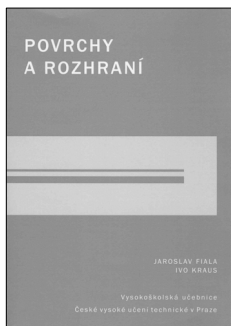
Chceme se opravdu stát jen pouhou výrobnou a závislou kolonií pokročilejšího světa bez vlastního vědeckého a odborného zázemí? Přidat „vývojovné“ na úrovni „šrotovného“ do vývojově negarantované sféry je riskantním krokem způsobu státního dofinancování a navíc tato účelová dotace povede k rozpolcení odborné společnosti a možná (záměrně) k rozháranosti vědecké a školské komunity, což nikomu neprospěje a naopak zneváží tyto instituce v očích veřejnosti, protože inteligence na akademické půdě by se měla umět domluvit na společném řešení, jak zachovat vědu, o to tady přeci jde!

Nedopustíme, aby si veřejnost vsugerovala, že vědecké objevy padají z nebe jen sami od sebe a že aplikovaný výzkum si vědu může při nejhorším koupit (třeba odkudsi z USA, ale pozor – za nehorázné peníze).

Každé porušení kontinuity, rozbití týmové práce, přerušování domácích i zahraničních vazeb je zničující. Přerody z Rakousko-Uherské, protektorátní a v dnešním kontextu z komunistické vědy do současné moderní podoby stálo mnohaleté úsilí. Lehce zranitelní badatelé a nepolitická Česká věda si nezaslouží, aby se stala hříčkou v rukou lobbistů, ať už předkládanou transformaci nazveme „normalizací“ nebo prostě „kafemlejnkem“. Lobbisti už nejednou ukázali, co je zákulisí politiky a jak dalece nás politici dovedou obloudit, kde lze majetky výhodně „zainvestovat“ a zavedli do světového povědomí český termín „vytunelovat“. Chceme se do dějin zapsat dalším rozšířením jeho významu i na vědu? Nebudou se ti, co se nechávají zmanipulovat vidinou lehce získaných peněz, jednou za svůj bezcharakterní postoj stydět – pokud se Češi jako národ stydět ještě umí!

Jaroslav Šesták,
Fyzikální ústav AV ČR, Praha
University of New York in Prague

RECENZE



Jaroslav Fiala a Ivo Kraus **Povrchy a rozhraní**

Vysokoškolská učebnice. České vysoké učení technické v Praze. Česká technika – nakladatelství ČVUT Praha 2009, 299 stran, ISBN 978-80-01-04248-9.

Koho by dříve napadlo, že např. farmaceutický vývoj bude dnes zajímat rozložení elektrického náboje, porozita nebo smáčivost povrchu pevných farmaceutických substancí pro řízení jejich rozpouštěcí rychlosti. Tyto veličiny byly snad dříve doménou fyziků, ale dnešní pojetí vědy smazává hranice mezi přírodovědnými a technickými obory a klade důraz právě na obory hraniční. A to povrchy a rozhraní bezesporu jsou.

Autoři předložené učebnice – renomovaní fyzici a pedagogové, prof. Jaroslav Fiala a prof. Ivo Kraus využili svých dlouholetých zkušeností a nesporné spisovatelské erudice a spojili svoje síly do zpracování velmi aktuálního tématu. Tématu, který vzhledem k jejich zaměření prolíná především materiálovým výzkumem, technologiemi

a diagnostikou (zejména RTG difrakce), ale je tématem také chemickým, farmaceutickým, biologickým aj. Učebnice obsahuje tři kapitoly: Struktura a vlastnosti, Diagnostika a Materiály a technologie, které jsou dále členěny na řadu podkapitol. Čtenář, který má za sebou pár Fialových a Krausových učebnic, samozřejmě poznává partie, které napsal jeden či druhý z autorů, ale předložená kniha obsahuje i řadu kapitol zcela nových a zajímavě pojatých: např. Kapilarita, Horror superfice („Strach z povrchu“), Inkluzivní sloučeniny, Povrchově aktivní látky, emulze a pěny, Tribologie. Předností knihy je velmi čtivé a vyvážené fyzikální zpracování, ale autoři podnikají i krátké exkurze do chemie a biologie. Pro chemiky a biology je vždy přínosné si přečíst, jak vidí jejich disciplínu fyzici. Drobné nedostatky spočívají v koordinaci některých kapitol, kdy dochází k duplicitě některých obrázků (např. obr. 1.3.8., 1.3. 46. a 3.4.4. jsou v podstatě stejné). Ovšem opakování je matkou moudrosti! Fialova a Krausova učebnice je bezesporu kvalitní, jako jsou její autoři. Ačkoliv je směřována především fyzikům, určitě ji objeví také chemici i když některé matematické partie zřejmě přeskochí (např. 2.3. Hlubkové profilování prvkového a fázového složení).

Bohumil Kratochvíl

61. ZJAZD CHEMIKOV

7. - 11. september 2009

Vysoké Tatry, Tatranské Matliare

Vážení priatelia,

v mene organizačného a programového výboru, sponzorov a čestného predsedníctva je nám potešením Vás pozvať na náš ďalší spoločný zjazd chemikov a to opäť do Vysokých Tatier. Centrom zjazdu bude opäť hotelový komplex Hutník situovaný v Tatranských Matliaroch. Určite ste si všimli, že postupne budujeme tradíciu našich tatranských zjazdov. Popri rôznych pozvaných prednášateľoch (PP) sa môžete tešiť na výber (po dvoch nositeľoch Nobelovej ceny) zaujímavého plenárneho prednášateľa. Novinkou bude tematický večer venovaný 80 rokom SChS a Kurz aplikácií kvantovej chémie.

Organizačný výbor

Dušan Velič – predseda

Monika Aranyosiová – výkonný tajomník

Miroslav Michalka – technická podpora

Zuzana Hloušková – hospodár

Milan Drábik – vedecký tajomník

Pavel Drašar – vedecký tajomník

Programový výbor

Prof. Ing. Dr. Jozef Tomko, DrSc. (SChS)

Doc. Ing. Viktor Milata, CSc. (SChS)

Ing. Miloš Revús (SSPCH, BA)

RNDr. Dalma Gyepesová, CSc. (SChS)

Doc. RNDr. Marta Šališová, CSc. (SChS)

Prof. Ing. Vlasta Brezová, DrSc. (SChS)

Ing. Mária Omastová, PhD. (SChS)

Ing. Marián Janek, PhD. (SChS)

RNDr. Jozef Tatiery, PhD. (SChS)

Mgr. Katarína Javorová (SChS)

Prof. Ing. Ján Labuda, DrSc. (STU, BA)

Ing. Michal Korenko, PhD. (SAV, BA)

Prof. Ing. Stanislav Biskupič, DrSc. (STU, BA)

Prof. RNDr. Jozef Čársky, CSc. (UK, BA)

Ing. Milan Vrška, CSc. (STU, BA)

Prof. RNDr. Dušan Kaniansky, DrSc. (UK, BA)

Doc. RNDr. Jozef Kuruc, PhD. (UK, BA)

Prof. Ing. Milan Remko, DrSc. (UK, BA)

Prof. Ing. Eubor Fišera, DrSc. (STU, BA)

Doc. Ing. Dušan Berek, DrSc. (SAV, BA)

Doc. Ing. Štefan Schmidt, PhD. (STU, BA)

Ing. Ján Hirsch, DrSc. (SAV, BA)

Prof. Ing. Peter Šimon, DrSc. (STU, BA)

Prof. Ing. Vasil Koprda, DrSc. (STU, BA)

Doc. Ing. Ján Reguli, PhD. (TU, TT)

Doc. RNDr. Ján Benko, CSc. (UK, BA)

Doc. RNDr. Martin Putala, PhD. (UK, BA)

Doc. RNDr. Taťána Gondová, CSc. (UPJŠ, KE)

Doc. RNDr. Mária Reháková, CSc. (UPJŠ, KE)

Doc. RNDr. Renáta Oriňáková, CSc. (TU, KE)

Prof. RNDr. Nadežda Števelová, PhD. (TU, KE)

RNDr. Slávka Hamuláková, PhD. (UPJŠ, KE)

Doc. RNDr. Mária Ganajová, CSc. (UPJŠ, KE)

Doc. RNDr. Magdaléna Bálintová, PhD. (TU, KE)

Ing. Elena Kulichová (Nováky)

Sekcie:

1. Analytická a fyzikálna chémia
2. Anorganická a materiálová chémia
3. Organická chémia a polyméry
4. Vyučovanie a história chémie
5. Životné prostredie a biotechnológia
6. CHEMPROGRESS

Konferenčný poplatok:

účastník, člen*	300 €
študent, doktorand, člen*	200 €
dôchodca, člen*	250 €
příplatok za nečlena	100 €
příplatok za jednolôžkovú izbu	150 €
sprevádzajúca osoba	250 €

* ASChFS, AČChS, SChS

Poplatok zahŕňa: konferenčné materiály, ubytovanie v dvojposteľovej izbe s plnou penziou (od večere 7. 9. po obed 11. 9.), uvítací večierok, vínný a pivný večer, prestávkové občerstvenie, slávnostný večierok, plaváreň, miestny poplatok, poistenie nákladov na zásah Horskej záchrannej služby.

Termíny:

Registrácia	do 1. júna 2009
Platba	do 1. júla 2009
Abstrakt	do 1. júla 2009

Registrácia po 1. 6. 2009 pri zaplnenej ubytovacej kapacite, bude navýšená o 100 € na zabezpečenie náhradného ubytovania.

Formy prezentácie:

Poster (800 mm šírka × 1 000 mm dĺžka)
Súťaže formou komentovaných posterov
študenti, doktorandi (ceny: 150, 100, 50 €)
vedci do 35 rokov (ceny: 300, 200, 100 €)

Prednáška

Formát MS Powerpoint
pozaná prednáška 40 min. + 10 min. diskusia
prednáška 20 min. + 5 min. diskusia
Panelová diskusia ako záver zjazdu

Abstrakt v časopise ChemZi 5/9 2009

Publikácia v nasledujúcich číslach ChemZi

Kontakt:

Slovenská chemická spoločnosť,
Radlinského 9/1111, 812 37 Bratislava,
fax: +421/2/52495205

e-mail: zjazd.chemikov@gmail.com

web: <http://www.schems.sk/61zjazd>

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	635	EDITORIAL	635
ZAHRADA		GARDEN	
Sledování reakcí pomocí synchrotronového záření jako jedinečný zdroj přesných energetických údajů o reakcích v plynné fázi J. Roithová a D. Schröder	636	Reactive Monitoring with Synchrotron Radiation as a Unique Source of Accurate Benchmark Data for Gas-Phase Reactions J. Roithová and D. Schröder	636
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
<i>Enterobacter sakazakii</i> alias <i>Cronobacter sakazakii</i> – nová hrozba? K. Demnerová a J. Pazlarová	641	<i>Enterobacter sakazakii</i> alias <i>Cronobacter sakazakii</i> – A New Menace ? K. Demnerová and J. Pazlarová	641
Přírodní drahé kameny a jejich využití ve šperkařství, architektuře a umění J. Jirásek, M. Vavro a J. Jiránek	647	Natural Gemstones and their Utilization in Jewellery. Architecture and Art J. Jirásek, M. Vavro, and J. Jiránek	647
Elektrochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby spektrálních analytických metod V. Červený, P. Rychlovský, J. Hraníček a J. Šíma	652	Electrochemical Generation of Volatile Compounds for Spectral Analytical Methods V. Červený, P. Rychlovský, J. Hraníček, and J. Šíma	652
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
On-line prekoncentrace na rozhraní elektrolytů o různém pH aneb krása kapilární elektroforézy J. Petr, V. Maier, J. Znaležiona, K. Vítková, V. Ranc a J. Ševčík	661	On-line Preconcentration on pH Boundary – the Beauty of Capillary Electrophoresis J. Petr, V. Maier, J. Znaležiona, K. Vítková, V. Ranc, and J. Ševčík	661
Stanovení hydroxylových a nitroxidových radikálů u deprese a hyperlipidémie elektronovou paramagnetickou rezonancí M. Zeman, P. Stopka, M. Vecka, A. Žák, A. Písaříková, R. Jiráček, B. Staňková, L. Vávrová, J. Kodydková, J. Křížová a J. Macášek	667	Electron Spin Resonance Determination of Hydroxyl and Nitroxide Radicals in Depressions and Hyperlipidemia M. Zeman, P. Stopka, M. Vecka, A. Žák, A. Písaříková, R. Jiráček, B. Staňková, L. Vávrová, J. Kodydková, J. Křížová, and J. Macášek	667
Separace některých lokálních anestetik kapilární zónovou elektroforézou za přítomnosti polyethylenglykolu P. Adamovský a Z. Stránský	672	Separation of Some Local Anesthetics by Capillary Zone Electrophoresis in the Presence of Poly(ethylene glycol) P. Adamovský and Z. Stránský	672
Vývoj metodiky extrakce na tuhé fázi a HPLC-MS pro stanovení deoxynivalenolu v ječmeni a sladu A. Ježková, J. Karasová, V. Dohnal a I. Polišenská	679	Development of Solid-Phase Extraction and HPLC/MS Methods for Deoxynivalenol Determination in Barley and Malt A. Ježková, J. Karasová, V. Dohnal, and I. Polišenská	679
CHEMICKÝ PRŮMYSL		CHEMICAL INDUSTRY	
Zvyšování účinnosti odfenolování naftalenového oleje Q. Smejkal, M. Zgabaj a J. Obermajer	684	Improving Effectiveness of Separation of Phenols from the Naphtalene Fraction Q. Smejkal, M. Zgabaj, and J. Obermajer	684
VÝUKA CHEMIE		EDUCATION IN CHEMISTRY	
Jakými veličinami popsat reakční rychlost? K. Wichterle a J. Wichterlová	687	How To Define the Reaction Rate K. Wichterle and J. Wichterlová	687
DISKUSE	689	DISCUSSION	689
RECENZE	691	BOOK REVIEWS	691

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 103 (2009), čís./no. 8 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 133, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 119 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/ CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Haníka, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2009 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plně předplatné 2009 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBÓN & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2008 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: D. Hnyk • Dáno do tisku 24.7.2009.