

Dlouhá cesta k novému léku

Naše chemická veřejnost jistě zaznamenala, že při příležitosti státního svátku 28. října 2002 udělil prezident Václav Havel medaili Za zásluhy RNDr. Antonínu Holému, DrSc., Dr.h.c., z Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky jako ocenění jeho vynikajících vědeckých výsledků. O úspěšné výzkumné práci vyznamenaného informovaly sdělovací prostředky v souvislosti s uvedením nového léku proti hepatitidě B, založeného na preparátu s generickým názvem **adefovir**, který byl objeven právě v laboratoři Dr. A. Holého. Je však nutno uvést, že zmíněný nový lék proti hepatitidě B s názvem **HepseraTM** je již třetím protivirovým léčivem, pocházejícím ze spolupráce skupiny Dr. A. Holého na ÚOCHB, kolektivu profesora E. De Clercq z Rega Institutu Katolické univerzity z belgického Leuvenu a americké farmaceutické firmy Gilead Sciences.

K těmto významným praktickým uplatněním výzkumných výsledků Dr. A. Holého došlo v posledních několika letech, jejich společným základem je však jeho dlouhodobá systematická a úspěšná vědecká práce. O její podstatě a o složitosti a úskalích cesty od objevu účinné látky ke schválenému léku je vhodné uvést na stránkách Chemických listů některé bližší údaje.

Dr. A. Holý se zabývá výzkumem nukleosidových a nukleotidových antimetabolitů od šedesátých let. Tyto látky jsou studovány pro možné uplatnění jako léčiva především proti nádorovým a virovým onemocněním, mohou však působit i na vnitrobuněčná stadia parazitů. Funkce těchto antimetabolitů je založena na takové změně struktury, která jim na jedné straně umožní vstupovat do procesu syntézy molekul nádorové nebo virové DNA na místě přirozených nukleotidů, ale na straně druhé způsobí inhibici enzymů syntézy DNA nebo produkci nefunkčních nebo nekompletních fragmentů takto modifikované DNA. Nalezení strukturálních změn s tímto ideálním důsledkem není jednoduchou záležitostí. Na závadu často bývá vysoká toxicita vůči hostitelským buňkám (málo selektivní účinek), rychlé odbourávání v organismu nebo nevhodné vlastnosti pro transport do cílové buňky.

Na počátku osmdesátých let dospěla skupina Dr. A. Holého k velmi úspěšným strukturálním modifikacím přirozených nukleotidů. K významným strukturálním změnám patřilo nahrazení cukerného pentosového cyklu vhodným acyklickým fragmentem. Dále se ukázalo velmi výhodné zavést místo fosforylované hydroxylové skupiny etherově vázanou fosfonomethyl

skupinu, která nemůže být enzymy odbourávána. Z velké série těchto fosfonátů acyklických nukleosidů jich celá řada vykazovala vysokou antivirovou účinnost.

První skupina těchto látek je účinná na DNA viry, které způsobují opary, pásový opar, oční infekce, mononukleosu, genitální herpes, cytomegalovirové infekce, virový papilom a další choroby. Sem patří preparát **cidofovir**, který je základem léku **VistideTM**, schváleného v roce 1996 původně k léčbě cytomegalovirové retinitidy u pacientů s AIDS. Ten je navíc nyní středem nového zájmu pro své vynikající účinky proti viru varioly (pravých neštovic) – možného nástroje bioterorismu.

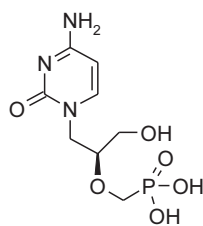
Druhá skupina látek se vyznačuje účinky proti DNA virům, retrovirům a viru HBV, studuje se i možnost jejich použití jako cytostatik. Do této skupiny patří preparát adefovir, účinná forma léku **HepseraTM**, nyní nově schváleného pro obecné použití k léčbě hepatitidy B.

Do třetí skupiny patří sloučeniny účinné především proti AIDS (retroviru HIV). Jejich představitelem je preparát **tenofovir**, účinná složka léku proti AIDS **VireadTM**, uvedeného do léčebné praxe v roce 2001.

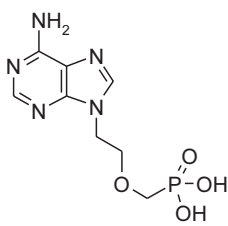
Jsou připraveny i další skupiny derivátů tohoto strukturálního typu, které jsou nyní v různých fázích biologického testování.

Vrátme se však k novému léku proti hepatitidě B. **Adefovir**, který je jeho účinnou složkou, byl publikován poprvé v roce 1986 (De Clercq E., Holý A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzarini J., Maudgal P. C.: *Nature* 323, 464 (1986)), kdy byla prezentována jeho vysoká antivirová účinnost. Následně byly uvedeny podrobnosti jeho syntézy (Holý A., Rosenberg I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 52, 2801 (1987); Holý A., Rosenberg I., Dvořáková H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 54, 2190 (1989)). Datování publikací ukazuje, jak dlouhé bylo období od objevu účinné látky k nyní nově schválenému léčivu. Přitom kdybychom pro tento konkrétní případ chtěli vyjádřit dobu od etapy základního výzkumu až po uplatnění výsledků v praxi, museli bychom připočítat i roky výzkumu před objevem adefoviru, ve kterých se skupina Dr. A. Holého propracovala k úspěšným nukleotidovým antimetabolitům tohoto strukturálního typu.

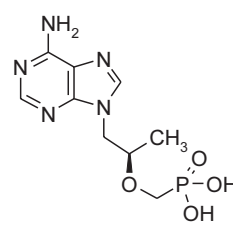
Celý vývoj nového léku stál v tomto období české, belgické i americké partnerské strany značné úsilí a bylo vynaloženo nesmírné množství finančních prostředků (řádově stovek milionů dolarů), investovaných především farmaceutickou fir-



cidofovir
(S)-HPMPC



adefovir
PMEA



tenofovir
(R)-PMPA

*inou Gilead Sciences. Organizace a finanční a materiálové zabezpečení všech fází klinických zkoušek jsou obecně natolik finančně náročné a přitom rizikové, že nebylo možné hledat spolupracující farmaceutickou firmu v České republice. V případě **adefoviru** se jasně projevila míra rizika, které musí farmaceutická firma vyvíjející nový preparát unést. **Adefovir** byl původně uvažován jako prostředek pro léčení AIDS. Všechny etapy testování proběhly úspěšně a až v závěrečné fázi se ukázalo, že u některých pacientů vyvolávají potřebné dávky léku nežádoucí vedlejší reakce. Preparát byl proto z klinických zkoušek stažen a dosud vynaložené úsilí a finanční prostředky se zdály být ztracené. Jen díky komplexnímu studiu jeho antivirové aktivity byl preparát „překvalifikován“ a úspěšně prošel všemi etapami zkoušek jako lék proti hepatitidě B. Závěrečné otevřené klinické zkoušky podle přísného protokolu provedla firma Gilead Sciences u 2000 pacientů s jednoznačně kladným výsledkem. Výhoda toto léku spočívá v jeho účinnosti i při léčení chronické formy tohoto onemocnění, kdy se často vytváří u pacientů mutantní HBV viry, rezistentní vůči dosud nejúspěšnějšímu preparátu lamivudinu. V důsledku vysoké účinnosti proti viru hepatitidy B postačuje jeho malé dávkování, které pacienty nezatěžuje, a nežádoucí vedlejší účinky jsou tak minimalizovány. Ani po 48 týdenní terapii nebyl zjištěn výskyt mutantního viru rezistentního vůči novému léku.*

Objevitelský vklad Dr. A. Holého, jeho kolektivu na pražském akademickém ústavu a spolupracujících belgických kolegů byl úsilím pracovníků Gilead Sciences vysoce zhodnocen. Všechny tři látky, které byly již na počátku spolupráce vybrány pro další vývoj, se staly základem léků proti nebezpečným virovým chorobám. Tuto skutečnost hodnotí Dr. A. Holý jako mimořádný úspěch podmíněný šťastnou volbou partnerské farmaceutické firmy.

Tato úspěšná spolupráce má i podstatný ekonomický efekt ve formě licenčních poplatků, které dostává Ústav organické chemie a biochemie a formou daně i český stát. Díky těmto

prostředkům bylo možno podpořit základní výzkum na tomto ústavu značnými investicemi do nákladného přístrojového vybavení a dále například do počítačové sítě a audiovizuální techniky. Vedle finančního a léčebného přínosu pro celou naši společnost je nutno uvést i morální profit. Ten se snad projeví zvýšením společenské prestiže vědecké práce a dokonce i posílením obecného občanského sebevědomí před vstupem naší republiky do Evropské unie. Proto je nedávné ocenění Dr. A. Holého státním vyznamenáním vysoce zasloužené.

Projekt výzkumu nukleotidových analogů zaměřený na terapii virových onemocnění, leukémie a zhoubných nádorů je nadále jedním z předních výzkumných záměrů Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Podstatná část tohoto výzkumu se stala součástí komplexu, který byl v roce 2001 oceněn prestižní Descartovou cenou Evropské unie. Skutečnost, že se tohoto projektu účastnilo celkem 6 evropských laboratoří, je dokladem významu mezinárodní spolupráce v základním výzkumu.

Vývoj nukleotidových antimetabolitů byl v posledních letech podporován Grantovou agenturou ČR, Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví, měl zahraniční finanční podporu od americké agentury AmFAR, od Evropské unie v programech PECO a COST a v současnosti je podporován jako cílový projekt GA AV ČR a formou tříletého grantu spojeného s Descartovou cenou. Můžeme tak doufat v objevení nových účinných preparátů. Možná ani uvedení dalšího nového léku z laboratoře Dr. A. Holého na sebe nenechá dlouho čekat, protože některé nově objevené účinné látky již mají kus dlouhé cesty ke schválení nového léku za sebou.

Autor příspěvku děkuje Dr. Antonínu Holému, DrSc., Dr.h.c., s nímž ho pojí společné akademické pracoviště a shodou okolností i stejné příjmení, za poskytnuté podkladové materiály a věcnou diskusi k problematice.

P. Holý

POSTRADIAČNÍ STÁRNUTÍ IMPLANTÁTŮ Z VYSOKOMOLEKULÁRNÍHO POLYETHYLENU

JITKA ROTSCHOVÁ

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

Došlo 11.4.02, přepracováno 27.4.02, přijato 17.5.02.

Klíčová slova: UHMWPE, kloubní endoprotézy, sterilizace, oxidační degradace

Obsah

1. Úvod
2. Vliv sterilizace na degradaci polyethylenu
3. Analýza produktů degradace
4. Závěr

1. Úvod

V posledních třiceti letech je vysokomolekulární polyethylen (UHMWPE) hlavním materiálem používaným pro výrobu různých komponent kloubních endoprotéz (poprvé byl implantován jako kyčelní kloub v roce 1964). Ačkoli byl vybrán z ostatních typů polyethylenu jako nejvhodnější po stránce chemické i fyzikální i pro svou dobrou biokompatibilitu, ukázalo se, že komponenty ortopedických implantátů z UHMWPE mají poměrně krátkou životnost v biologickém prostředí lidského těla (*in vivo*). Dochází k únavě a opotřeбенí materiálu (deformace povrchových vrstev, vznik trhlin) a k osteolýze. Následkem toho jsou po relativně krátké době nutné reoperace pacientů. U vyoperovaných implantátů byly zjištěny změny mechanických, fyzikálních i chemických vlastností. Tyto změny jsou způsobeny kombinací oxidační degradace při zpracování i sterilizaci před použitím a mechanické degradace a biodegradace v živém organismu.

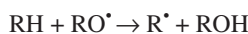
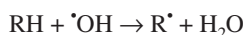
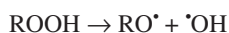
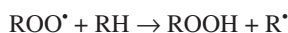
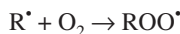
2. Vliv sterilizace na degradaci polyethylenu

Jedním z nejdůležitějších procesů je degradace γ -zářením při sterilizaci před lékařskými aplikacemi. Tento způsob sterilizace je v praxi používán nejčastěji (výjimečně se sterilizuje ethylenoxidem). Obvykle se používá zdroj záření ^{60}Co , dávky záření 2,5 Mrad a rychlosti 0,2–1,5 Mrad.h⁻¹ (cit.¹). Vliv ozařování na molekulovou strukturu, morfologii krystalů a mechanické vlastnosti UHMWPE byl několikrát studován s různými výsledky v závislosti na velikosti dávek záření, rychlosti ozařování, expozičních časech, teplotě a sterilizačním prostředím². Podle dosavadních poznatků může být implantát sterilizací znehodnocen tak, že se po několika letech rozpadá.

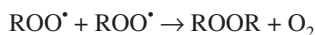
Při expozici polymeru γ -zářením je iniciační reakcí homolytické štěpení vazeb C–H nebo C–C za tvorby radikálů:



kde R představuje polymerní řetězec. Radikály H[•] mají krátkou životnost a okamžitě zanikají. Polymerní radikály R[•] (primární alkyldradikály) mohou reagovat mnoha dalšími způsoby, např. rekombinací, disproporcionací nebo přenosem řetězce^{3–5}. Rekombinací se obnovuje původní molekula polyethylenu, disproporcionace způsobuje štěpení polymerních řetězců a vznik dvojných vazeb, přenos vede k sífování. V přítomnosti kyslíku rozpuštěného v polymeru nebo kyslíku, který proniká difuzí zvnějšku, probíhají oxidační reakce radikálů R[•] za tvorby peroxyradikálů, alkoxyradikálů a hydroperoxidů:



Terminálními reakcemi vznikají dialkylperoxydily a zároveň zanikají radikály:



Hydroperoxydily a dialkylperoxydily jsou nestálé a snadno reagují na karbonylové sloučeniny (aldehydy, ketony, kyseliny, estery), které jsou konečnými produkty těchto reakcí. Při tom se tvoří nové alkyldradikály reagující dále řetězovým mechanismem. S časem se zvyšuje jak rozsah oxidace, tak rozsah štěpení řetězců.

Oxidační reakce probíhají ve velkém rozsahu při ozařování a skladování na vzduchu, v menším rozsahu i při výrobě, kdy do polymeru volně difunduje atmosférický kyslík. Protože mobilita polymerních řetězců při vysoké molekulové hmotnosti UHMWPE (4 miliony) je velmi malá, vzniklé makroradikály přetrvávají v aktivním stavu v materiálu po mnoho let a jsou schopné kdykoli za vhodných podmínek, např. při styku s difundovaným kyslíkem, reagovat. Důsledkem jsou změny fyzikálních a mechanických vlastností polymeru, které jsou projevem postradiačního stárnutí. Štěpení polymerních řetězců zvyšuje mobilitu molekul a vede k následné krystalizaci. Zvyšuje se hustota, snižuje molekulová hmotnost, vznikají karbonylové skupiny, mění se napětové vlastnosti a další mechanické vlastnosti – jako lomivost, tvrdost, odolnost vůči tečení (creepu), únavě materiálu apod. Zvyšuje se i množství

nízkomolekulárních extrahovatelných složek, zatímco jejich molekulová hmotnost se snižuje. Limitujícím faktorem těchto postradiačních procesů je difuze atmosférického kyslíku do hmoty polymeru.

3. Analýza produktů degradace

Hlavní část literatury z posledních let se týká právě studia mechanismu postradiačního stárnutí implantátů z UHMWPE sterilizovaných γ -zářením a analýzami oxidačních produktů vznikajících při postradiačních reakcích. Tyto reakce probíhají již před použitím při skladování (někdy i po řadu let) na vzduchu. Přitom dochází k zásadním degradačním změnám. Studium radikálů s dlouhou životností při postradiačním stárnutí pomocí ESR spektroskopie se zabývá literatura^{6,7}. Tato technika se používá k monitorování vzniku a životnosti radikálů, ke studiu jejich přeměn apod. K detekci peroxylátek byla použita Ramanova spektroskopie^{8,9}. Infračervená spektroskopie (IČ) s technikami Fourierovy transformace a odrazového měření je široce používána ke studiu oxidační degradace polymerů. Hlavní oblasti v IČ spektrech pro detekci vzniku produktů a sledování změn jejich koncentrace během stárnutí jsou oblast volných a asociovaných skupin OH hydroperoxidů ($3190\text{--}3640\text{ cm}^{-1}$), oblast karbonylů ($1670\text{--}1785\text{ cm}^{-1}$), oblast dvojných vazeb (přibližně 1645 a $850\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$), z toho oblast vinylnů (909 a 995 cm^{-1}), vinylidenů (888 cm^{-1}) a vinylenů (965 cm^{-1}) (cit.^{1,3-5,10-18,26,31}). Stupeň degradace charakterizují v IČ spektrech indexy absorpčních pásů definované jako poměr absorpance studovaného pásu k absorpanci referenčního pásu (jeho velikost se nemění během degradace a odpovídá tloušťce vzorku) počítané buď z výšky nebo plochy odpovídajících píků. Pro UHMWPE jsou uváděny referenční pásy (absorbance CH skupin jak v amorf- ní, tak v krystalické oblasti PE) s vlnočty $1360\text{--}1370$, 1458 , 1468 a 2020 cm^{-1} (cit.^{1,4,5,11,26,31}). Pro vzorky UHMWPE s nízkým až středním stupněm oxidace je absorpance referenčního pásu relativně nezávislá na rozsahu oxidace a je přímo úměrná tloušťce vzorků. Pro značně zoxidované vzorky nebo pro velmi tenké a naopak velmi tlusté vzorky však toto přesné neplatí a může dojít ke značným nepřesnostem v kvantitativním vyhodnocení rozsahu oxidace²⁶. Nejčastěji je pro kvantitativní analýzy užíván tzv. karbonylový index CI, který charakterizuje změny v oblasti karbonylů (např. $CI = A_{1720}/A_{1370}$) (cit.⁹) a hydroxylový index HI. Ten se neměří přímo z absorpance peroxylátek (nízká široká maxima), ale po přeměně na nitráty s absorpčními pásy 1276 a 1632 cm^{-1} pro ROOH (cit.³²). Touto metodou lze zároveň zjistit změny krystalinity jako poměr absorpance „krystalického“ a „amorfního“ pásu (A_{1894}/A_{1303} nebo A_{1473}/A_{1463}) (cit.^{8,10,14,31}) v kombinaci s metodou DSC (cit.^{1,14,19,20}). Změny morfologické struktury byly studovány pomocí elektronové mikroskopie^{10,12,14,16,21}. Mechanickými změnami se zabývá literatura^{20,22-24}.

Z měření IČ spekter^{2,4,15} bylo zjištěno, že při dlouhodobém skladování (několik let) s časem prudce roste koncentrace karbonylových skupin. Zpočátku se tvoří karbonyly jen na povrchu, později byly zjištěny i v podpovrchových vrstvách. Časem vzrůstá podpovrchová koncentrace karbonylů, takže v určité fázi je jejich koncentrace pod povrchem (jeden a více mm) vyšší než na povrchu. Maximum koncentrace karbonylů je v hloubce 2 mm . Názory na to, proč je v této hloub-

ce CI maximální, se různí^{9,32}. Tvoří se převážně ketony (při 1713 cm^{-1} absorpce dialkylketonů). Např. po 285 dnech stárnutí vzrostla koncentrace karbonylových skupin ze 7.10^{-5} na $1.1.10^{-3}$ skupin CO na monomerní jednotku (cit.³). V oblastech polymeru s větší koncentrací karbonylů (tzv. „bílé pásy“) roste hustota a krystalinita. Po několika letech dochází v těchto místech k úplné ztrátě původních mechanických vlastností, tj. ke zkrěhnutí a praskání materiálu. Podobné změny probíhají i během implantace v lidském těle^{1,25,26}, kdy se tyto procesy kombinují s chemickými a mechanickými vlivy biologického prostředí. S dobou implantace se dále zvyšuje hustota. Zvýšení je nižší na vnější straně jamky, kde je menší kontakt se synoviální kapalinou. Změny závisejí i na velikosti namáhání. Minimální změny hustoty byly zaznamenány uprostřed hmoty jamek. S dobou implantace se zvyšuje i koncentrace nízkomolekulárních látek. Z IČ spekter jsou patrné nárůsty koncentrace vazeb C–O (1172 cm^{-1}) a karbonylů RCOOR (1715 cm^{-1}), C=O (1720 cm^{-1}), RCHO (1733 cm^{-1}), COOR (1740 cm^{-1}). Nejvíce roste aldehydový pás^{19,27,28}. Změny jsou opět menší na vnější straně jamek. S těmito změnami souvisí i následná krystalizace a pokles průměrné molekulové hmotnosti. Snížení molekulové hmotnosti v povrchové vrstvě vyoperovaných implantátů je až desateronásobné¹¹. Příčinou různé oxidační rychlosti ve vnější a vnitřní části kloubní jamky a různorodosti oxidačních produktů je pravděpodobně vliv agresivního prostředí synoviální kapaliny, která obsahuje peroxidy, např. H_2O_2 , a jejich složení se u různých pacientů liší.

4. Závěr

Ze studií prováděných jednak na modelových systémech, jednak na implantátech po vyjmutí z lidského těla vyplývá, že celkový rozsah oxidace značně kolísá v závislosti na typu a způsobu zpracování polymeru, na atmosféře, době a intenzitě ozářování, na době a způsobu skladování (způsob balení a teplota) a době použití *in vivo*.

V poslední době je proto věnována značná pozornost zlepšení odolnosti medicijního UHMWPE vůči oxidační degradaci neklasickými způsoby (UHMWPE totiž v těchto případech nelze stabilizovat klasickými chemickými antioxidanty, výjimkou je pouze použití vitamínu E jakožto přírodního stabilizátoru³³). Nejrychlejší cestou ke zlepšení odolnosti UHMWPE pro lékařské aplikace, tj. ke snížení koncentrace radikálů ve sterilizovaných vzorcích, je zahřívání materiálu na vyšší teplotu. Tím se dosáhne zvýšení pohyblivosti řetězců polymeru a síťování. Pro vztah mezi reakční teplotou a rychlostí platí Arrheniova rovnice. Toto tzv. ztužování teplem (annealing) popisuje literatura^{4,6}. Výsledky závisejí na době a podmínkách tohoto procesu. Ve vzduchu je proces rychlejší než ve vakuu. Např. zahříváním sterilizovaného UHMWPE na $85\text{ }^\circ\text{C}$ na vzduchu po dobu 120 h byly zničeny všechny volné alkyldradikály⁶. Moderní metody využívají kombinace zahřívání vzorků (až do teploty tání) ve vakuu a pak další sterilizace ethylenoxidem k ochraně proti znovuvytvoření radikálů, popř. doplněné ještě vymrazováním^{29,30}. Další možností, jak zvýšit odolnost, je zabránění přístupu vzduchu k implantátům z vysokomolekulárního polyethylenu při sterilizaci a skladování. Byly vyvinuty speciální vakuové obalové folie nepropustné pro kyslík, do kterých se součástky zatavují už před sterilizací⁹.

Autorka děkuje za finanční podporu Akademii věd České republiky, Program podpory cíleného výzkumu a vývoje, projekt č. S4050009.

LITERATURA

1. Eyerer P., Cai Ke Yu: *J. Biomed. Mater. Res.* **18**, 1137 (1984).
2. Premnath V., Harris W. H., Jasty M., Merrill E. W.: *Biomaterials* **17**, 1741 (1996).
3. Birkinshaw C., Buggy M., Daly S., O'Neill M.: *Polym. Degrad. Stab.* **22**, 285 (1988).
4. O'Neill P., Birkinshaw C., Leahy J. J., Buggy M., Ashida T.: *Polym. Degrad. Stab.* **49**, 239 (1995).
5. Costa L., Luda M. P., Trossarelli L.: *Polym. Degrad. Stab.* **55**, 329 (1997).
6. O'Neill P., Birkinshaw C., Leahy J. J., Barklie R.: *Polym. Degrad. Stab.* **63**, 31 (1999).
7. Trieu H. H., Thomas D. E., Shah J. M., Haggard W. O., Conta R. L., Parr J. E.: *ASTM Spec. Tech. Publ.* **1307**, 109 (1998).
8. Chenery D. H.: *Biomaterials* **18**, 415 (1997).
9. Coote C. F., Hamilton J. V., Mc Gimpsey W. G., Thompson R. W.: *J. Appl. Polym. Sci.* **77**, 2525 (2000).
10. Goldman M., Gronsky R., Long G. G., Pruitt L.: *Polym. Degrad. Stab.* **62**, 97 (1998).
11. Brach del Prever E. M., Crova M., Costa L., Dallera A., Camino G., Gallinaro P.: *Biomaterials* **17**, 873 (1996).
12. Baker D. A., Hastings R. S., Pruitt L.: *Polymer* **41**, 795 (2000).
13. Lee A. W., Santerre J. P., Boynton E.: *Biomaterials* **21**, 851 (2000).
14. Zuo Q., Hulbert S. F.: *Adv. Sci. Technol.* **28**, 145 (1999).
15. Daly B. M., Yin J.: *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 523 (1998).
16. Poggie R., Takeuchi M., Averill R., Nasser S.: *ASTM Spec. Tech. Publ.* **1307**, 120 (1998).
17. Goldman M., Lee M., Gronsky R., Pruitt L.: *J. Biomed. Mater. Res.* **37**, 43 (1997).
18. Costa L., Luda M. P., Trossarelli L.: *Polym. Degrad. Stab.* **58**, 41 (1997).
19. Carotenuto G., Nicolais L.: *Polym. News* **21**, 395 (1996).
20. Deng M., Shalaby S. W.: *J. Biomed. Mater. Res.* **54**, 428 (2001).
21. Kurtz S. M., Pruitt L. A., Crane D. J., Edidin A. A.: *J. Biomed. Mater. Res.* **46**, 112 (1999).
22. Edidin A. A., Jewett C. W., Kalinowski A., Kwarteng K., Kurtz S. M.: *Biomaterials* **21**, 1451 (2000).
23. Kurtz S. M., Rimmnac C. M., Bartel D. L.: *J. Biomed. Mater. Res.* **43**, 241 (1999).
24. Kennedy F. E., Currier J. H., Plumet S., Duda J. L., Gestwick D. P., Collier J. P., Currier J. H., Dubourg M.-C.: *J. Tribol.* **122**, 332 (2000).
25. Muratoglu O. K., Imlach H., Jasty M., Harris W. H.: *ASTM Spec. Tech. Publ.* **1307**, 79 (1998).
26. Shen F.-W., Yu Y.-J., Mc Kellop H.: *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 203 (1999).
27. Costa L., Luda M. P., Trossarelli L., Brach del Prever E. M., Crova M., Gallinaro P.: *Biomaterials* **19**, 1371 (1998).
28. Carotenuto G., Di Palo M., Marino G., Ambrosio L., Nicolais L.: *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **8**, 481 (1997).
29. Chiesa R., Tanzi M. C., Alfonsi S., Paracchini L., Moscatelli M., Cigada A.: *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 381 (2000).
30. Saum K. A., Sanford W. M., Dimaio W. G., Howard E. G.: *Patent Appl.* WO 9814223A19 (1998); *Chem. Abstr.* **128**, 286415 (1998).
31. Tretinnikov O. N., Fujita S.-I., Ogata S., Ikada Y.: *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **37**, 1503 (1999).
32. Yu Y.-J., Shen F.-W., McKellop H. A., Salovey R.: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **37**, 3309 (1999).
33. Tomita N., Kitakura T., Onmori N., Ikada Y., Aoyama E.: *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 474 (1999).

J. Rotschová (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Postirradiation Ageing of High-Molecular-Weight Polyethylene Implants**

The review summarizes literature data on degradation changes of UHMWPE prosthetic implants during γ -radiation sterilization, storage and implantation in human body. Extensive oxidative changes may reduce the resistance of implants to wear, provoke osteolysis and shorten clinical life of prostheses. Therefore the extent of oxidation must be characterized by special analytical methods.

KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRRAFIE

LEONA KVASNIČKOVÁ^a, ZDENĚK GLATZ^{b,*},
VLADISLAV KAHLE^c

^aZdravotní ústav se sídlem ve Zlíně, pracoviště Uherské Hradiště, ^bKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^cÚstav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno

e-mail: glatz@chemi.muni.cz

Došlo 5.3.02, přepracováno 13.11.02, přijato 5.12.02.

Klíčová slova : kapilární elektrochromatografie, elektroosmotický tok, kolony, instrumentace, aplikace

Obsah

1. Úvod
2. Elektroosmotický tok
3. Kolony používané v kapilární elektrochromatografii
4. Instrumentace
5. Aplikace
6. Závěr

1. Úvod

Pokrok v řešení analytických problémů v biochemii, molekulární biologii, chemii životního prostředí, farmakologii i průmyslu je podmíněn využitím moderních separačních metod. Mezi ně patří též kapilární elektrochromatografie (capillary electrochromatography, CEC). Tato relativně nová metoda se v současné době prudce rozvíjí, o čemž rovněž svědčí exponenciálně vzrůstající počet publikovaných prací.

CEC je vysokoučinná separační metoda, založená na spojení kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární zónové elektroforézy (CZE). Zatímco HPLC využívá ke generování toku rozdílu tlaku, v CEC je pohyb kapalné mobilní fáze zprostředkován elektrickým polem, které způsobuje elektroosmotický tok (electroosmotic flow, EOF). CEC si přitom zachovává výhody obou metod, ze kterých vzešla: vyšší účinnost a jednoduchost instrumentace pocházející z CZE a vyšší selektivitu a kapacitu kolony danou interakcí se stacionární fází jako v HPLC. K separaci analytů dochází u CEC převážně dvojím mechanismem. Elektroneutrální i ionizované látky jsou stejně jako v chromatografii separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází, respektive na základě síťového efektu v případě gelové permeační chromatografie. Látky ionizované se navíc pohybují v elektrickém poli rych-

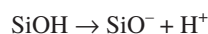
lostí danou jejich efektivními mobilitami, což také přispívá k větší selektivitě vlastní separace.

První experiment, při němž bylo v kapalinové chromatografii aplikováno elektrické pole, provedl již v roce 1939 Strain^{1,2}. Tuto metodu použil pro separaci barviv a dokázal, že kombinací elektroforézy a adsorpční chromatografie lze dosáhnout výrazného zlepšení selektivitu. Termín elektrochromatografie zavedl v roce 1943 Beraz³, a to při popisu uspořádání papírové elektroforézy. Elektrické pole využil v roce 1949 k transportu látek gelovou strukturou také Tisselius⁴. Podobné pokusy prováděli v roce 1952 Mould a Syngé⁵. Ve své práci se zabývali působením elektrického pole v tenkovrstvé chromatografii (TLC) a v roce 1954 pak publikovali práci⁶ věnovanou separaci polysacharidů. Aplikaci elektrického pole na chromatografickou kolonu se v roce 1974 podrobněji věnoval Pretorius⁷. Jako první použil EOF k migraci nenabitých látek náplňovou kolonou o vnitřním průměru 1 mm. Jeho výsledky ukázaly velmi zajímavé možnosti, které nabízí použití EOF v chromatografii. Důležitým mezníkem ve vývoji CEC byla práce Jorgensona a Lukacsové⁸. Ti v roce 1981 ukázali možnosti uplatnění EOF v náplňových kapilárních kolonách. Provedli separaci 9-methylantracenu a perylenu na koloně o vnitřním průměru 170 μm naplněné 10 μm částicemi Partisil ODS-2 za použití mobilní fáze obsahující acetonitril, napětí 30 kV a fluorescenční detekce, tj. za velmi podobných podmínek, za jakých se v CEC pracuje dodnes. Tato jejich práce a práce Knoxe a Granta^{9,10}, kteří používali 5 μm částice, ukázaly, že EOF je atraktivní alternativou k hydrodynamickému tlaku využívanému v HPLC.

Cílem tohoto článku je krátké seznámení s problematikou kapilární elektrochromatografie, stručný popis teoretických základů, používané instrumentace a možných aplikací. Podrobnější informace lze nalézt v řadě přehledných článků^{11–20} a také ve třech monografiích, které vyšly v nedávné době^{21–23}.

2. Elektroosmotický tok

Jedním ze základních jevů, který se spolupodílí na separaci v CZE, je elektroosmosa, respektive EOF. Jde o tok elektrolytu v separační kapiláře způsobený přítomností nabitých skupin v její stěně. Křemenná kapilára, která je nejčastěji používaným typem kapiláry v CZE, obsahuje ve své stěně ionizovatelné silanolové skupiny SiOH. V přítomnosti základního elektrolytu při pH > 2 dochází k jejich disociaci:



a stěna kapiláry tak získává záporný náboj. Ten přitahuje kladně nabitě ionty základního elektrolytu, které u stěny kapiláry vytvářejí stabilní elektrickou dvojrivrstvu. Zatímco vrstva kationtů v těsném kontaktu se stěnou kapiláry je fixována (Sternova vrstva), kationty vzdálenější vytvářejí pohyblivou

* Autor pro korespondenci

difuzní (Guyovu-Chapmanovu) vrstvu (obr.1). Pokud je na kapiláru přivedeno stejnosměrné elektrické napětí, kationty difuzní vrstvy začnou migrovat k záporné elektrodě – katodě. Jelikož jsou solvatovány, začne se ke katodě pohybovat i elektrolyt přítomný v kapiláře. Tento pohyb je označován jako EOF.

Jak již bylo zmíněno, v CEC je pohyb mobilní fáze dán EOF. U kapilárních kolon pro CEC, plněných silikagelovými mikročásticemi, přispívá k EOF kromě náboje stěny kapiláry také povrchový náboj částic. U kolon polymerních a povrchově modifikovaných musí stacionární fáze pro tvorbu EOF ve své struktuře obsahovat ionogenní skupiny, neboť povrchový náboj kapiláry je eliminován. Díky tomu, že EOF je generován v celém objemu kapiláry, je jeho rychlostní profil téměř písťový, na rozdíl od toku působeného rozdílem tlaku (obr. 2). Rychlost EOF přitom téměř nezávisí na průměru kapiláry. Dochází tím k menšímu rozmývání zón analyzovaných látek, což přispívá k vyšší účinnosti separace.

Lineární rychlost elektroosmotického toku v_{EOF} lze vyjádřit Hunterovou rovnicí¹¹:

$$v_{EOF} = \frac{\sigma \left[\frac{\epsilon_0 \epsilon_r RT}{2cF^2} \right]^{1/2} E}{\eta}$$

kde ϵ_0 je permitivita vakua; ϵ_r permitivita, c koncentrace a η viskozita mobilní fáze, respektive základního elektrolytu, E intenzita elektrického pole; σ nábojová hustota na povrchu rozhraní, F Faradayova konstanta, R univerzální plynová konstanta a T absolutní teplota. Z výše uvedeného vztahu vyplývá, že EOF závisí na mnoha faktorech, které mohou mít vliv, respektive mohou být využity pro optimalizaci vlastní separace jak v CZE, tak i CEC.

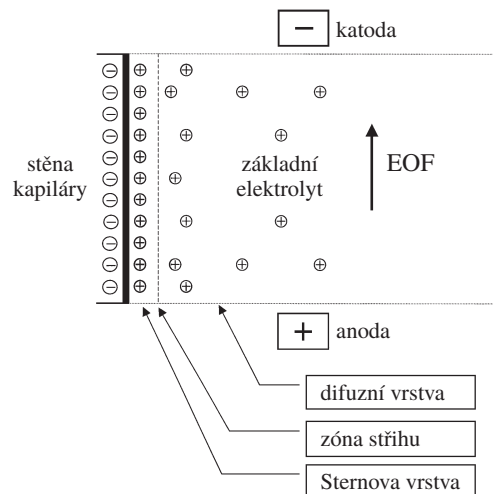
3. Kolony používané v kapilární elektrochromatografii

Z hlediska umístění stacionární fáze existují v CEC dva základní typy kapilárních kolon: náplňové a povrchově modifikované. U náplňových kolon je kapilára naplněna příslušnou stacionární fází zcela nebo po detekční okénko, přičemž podle typu stacionární fáze se náplňové kolony dále rozdělují na kolony plněné mikročásticemi jako v případě HPLC a kolony plněné kontinuální (monolitickou) stacionární fází.

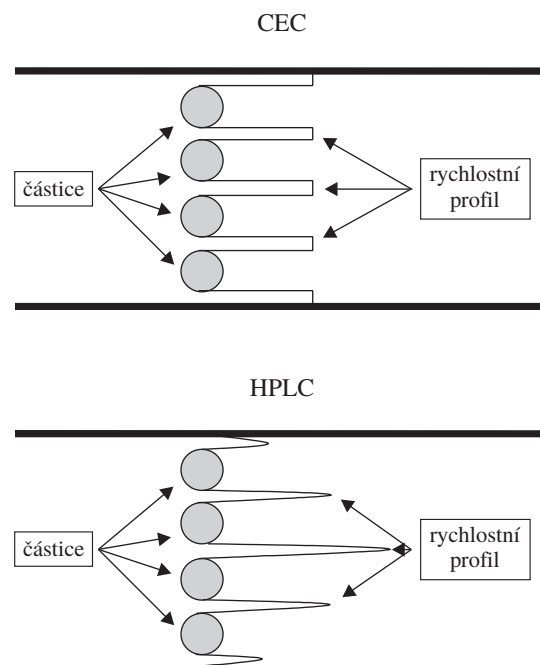
Použití kolon plněných mikročásticemi v současné době převažuje. Mikročástice nesou chemicky vázanou stacionární fázi a jsou v koloně zadržovány vstupní a výstupní fritou. Nejčastěji jde o silikagelové sorbenty pro HPLC o velikosti částic 1,5–5 μm . Na trhu jsou však již dostupné stacionární fáze vyráběné speciálně pro CEC, jsou to například CEC 3 μm ODS1 (Phase Separation) a CEC 3 μm C18 (Hypersil). Vnitřní průměr kolony se zpravidla pohybuje mezi 50 až 135 μm . Mikročásticové kolony pro CEC jsou již komerčně dostupné, jejich cena je však zatím poměrně vysoká, a tak většina laboratoří si připravuje kolony vlastní.

Nejpoužívanější metodou pro plnění kolon je plnění tlakové, kdy je suspenze stacionární fáze v organickém rozpouštědle plněna z rezervoáru do kolony HPLC pumpou^{24–26}. Dále je možné k naplnění kolony použít²⁷ superkritického CO_2 , odstředivé síly²⁸ nebo gravitace²⁹. Pro elektrokinetické plnění

kolon byl rovněž úspěšně využit EOF (cit.³⁰). Ačkoli se metodami plnění kolon zabývá velké množství publikací, je tato operace poměrně obtížná. Dalším z praktických problémů, který se vyskytuje při použití kolon plněných mikročásticemi, je tvorba bublinek, které mohou vznikat mj. na rozhraní frity a náplně. Předcházet vzniku bublinek lze tlakováním obou elektrodových nádobek, chlazením kapiláry, důkladným odplyněním mobilní fáze, užitím nízkých koncentrací elektrolytů (nebo elektrolytů s nízkou vodivostí) a kapilár s menšími vnitřními průměry. Problémem je také skutečnost, že kapiláry jsou v místě frity velmi křehké, snadno může dojít k jejich



Obr. 1. Princip elektroosmotického toku EOF v křemenné kapiláře, jejíž stěna má záporný náboj



Obr. 2. Srovnání rychlostních profilů toku mobilní fáze u náplňových kolon pro CEC a HPLC

ulomení, a tím ke zničení kolony. Byla publikována řada metod přípravy tohoto typu kolon a byly diskutovány vlivy velikosti částic a problémy spojené s tvorbou bublinek v mobilní fázi^{31–44}.

Další možností je použití kolon s monolitickými polymerními náplněmi^{45–53}. Tyto kolony obsahují souvislé porézní lože organického či anorganického polymeru. To je v kapiláře buď kovalentně uchyceno na vnitřní stěnu, nebo je v kapiláře udržováno adhezí polymeru. Díky tomu nejsou u monolitických kolon zapotřebí zadržovací frity a je zmenšeno nebezpečí tvorby bublinek. Příslušná stacionární fáze je polymerována *in situ*, tj. přímo v kapiláře. Obsahuje jednak chemické skupiny pro daný chromatografický mód a dále skupiny ionizované, odpovídající za vznik EOF – zpravidla sulfoskupiny. Plnění je podstatně jednodušší než u náplňových kolon, protože nevyžaduje vysoké tlaky. K syntéze organopolymerních monolitů je nejčastěji využívána radikálová polymerace. Změnami složení prepolymerační směsi lze získat monolity o různém chemickém složení a požadované morfologii. Vývoj těchto kolon je teprve v počátcích a v současné době se intenzivně rozvíjí⁵⁴.

Do skupiny polymerních kolon patří také tzv. sol-gel monolitické náplně. Tyto monolity jsou připravovány z alkoxyilanů procesem, který zahrnuje jejich hydrolyzu a následnou polykondenzaci. Koloidní roztok je nejprve převeden na hydrogel a pak je termicky pozměněn za vzniku sítě xerogelu uchyceného na vnitřní stěnu kolony. Proces sol-gel může být použit také pro vytvoření monolitu splením již naplněných silikagelových mikročástic. Příprava monolitických náplní sol-gel je popsána v několika pracích^{55–61}. Další alternativou polymerních kolon je použití tzv. „molecularly imprinted polymers“, tj. polymerů s molekulárními otisky. Tyto polymery jsou připravovány v přítomnosti molekuly příslušného analytu, která při polymeraci dává v polymeru vznik specifických dutin komplementárních tvarem i chemickou funkčností. Jejich aplikace především v oblasti chirálních separací jsou uvedeny v několika pracích a přehledných publikacích^{62–64}.

Druhým typem kolon jsou povrchově modifikované kolony (open tubular, OT), jež představují, co se týče přípravy a stability, nejjednodušší typ kolon pro CEC (cit.^{65–67}). Jde vlastně o obdobu kolon pro plynovou chromatografii, u kterých stacionární fáze tvoří pouze tenkou vrstvu na vnitřní stěně kapiláry. Pro dosažení vyššího poměru objemu stacionární a mobilní fáze je nutné pracovat s kapilárami o vnitřním průměru menším než 25 μm , což se však odráží v nižší citlivosti detekce. Dalšího zvýšení množství stacionární fáze, a tím i vyšší zadržovací kapacity lze dosáhnout speciálními metodami, např. leptáním.

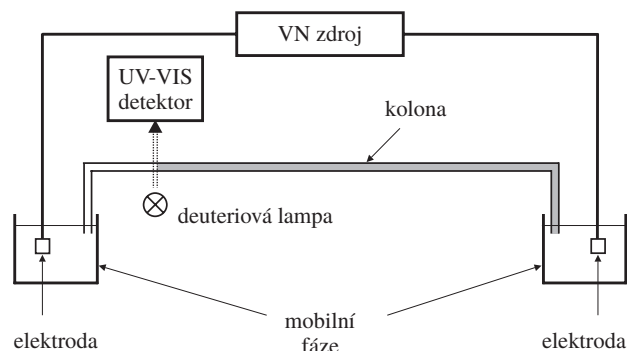
4. Instrumentace

Instrumentace, potřebná k provádění analýz CEC je podobná CZE a je v principu velmi jednoduchá (obr. 3). CEC je většinou prováděna v křemenných kapilárních kolonách (viz výše). Oba konce kolony jsou ponořeny do elektrodových nádobek obsahujících mobilní fázi, kam je též přiváděn elektrický proud z vysokonapětového zdroje platinovými elektrodami. Mobilní fáze jsou vodné roztoky pufrů s různým obsahem organických rozpouštědel mísitelných s vodou (acetonitril, methanol) pro řízení retence. Většinou se pracuje při

alkalickém pH, při kterém je na stacionární fázi dostatečná koncentrace ionizovaných skupin nezbytných pro konstantní EOF. Byly však publikovány i separace CEC za použití nevodných mobilních fází³⁸. Vzorky jsou stejně jako u CZE dávkovány elektrokineticky nebo tlakově. Reprodukovatelná analýza vyžaduje přesnou kontrolu pracovních parametrů, jako jsou separační napětí a teplota kapilární kolony.

Nejčastěji používaná detekční metoda je UV-VIS spektrofotometrie, kdy optickou dráhu tvoří vnitřní průměr kapiláry. Nevýhoda zde spočívá v nízké citlivosti, dané krátkou optickou dráhou. Naopak velmi citlivá je fluorimetrická detekce, zvláště pokud je jako excitační zdroj použit laser o vhodné vlnové délce (LIF – laser-induced fluorescence)^{68,69}. Jisté omezení zde představuje poměrně malý počet přirozeně fluoreskujících látek. Řešením je pak derivatizace studovaných analytů pomocí reaktivních fluorescenčních značek, kterých je v současné době velký výběr. Instrumentálně náročné je spojení CEC a hmotnostní spektrometrie^{70–72}, má ovšem zásadní výhodu ve schopnosti identifikovat jednotlivé analyty.

V současné době jsou pro provádění analýz CEC často využívány komerční i v laboratoři sestavené přístroje pro CZE. Ty sice splňují základní požadavky, tak jak byly popsány v předchozím odstavci, a umožňují i automatické dávkování vzorku, ale zároveň představují jistá omezení. Největší problém spočívá ve skutečnosti, že běžné techniky CZE nevyužívají programovanou změnu základního elektrolytu, a proto tato funkce není v elektroforeografích instalována. Naopak pro CEC je gradientová eluce velmi důležitá, neboť umožňuje podstatné zrychlení analýzy, zvláště v případě separace směsí, obsahujících analyty s širokým rozsahem polarit. Byla proto navržena celá řada metod, které tento nedostatek řeší⁷³. Nejjednodušší z nich je kroková změna složení mobilní fáze^{74,75}, která má ale pouze omezenou použitelnost. Pro vytváření kontinuálních gradientů mobilní fáze byly popsány v zásadě dvě možnosti, publikované v různých obměnách. Především je to použití gradientové HPLC pumpy, ze které se přivádí mobilní fáze o měnícím se složení na vstup CEC kapiláry^{76–79}, a dále užití dvou zdrojů vysokého napětí řízených počítačem^{80,81}. Obě naposledy popsané metody mají společnou nevýhodu v instrumentální náročnosti, která je v silném protikladu k principiální jednoduchosti CEC. Nejnověji byla popsána velmi jednoduchá metoda, využívající pro přípravu kontinuálních gradientů mobilní fáze turbulence, ke které dochází v místě náhlého zvětšení průměru přívodní kapiláry⁸².



Obr. 3. Schéma instrumentace pro kapilární chromatografii

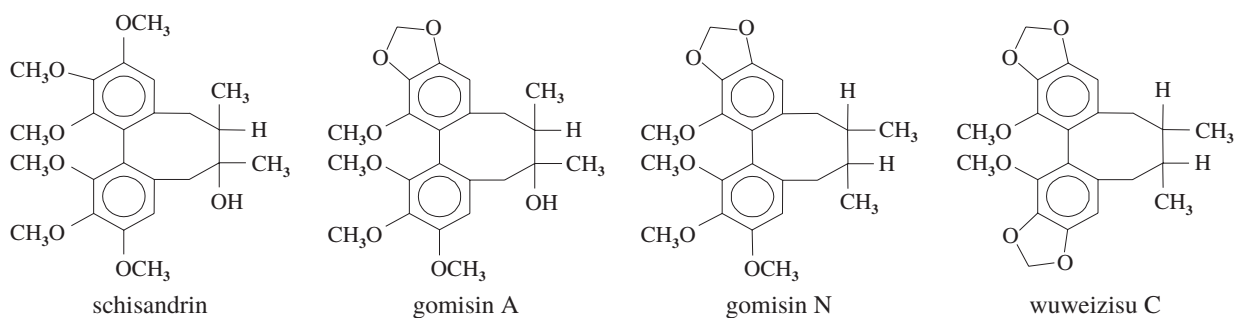


Schéma 1

Tabulka I

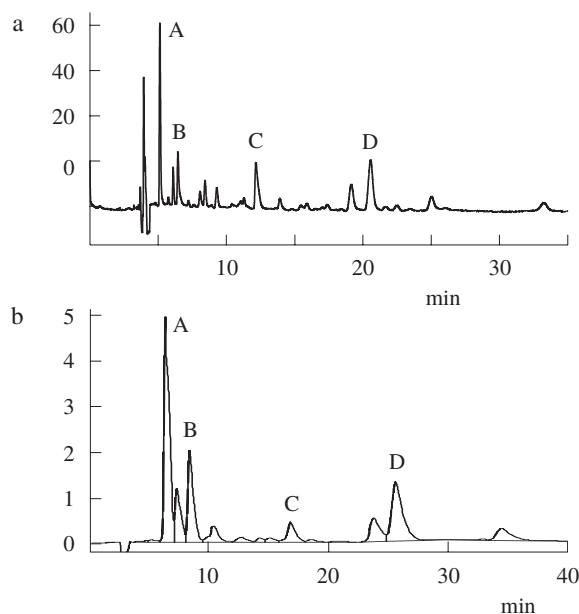
Přehled charakteristických aplikací CEC v náplňových mikročasticových kolonách

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Lit.
Polycyklické aromatické uhlovodíky	3 μm Nucleosil C18	acetonitril/2 mM borát (80:20)	110
Triazinové herbicidy	3 μm Hypersil C18 3 μm Hypersil C8	acetonitril/25 mM octan sodný, pH 8 (50:50)	111
Steroidy	3 μm Hypersil C18	acetonitril/2 mM fosfát, pH 7,8 (80:20)	32
Kanabinoidy	3 μm Hypersil C18	acetonitril/25 mM fosfát, pH 2,57 (gradient)	112
Triglyceridy	3 μm Hypersil C18	50 mM octan amonný v acetonitril/ isopropylalkohol/ <i>n</i> -hexan (57:38:5)	113
Vitaminy – estery retinolu	7 μm Nucleosil C18	2,5 mM octan lithný v <i>N,N</i> -dimethylformamid/ acetonitril/methanol (20:70:10)	114
Thalidomid a jeho deriváty	5 μm LiChrospher C18	acetonitril/5 mM octan amonný, pH 6 (60:40)	115
PTH deriváty aminokyselin	5 μm Zorbax ODS	acetonitril/5 mM fosfát, pH 7,55 (gradient)	78
Cyt c – tryptické štěpení	1,5 μm Polymicro ODS	1,5% TFA/acetonitril (gradient)	116

Současný rozvoj v molekulární biologii a biochemii především v souvislosti s projekty studia genomu, proteomu a metabolomu s sebou přinesl potřebu analýzy velkého množství vzorků o velmi malých objemech. Jedním z řešení tohoto problému je miniaturizace a automatizace stávajících separačních analytických metod, což vedlo k vývoji mikrofluidních zařízení, respektive zařízení na bázi mikročipů⁸³. I když nejčastěji využívanou metodou je v tomto případě CZE, objevily se již první zprávy o spojení těchto technik s CEC (cit.⁸⁴).

5. Aplikace

Přestože CEC byla vyvinuta pro separaci neutrálních látek, její aplikační potenciál se v současné době neomezuje pouze na ně. Aplikace zahrnují látky organické i anorganické, nízkomolekulární i vysokomolekulární, látky syntetické či přírodního původu. CEC tedy může najít uplatnění v celé řadě oblastí, jako jsou farmakologie, biochemie, biotechnologie, organická chemie, chemie životního prostředí atd. Převládajícím chromatografickým módem je přitom chromatografie s obrácenými fázemi, CEC však byla rovněž prováděna v uspořádání s normálními fázemi^{85–88}, jako ionexová^{88–96} nebo gelová permeační chromatografie^{48,97–99}, a dokonce jako adsorpční chromatografie na hydroxyapatitu¹⁰⁰. Je však nutné zdůraznit, že s ohledem na amfifilní charakter stacionární fáze v CEC



Obr. 4. Příklad separace extraktu schisandry čínské (*Schisandra chinensis*) metodou CEC (a) na monolitické polyakrylamidové C12 koloně a HPLC (b) s obrácenými fázemi – A: schisandrins, B: gomisin A, C: gomisin N, D: wuweizisu C (převzato z práce¹⁰⁹ s laskavým svolením vydavatelství Elsevier)

Tabulka II

Přehled charakteristických aplikací CEC v monolitických polymerních kolonách

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Lit.
Enantiomery aminokyselin	polymethakrylát (molekulární otiskování)	acetonitril/kys.octová/voda (80:10:10)	117
Peptidy	polyakrylamid C12	acetonitril/10 mM Tris–15 mM borát, pH 8,2 (47:53)	47
Steroidy	polyakrylamid C12	acetonitril/voda/mravenčan, pH 3 (55:40:5)	118
Žlučové kyseliny	polyakrylamid C12/NH ₂	acetonitril/voda/mravenčan, pH 3 (55:40:5/ 60:35:5)	53
Lignany	polyakrylamid C12	acetonitril/10 mM Tris–15 mM borát, pH 8,2 (70:30)	109

Tabulka III

Přehled charakteristických aplikací CEC v povrchově modifikovaných kolonách

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Lit.
Tetracyklinová antibiotika	C18	methanol/30 mM citrát–24,5 mM β-alanin, pH 3,0 (40:60)	119
Variety laktoglobulinů A a B	DNA aptamery	25 mM Trizma, pH 7,3 10 mM fosfát, pH 7,3	120
Benzodiazepiny	cholesterol	acetonitril/10 mM Tris–HCl, pH 7,3 (gradient)	121
Aminokyseliny	deriváty porfyriu	0,1 M fosfát, 50 mM Tris, pH 2,1 50 mM borát, pH 9,7	122

jde často o kombinaci těchto módů. CEC byla též aplikována při separaci chirálních látek^{101–104}, a to za použití chirálních stacionárních fází nebo přídavku některého z chirálních selektorů do mobilní fáze. Rozsáhlé uplatnění zde našla již zmiňovaná technika molekulárního otiskování.

Vzhledem k množství prací zabývajících se aplikací této metody, není možné uvést jejich kompletní přehled, a proto jsou v tabulkách I až III uvedeny jen práce dokumentující její aplikační záběr. Případní zájemci jsou odkázáni na řadu přehledných článků, věnovaných dané problematice^{13–16,19,21–23,105–108}.

Jako typický příklad může přitom sloužit analýza tetrahydrocycloocta[1,2:3,4]dibenzenových lignanů (viz schéma 1) v extraktu léčivé rostliny schisandry čínské (syn. Klanopraška) *Schisandra chinensis*¹⁰⁹ (obr. 4). Pro srovnání je uvedena analýza stejného extraktu HPLC s obrácenými fázemi. Jak je z obrázků zřejmé, CEC dosahuje vyšší účinnosti, a tím i vyššího rozlišení analyzovaných látek.

6. Závěr

CEC je unikátní elektromigrační separační metoda, která se v posledních pěti letech intenzivně rozvíjí. Lze očekávat, že v budoucnu získá velkou důležitost pro svou vysokou separační účinnost, rychlost analýzy, nízké nároky na množství vzorku a relativně nízkou finanční náročnost. Z jejího vývoje lze usuzovat, že CEC bude užívána v laboratořích jako možná alternativa stávajících separačních metod HPLC a CZE. V současné době je však potenciál CEC omezen celou řadou problémů. Musí být vyřešena reprodukovatelná příprava kolon, ať již na bázi mikročásticových či polymerních stacionárních fází. Dalším významným omezením je neexistence komerčně dostupné instrumentace. Po vyřešení

těchto problémů, které si vyžádá v nejbližších letech nemalé úsilí, má CEC šanci stát se rutinně používanou metodou.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant č. 203/02/1447) a Programem podpory cíleného výzkumu a vývoje Akademie věd České republiky (grant č. S4031202).

LITERATURA

1. Strain H.: *J. Am. Chem. Soc.* 61, 1292 (1939).
2. Strain H., Sullivan J.: *Anal. Chem.* 23, 816 (1951).
3. Berraz G.: *An. Asoc. Quim. Argent.* 31, 96 (1943).
4. Tisselius A.: *Discuss. Faraday Soc.* 7, 7 (1949).
5. Mould D. L., Syngé R. L. M.: *Analyst* 77, 964 (1952).
6. Mould D. L., Syngé R. L. M.: *Biochem. J.* 58, 571 (1954).
7. Pretorius V., Hopkins B. J., Schieke J. D.: *J. Chromatogr.* 99, 23 (1974).
8. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: *J. Chromatogr.* 218, 209 (1981).
9. Knox J. H., Grant I. H.: *Chromatographia* 24, 135 (1987).
10. Knox J. H., Grant I. H.: *Chromatographia* 32, 317 (1991).
11. Dittmann M. M., Wienand K., Bek F., Rozing G. P.: *LC GC* 13, 800 (1995).
12. Ross G., Dittmann M. M., Bek F., Rozing G. P.: *Am. Lab.* (Boston) 26, 34 (1996).
13. Colón L. A., Reynolds K. J., Maldonado R. A., Fermier A. M.: *Electrophoresis* 18, 2162 (1997).
14. Cíkalo M. G., Bartle K. D., Robson M. M., Myers P., Euerby M. R.: *Analyst* 123, 87 (1998).
15. Smith N. W., Carter-Finch A. S.: *J. Chromatogr.*, A 892, 219 (2000).
16. Colón L. A., Burgos G., Maloney T. D., Cintrón J. M., Rodríguez R. L.: *Electrophoresis* 21, 3965 (2000).

17. Bartle K. D., Meyers P.: *J. Chromatogr.*, A 916, 3 (2000).
18. Knox J. H., Boughtflower R.: *Trends Anal. Chem.* 19, 643 (2000).
19. Altria K. D., Smith N. W., Turnbull C. H.: *Chromatographia* 46, 664 (1997).
20. Rathore A. S., Horváth C.: *J. Chromatogr.*, A 781, 185 (1997).
21. Krull I. S., Stevenson R. L., Mistry K., Swartz M. E.: *Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capillary Electrochromatography*. HNB Publishing, New York 2000.
22. Bartle K. D., Myers P. (ed.): *Capillary Electrochromatography*. RSC Press, London 2001.
23. Deyl Z., Švec F. (ed.): *Capillary Electrochromatography*. Elsevier, Amsterdam 2001.
24. Boughtflower R. J., Underwood T., Paterson C. J.: *Chromatographia* 40, 329 (1995).
25. Smith N. W., Evans M. B.: *Chromatographia* 38, 649 (1994).
26. Boughtflower R. J., Underwood T., Maddin J.: *Chromatographia* 41, 398 (1995).
27. Robson M. M., Roulin S., Shariff S. M., Raynor M. W., Clifford A. A., Meyers P., Euerby M. R., Johnson C. M.: *Chromatographia* 43, 313 (1996).
28. Fermier A. M., Colón L. A.: *J. Microcolumn Sep.* 10, 439 (1998).
29. Reynolds K. J., Maloney T. D., Fermier A. M., Colón L. A.: *Analyst* 123, 1493 (1998).
30. Yan C.: U.S. Patent 5, 453 163, (1995).
31. Carney R. A., Robson M. M., Bartle K. D., Myers P.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 22, 29 (1999).
32. Frame L. A., Robinson M. L., Lough W. J.: *J. Chromatogr.*, A 798, 243 (1998).
33. Saevels J., Wuyts M., Van Schepdael A., Roets E., Hoogmartens J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 513 (1999).
34. Zhang Y., Shi W., Zhang L., Zou H.: *J. Chromatogr.*, A 802, 59 (1998).
35. Euerby M. R., Johnson C. M., Cikalo M., Bartle K. D.: *Chromatographia* 47, 135 (1998).
36. Seifar R. M., Kraak J. C., Kok W. T., Poppe H.: *J. Chromatogr.*, A 808, 71 (1998).
37. Adam T., Ludtke S., Unger K. K.: *Chromatographia* 49, S49 (1999).
38. Roed L., Lundanes E., Greibrokk T.: *J. Microcolumn Sep.* 11, 421 (1999).
39. Ludtke S., Adam T., Unger K. K.: *J. Chromatogr.*, A 786, 229 (1997).
40. Lumley B., Khong T. M., Perrett D.: *Chromatographia* 54, 625 (2001).
41. Tang Q., Lee M. L.: *Trends Anal. Chem.* 19, 648 (2000).
42. Engelhardt H., Hafner F. T.: *Chromatographia* 52, 125 (2000).
43. Choudhary G., Horváth C.: *J. Chromatogr.*, A 781, 161 (1997).
44. Colón L. A., Maloney T. D., Fermier A. M.: *J. Chromatogr.*, A 887, 43 (2000).
45. Palm A., Novotný M. V.: *Anal. Chem.* 69, 4499 (1997).
46. Peters E. C., Petro M., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* 69, 3646 (1997).
47. Peters E. C., Petro M., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* 70, 2288 (1998).
48. Peters E. C., Petro M., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* 70, 2296 (1998).
49. Švec F., Peters E. C., Sýkora D., Yu G., Fréchet J. M. J.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 3 (2000).
50. Fujimoto C., Fujise Y.: *Anal. Chem.* 68, 2753 (1996).
51. Fujimoto C.: *Anal. Chem.* 67, 2050 (1995).
52. Ericson C., Liao J., Nakazato K., Hjertén S.: *J. Chromatogr.*, A 776, 43 (1997).
53. Que A. H., Konse T., Baker A. G., Novotný M. V.: *Anal. Chem.* 72, 2703 (2000).
54. Tanaka N., Nagayama H., Kobayashi H., Ikegami T., Hosoya K., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Cabrera K., Lubda D.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 111 (2000).
55. Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Hosoya K., Tanaka N.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 21, 477 (1998).
56. Dulay M. T., Quirino J. P., Bennett B. D., Kato M., Zare R. N.: *Anal. Chem.* 73, 3921 (2001).
57. Fujimoto C.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 89 (2000).
58. Ratnayake C. K., Oh C. S., Henry M. P.: *J. Chromatogr.*, A 887, 277 (2000).
59. Dulay M. T., Kulkarni R. P., Zare R. N.: *Anal. Chem.* 70, 5103 (1998).
60. Chirica G., Remcho V. T.: *Electrophoresis* 20, 50 (1999).
61. Hayes J. D., Malik A.: *Anal. Chem.* 72, 4090 (2000).
62. Remcho V. T., Tan Z. J.: *Anal. Chem.* 71, 248A (1999).
63. Tan Z. J., Remcho V. T.: *Anal. Chem.* 69, 581 (1997).
64. Vallano P. T., Remcho V. T.: *J. Chromatogr.*, A 887, 125 (2000).
65. Jinno K., Sawada H.: *Trends Anal. Chem.* 19, 664 (2000).
66. Pesek J., Matyska M. T., Cho S. J.: *J. Chromatogr.*, A 845, 237 (1999).
67. Pesek J., Matyska M. T.: *Electrophoresis* 18, 2228 (1997).
68. Yan C., Dadoo R., Zhao H., Zare R. N., Rakestraw D. J.: *Anal. Chem.* 67, 2026 (1995).
69. Tao L., Kennedy R. T.: *Trends Anal. Chem.* 17, 484 (1998).
70. Verheij E. R., Tjaden U. R., Niessen W. M. A., Van Der Greef J.: *J. Chromatogr.*, A 554, 339 (1991).
71. Choudhary G., Apffel A., Yin H. F., Hancock W.: *J. Chromatogr.*, A 887, 85 (2000).
72. von Brocke A., Nicholson G., Bayer E.: *Electrophoresis* 22, 1251 (2001).
73. Rimmer C. A., Piraino S. M., Dorsey J. G.: *J. Chromatogr.*, A 887, 115 (2000).
74. Euerby M. R., Gilligan D., Johnson C. M., Bartle K. D.: *Analyst* 122, 1087 (1997).
75. Ding J., Szeliga J., Dipple A., Vouros P.: *J. Chromatogr.*, A 781, 327 (1997).
76. Behnke B., Bayer E.: *J. Chromatogr.*, A 680, 93 (1994).
77. Taylor M. R., Teale P., Westwood S. A.: *Anal. Chem.* 69, 2554 (1997).
78. Huber C. G., Choudhary G., Horváth C.: *Anal. Chem.* 69, 4429 (1997).
79. Lister A. S., Rimmer C. A., Dorsey J. G.: *J. Chromatogr.*, A 828, 105 (1998).
80. Yan C., Dadoo R., Zare R. N., Rakestraw D. J., Anex D. S.: *Anal. Chem.* 68, 2726 (1996).
81. Figeys D., Aebbersold R.: *Anal. Chem.* 70, 3721 (1998).

82. Que A. H., Kahle V., Novotný M. V.: *J. Microcolumn Sep.* 12, 1(2000).
83. Becker M. H. (ed.): *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science, Topics in Current Chemistry*, sv. 194. Springer, Heidelberg 1998.
84. Yu C., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Electrophoresis* 21, 120 (2000).
85. Maruska A., Pyell U.: *Chromatographia* 45, 229 (1997).
86. Maruska A., Pyell U.: *J. Chromatogr., A* 782, 167 (1997).
87. Lai E. P. C., Dabek-Zlotorzynska E.: *Electrophoresis* 20, 2366 (1999).
88. Lammerhofer M., Švec F., Fréchet J. M. J., Lindner W.: *J. Chromatogr., A* 925, 265 (2001).
89. Smith N. W., Evans M. B.: *Chromatographia* 41, 197 (1995).
90. Wei W., Luo G. A., Yan C.: *Am. Lab. (Boston)* 30, 20C (1998).
91. Ye M. L., Zou H. F., Liu Z., Ni J. Y., Zhang Y. K.: *Anal. Chem.* 72, 616 (2000).
92. Cikalo M. G., Bartle K. D., Myers P.: *Anal. Chem.* 71, 1820 (1999).
93. Hilder E. F., Klampfl C. W., Haddad P. R.: *J. Chromatogr., A* 890, 337 (2000).
94. Lammerhofer M., Lindner W.: *J. Chromatogr., A* 829, 115 (1998).
95. Li D. M., Knobel H. H., Remcho V. T.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 695, 169 (1997).
96. Huang P. Q., Jin X. Y., Chen Y. J., Srinivasan J. R., Luman D. M.: *Anal. Chem.* 71, 1796 (1999).
97. Venema E., Kraak J. C., Tjissen R., Poppe H.: *Chromatographia* 48, 343 (1998).
98. Venema E., Kraak J. C., Tjissen R., Poppe H.: *J. Chromatogr., A* 837, 3 (1993).
99. Stol R., Kok W. T., Poppe H.: *J. Chromatogr., A* 814, 201 (2001).
100. Yin G., Liu Z., Zhou R., Zhan J., Wang J., Yuan N. J.: *J. Chromatogr., A* 918, 393 (2001).
101. Fanali S., Catarcini P., Blaschke G., Chankvetadze B.: *Electrophoresis* 22, 3131 (2001).
102. Lelievre F., Yan C., Zare R. N., Garej P.: *J. Chromatogr., A* 723, 145 (1996).
103. Wistuba D., Czesla H., Roeder M., Schurig V.: *J. Chromatogr., A* 815, 183 (1998).
104. Wistuba D., Schurig V.: *Electrophoresis* 21, 4136 (2000).
105. Robson M. M., Cikalo M. G., Myers P., Euerby M. R., Bartle K. D.: *J. Microcolumn Sep.* 9, 357 (1997).
106. Dermaux A., Sandra P.: *Electrophoresis* 20, 3027 (2000).
107. Krull I. S., Sebag A., Stevenson R.: *J. Chromatogr., A* 887, 137 (2000).
108. Vanhoenacker G., Van den Bosch T., Rozing G., Sandra P.: *Electrophoresis* 22, 4064 (2001).
109. Kvasničková L., Glatz Z., Štěrbová H., Kahle V., Slanina J., Musil P.: *J. Chromatogr., A* 916, 265 (2001).
110. Rebscher H., Pyell U.: *Chromatographia* 42, 171 (1996).
111. Dittmann M. M., Rozing G. P.: *J. Microcolumn Sep.* 9, 399 (1997).
112. Lurie I. S., Meyers R. P., Conner T. S.: *Anal. Chem.* 70, 3255 (1998).
113. Dermaux A., Medvedovici A., Ksir M., Van Hove E., Talbi M., Sandra P.: *J. Microcolumn Sep.* 11, 451 (1999).
114. Roed L., Lundanes E., Greibrokk T.: *J. Chromatogr., A* 890, 347 (2000).
115. Meyring M., Strickmann D., Chankvetadze B., Blaschke G., Desiderio C., Fanali S.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 723, 255 (1999).
116. Behnke B., Metzger J. W.: *Electrophoresis* 20, 80 (1999).
117. Lin J. M., Nakagama T., Uchiyama K., Hobo T.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1351 (1997).
118. Que A. H., Palm A., Baker A. G., Novotny M. V.: *J. Chromatogr., A* 887, 379 (2000).
119. Pesek J., Matyska M. T.: *J. Chromatogr., A* 736, 313 (1996).
120. Rehder M. A., McGown L. B.: *Electrophoresis* 22, 3759 (2001).
121. Catabay A. P., Sawada H., Jinno K., Pesek J. J., Matyska M. T.: *J. Capillary Electrophor.* 5, 89 (1998).
122. Charvátová J., Kašička V., Král V., Deyl Z.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 770, 165 (2002).

L. Kvasničková^a, Z. Glatz^b, and V. Kahle^c (^a*District Public Health Department, Uherské Hradiště*, ^b*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*, ^c*Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*): **Capillary Electrochromatography**

Capillary electrochromatography (CEC) can be considered a hybrid of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC). The growing interest in this technique is reflected in an increasing number of relevant scientific publications. CEC uses an electrically driven flow to transport the solutes through the chromatographic column. Separation can be achieved by differential interaction with stationary phase, differential electromigration, or a combination of both. The main features of CEC are presented, including basic principles and a literature overview on the practical approaches used.

DIAGNOSTIKA VYBRANÝCH DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ S VYUŽITÍM MODERNÍCH IONIZAČNÍCH TECHNIK

PETR FRYČÁK^{a,*}, KAREL LEMR^a, TOMÁŠ ADAM^{b,*}
a RENATA HUŠKOVÁ^b

^aKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc,

^bLaboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení konsolidovaných biochemických laboratoří, Fakultní nemocnice Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
e-mail: frycak@email.cz, tomasadam@email.cz

Došlo 18.10.01, přepracováno 27.5.02, přijato 3.9.02.

Klíčová slova: diagnostika, metabolické poruchy, hmotnostní spektrometrie

Obsah

1. Úvod
2. Dědičné metabolické poruchy z hlediska biochemie a molekulární biologie
 - 2.1. Poruchy odbourávání mastných kyselin
 - 2.2. Poruchy odbourávání aminokyselin
 - 2.3. Poruchy metabolismu žlučových kyselin
 - 2.4. Poruchy odbourávání purinových a pyrimidinových bází a nukleosidů
3. Přístrojové vybavení a postupy pro hmotnostně spektrometrické sledování metabolitů
 - 3.1. Odběr klinického vzorku
 - 3.2. Příprava vzorku k analýze
 - 3.3. Zavádění vzorku, spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou
 - 3.4. Iontové zdroje
 - 3.5. Analyzátor iontů, skenovací režimy
 - 3.6. Zpracování a vyhodnocení primárních dat
4. Závěr

1. Úvod

Během posledního desetiletí došlo k rychlému rozvoji a velkému rozšíření iontových zdrojů pracujících za atmosférického tlaku, tj. ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionisation – ESI), příp. chemické ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation – APCI). Tyto techniky umožňují kontinuální zavádění kapalných vzorků do iontového zdroje a jsou vhodné pro analýzu látek od středně polárních až po iontové. Takové vlastnosti je (vedle starších technik Fast Atom Bombardment – FAB a Liquid Secondary

Ion Mass Spectrometry – LSIMS) činí mimořádně vhodnými pro analýzu nízkomolekulárních metabolitů. Hmotnostní detektor a případně on-line spojení se separační technikou (vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií nebo kapilární elektroforézou) zajišťují dostatečnou selektivitu stanovení v tak komplexních matricích, jako jsou moč, krev, plazma nebo sérum. Pro řadu skupin především polárních analytů (např. aminokyseliny, acylkarnitiny) je technika ESI/MS/MS, příp. APCI/MS/MS vhodnější než GC/MS, která v takových případech vyžaduje náročnější přípravu vzorků. Moderní ionizační techniky dovolily vyvinout systémy schopné analyzovat několik stovek vzorků za den a automaticky vyhodnotit získaná data¹.

Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou vzácně se vyskytující onemocnění – incidence se pohybuje od cca 1 : 10 000 v případě např. fenylketonurie až k 1 : 500 000 u velmi vzácných poruch; jejich kumulativní incidence je 1 : 500. Klinické příznaky jsou často natolik nespecifické, že včasné stanovení koncentrace příslušných metabolitů v rámci screeningového programu během několika prvních dní po narození může být jedinou cestou, jak určit diagnózu dříve, než nastanou nevratné patologické změny v organismu pacienta. Tato diagnostika vyžaduje stanovení řady analytů ve velkém počtu vzorků (řádově desítky až stovky tisíc ročně). Dostatečné selektivity a prostupu vzorků lze dosáhnout použitím MS (cit.²).

Tento přehledný referát se zaměřuje na DMP, které lze diagnostikovat na základě stanovení aminokyselin, acylkarnitinů, organických kyselin (karboxylové kyseliny C3 až C6 a jejich hydroxy- a ketoderiváty), vyšších mastných kyselin, žlučových kyselin a purinových a pyrimidinových látek. Využití ESI/MS/MS a APCI/MS/MS pro tyto skupiny metabolitů zjednodušilo analýzu oproti tradičním GC/MS nebo jiným metodám, což v některých vyspělých státech umožnilo rozběhnout rozsáhlé screeningové programy.

2. Dědičné metabolické poruchy z hlediska biochemie a molekulární biologie

Příčinou DMP jsou mutace genů sloužících jako předloha při proteosyntéze. Vzniká abnormální protein s pozměněnou sekvencí aminokyselinových zbytků. Jeho funkčnost (nejčastěji katalytická aktivita) může být zcela nebo z velké části zachována, pokud se změna sekvence vyskytuje mimo vazebná místa substrátu a koenzymu. V opačném případě je aktivita enzymu podstatně snížena nebo je nulová. Aktivita abnormálního enzymu u konkrétního jedince odpovídá široké škále klinických projevů DMP od asymptomatického průběhu až po těžké poškození tkání, selhání orgánů a předčasnou smrt.

Přerušení metabolické dráhy na místě odpovídajícím nefunkčnímu enzymu způsobí hromadění substrátu a nedostatek produktu enzymové reakce. Nevyužitý substrát může být me-

* Autor pro korespondenci

Tabulka I
Poruchy odbourávání mastných kyselin

DMP	Diagnosticky významné metabolity ^a	Lit.
<i>Poruchy transportu acyl-CoA do matrix mitochondrií:</i>		
Deficience karnitinpalmitoyltransferasy II nebo karnitinacylkarnitintranslokasy ^{b,c}	acylkarnitiny C14, C16:1, C16, C18:2, C18:1, C18	5–7
<i>Poruchy β-oxidace:</i>		
Deficience dehydrogenasy acyl-CoA s krátkým řetězcem	acylkarnitiny C2, C4, C5	1,7
se středním řetězcem	acylkarnitiny C2, C6, C8, C10:1, C10	1,7–9
s dlouhým řetězcem	acylkarnitiny C14:2, C14:1, C16, C18:1, C18	1,7,10
Deficience peroxisomální dehydrogenasy acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem ^d	mastné kyseliny C20, C22, C24, C26	11
Deficience dehydrogenasy hydroxyacyl-CoA s dlouhým řetězcem	3-hydroxyacylkarnitiny C16, C18:1, C18, acylkarnitiny C14:1, C14	7,12
Porucha více acyl-CoA dehydrogenas (glutarová acidurie II)	acylkarnitiny C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10, glutaryl-	1,7

^aUvedeny jsou i metabolity, které jsou použity k vyhodnocení nálezu porovnáním koncentrace akumulovaného a „referenčního“ metabolitu, ^b nelze rozlišit jen na základě stanovení acylkarnitinů¹⁰, ^c existuje i deficience karnitinpalmitoyltransferasy I, je ale mnohem vzácnější, ^d mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (C20 a vyšší) jsou katabolizovány v peroxisomech modifikovanou formou β -oxidace

tabolizován jiným enzymem za vzniku odlišného produktu. Patologicky může působit hromadění substrátu i přítomnost alternativního produktu (nebo více produktů), stejně jako nedostatek produktu zastavené reakce.

2.1. Poruchy odbourávání mastných kyselin^{3,4}

Katabolismus mastných kyselin, známý jako β -oxidace, se odehrává především v mitochondriích, i když podobnou enzymatickou výbavu obsahují i peroxisomy. DMP katabolismu mastných kyselin mohou být důsledkem poruchy transportu mastných kyselin do mitochondriální matrix nebo poruchy vlastní β -oxidace. Pro diagnostiku se využívá stanovení acylkarnitinů v plazmě nebo plné krvi (resp. krevních skvrnách na filtračním papíře, viz dále). V tabulce I jsou uvedeny jednotlivé poruchy a jim odpovídající diagnosticky významné metabolity spolu s citacemi odkazujícími na jejich detekci nebo stanovení hmotnostní spektrometrií.

2.2. Poruchy odbourávání aminokyselin¹³

Katabolismus aminokyselin se skládá z odstranění α -aminoskupiny transaminací a z následného odbourání uhlíkového řetězce na prekuzory nebo meziproducty citrátového cyklu. DMP se mohou týkat jak enzymů katalyzujících odbourání uhlíkového řetězce aminokyselin, tak enzymů močovinového cyklu. Pro diagnostiku se využívá stanovení aminokyselin, acylkarnitinů, acylglycinů (detoxikačních produktů) a organických kyselin v plazmě a moči. Jednotlivé poruchy a odpovídající diagnosticky významné metabolity jsou uvedeny v tabulce II.

2.3. Poruchy metabolismu žlučových kyselin

Žlučové kyseliny jsou biosyntetizovány v peroxisomech z cholesterolu. To mimo jiné zahrnuje zkrácení postranního řetězce tri-, resp. dihydroxycholestanové kyseliny β -oxidací za vzniku cholové, resp. deoxycholové kyseliny. Proto je stanovení různých žlučových kyselin a jejich konjugátů (nejčastěji s glycinem a taurinem) použitelné v diagnostice peroxisomálních poruch.

K diagnosticky významným metabolitům patří glykotrihydroxycholová²⁴, taurocholová²⁵, taurotrihydroxycholová²⁴, taurotetrahydroxycholová²⁴, taurotrihydroxycholestanová^{24,25} a taurotetrahydroxycholestanová kyselina^{24–26} a C29-dikarboxylová žlučová kyselina^{25,26}. Stanovení uvedených metabolitů se provádí v moči^{24,26,27}, plazmě nebo séru^{25,26} a ve žluči²⁶.

2.4. Poruchy odbourávání purinových a pyrimidinových bází a nukleosidů¹³

Lidský organismus katabolizuje hlavní purinové nukleosidy adenosin a guanosin až na kyselinu močovou, která je vylučována v moči. Pyrimidinové nukleosidy uracil, resp. thymin jsou odbourávány na β -alanin, resp. β -aminoisomáselnou kyselinu (další katabolismus vede přes malonaldehyd, resp. methylmalonmonoaldehyd k malonyl-CoA, resp. sukci-nyl-CoA, což jsou metabolity zapojené do biosyntézy mastných kyselin, resp. do citrátového cyklu).

Hmotnostní spektrometrie v diagnostice poruch spojených s touto skupinou metabolitů představuje relativně nejméně propracovanou oblast. Metabolity se stanovují v moči. V tabulce III jsou uvedeny konkrétní poruchy a jim odpovídající metabolity.

Tabulka II
Poruchy odbourávání aminokyselin

DMP	Diagnosticky významné metabolity ^a	Lit.
<i>Poruchy odbourávání uhlíkového řetězce:</i>		
Hyperfenylalaninemie ^b	Phe, Tyr	1,14–16
Deficience systému odbourávajícího glycín (neketotická hyperglycinemie)	Gly	1
Deficience dehydrogenasy 2-ketokyselin s rozvětveným řetězcem (nemoc javorového sirupu)	Leu, Ile, Val, Phe	1,17
Deficience fumarylacetoacetáthydrolyasy (tyrosinemie I)	Phe, Tyr	1,16
Deficience jaterní tyrosintransaminasy (tyrosinemie II)	Phe, Tyr	1,16
Deficience isovaleryl-CoA-dehydrogenasy (isovalerová acidurie)	acylkarnitiny C2, C5 v moči: isovalerylglycín, 3-hydroxyisovalerová kyselina	1,6,10 18,19
Deficience 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-lyasy (3-hydroxy-3-methylglutarová acidurie)	hydroxyacylkarnitin C5, methylglutaryl-karnitin v moči: 3-hydroxyisovalerová kyselina, 3-hydroxy-3-methylglutarová kyselina, 3-methylglutakonová kyselina, 3-methylglutarová kyselina	1 18
Deficience glutathionsynthetasy (pyroglutamová acidurie)	pyroglutamová kyselina, Phe v moči: pyroglutamová kyselina	1 20
Deficience histidinamoniaklyasy (histidinemie)	v moči: His	20
Deficience homogentisát oxidasy (alkaptonurie)	v moči: homogentisová kyselina	20
Deficience glutaryl-CoA-dehydrogenasy (glutarová acidurie I)	glutaryl-karnitin ^c	1,6,10
Deficience cystathionin- β -synthasy (homocystinurie)	Met	1
Deficience prolindehydrogenasy/ glutamát-5-semialdehyddehydrogenasy ^d (hyperprolinemie)	Pro, Phe	1
Deficience β -ketothiolasy	acylkarnitiny C5:1, hydroxy-C5	1
Vícenásobná deficience karboxylasy	acylkarnitiny C2, C3, hydroxy-C5	1
Deficience 3-methylkrotonyl-CoA-karboxylasy	hydroxyacylkarnitin C5	6
Deficience propionyl-CoA-karboxylasy (propionová acidemie)	acylkarnitiny C2, C3 v moči: methylcitronová kyselina, tiglylglycín, propionylglycín	1,10,21 18
Methylmalonová acidurie ^e	methylmalonová kyselina, acylkarnitiny C2, C3 v moči: methylmalonová kyselina, methylcitronová kyselina	1,10,21,22 18,22
<i>Poruchy cyklu močovinny:</i>		
Deficience ornithinkarbamoyltransferasy	v moči: orotová kyselina, uracil	23
Deficience argininsukcinátsynthetasy (citrulinemie)	citrulin, Phe, Tyr	1
Deficience argininsukcinátlyasy (argininsukcináturie)	citrulin, Tyr v moči: argininjantarová kyselina	1 18

^a Stanovení v krvi nebo plazmě, pokud není uvedeno jinak; uvedeny jsou i metabolity, které jsou použity k vyhodnocení nálezu porovnáním koncentrace akumulovaného a „referenčního“ metabolitu, ^b existují hyperfenylalaninemie z deficience fenylanin-hydroxylasy a deficience enzymů biopterinového metabolismu, ^c ostatní acylkarnitiny mají normální hodnoty – odlišeni od glutarové acidurie II, ^d citovaná publikace nespécifikuje, o který z enzymů jde, ^e existuje několik enzymů jejichž deficience způsobuje methylmalonovou acidurii: methylmalonyl-CoA-mutasa a dále enzymy zodpovědné za tvorbu adenosylkobalaminu, což je koenzym uvedené mutasy

Tabulka III
Poruchy odbourávání purinových a pyrimidinových bází a nukleosidů

DMP	Diagnosticky významné metabolity	Lit.
Deficience adenosindeaminasy	adenosin, deoxyadenosin	23
Deficience purinnukleosidfosforylasy	inosin, deoxyinosin, guanosin, deoxyguanosin	23
Deficience xanthinoxidasy	xanthin, hypoxanthin	23
Deficience molybdenového kofaktoru	xanthin	23
Deficience adeninfosforibosyltransferasy	adenin, dihydroxyadenin	23
Deficience adenylsukcinasy	sukcinyladenosin	23
Deficience dihydroypyrimidindehydrogenasy	uracil, thymín, 5-hydroxymethyluracil	23,28
Deficience orotátfosforibosyltransferasy anebo orotidylátdekarboxylasy	orotová kyselina	23

3. Přístrojové vybavení a postupy pro hmotnostně spektrometrické stanovení metabolitů

3.1. Odběr klinického vzorku

Jak již bylo naznačeno, pro účely diagnostiky DMP se odebírá buď moč nebo krev, která se dále může zpracovat na plazmu nebo sérum. Kromě klasického způsobu odběru „do zkumavky“ se zejména pro screeningové programy uplatňuje odběr moči a plné krve na kartu filtračního papíru. Na kartě je vyznačeno kolečko, do nějž se nechá nasáknout několik kapek moči nebo krve. Další možností je proužek filtračního papíru umístěný do plenek novorozence, případně ponořený do nádoby s odebranou močí. Po nasáknutí vzorkem se karta nebo proužek nechají vysušit. Vzorek na filtračním papíře má řadu výhod: stabilita analytů v pevné fázi, snadná technika odběru, pohodlná manipulace a transport.

V klinické laboratoři je z karty na příslušném místě speciálním přístrojem vyraženo kolečko přesného průměru a umístěno do vialky nebo jamky mikrotitrační destičky, ve které probíhá další zpracování. Proužky nasáklé vzorkem jsou zpracovávány celé nebo se vezme jejich definovaná část. Objem krve nebo moči připadající na určitou plochu papíru je stanoven předem např. takto²⁹: vytvoří se dvě skvrny vzorku se standardním přídatkem analytu. Druhá skvrna musí obsahovat definovaný objem vzorku (V). Z první skvrny se vyrazí kolečko o přesné ploše (S), druhá se vystříhne celá. Proveďte se stanovení analytu v obou vzorcích. Objem vzorku připadající na jednotkovou plochu filtračního papíru (V_S) je pak definován takto:

$$V_S = (m_1 \cdot V) / (m_2 \cdot S)$$

kde m_1 , resp. m_2 jsou stanovené hmotnosti analytu v části první skvrny o ploše S , resp. v druhé skvrně.

Nutnou podmínkou tedy je, aby k analýze odebraný papír byl kompletně napuštěný vzorkem – tak je možné dosáhnout postačující přesnosti a správnosti stanovení.

3.2. Příprava vzorku k analýze

V případě vzorků na filtračním papíře je nutné analyty nejdříve převést zpět do roztoku extrakcí vodou¹⁴ nebo směsí vody a methanolu²³ za podpory sonikace nebo třepání.

Stanovení koncentrace analytů se provádí metodou přídatku isotopově značených standardů (viz 3.6.). Tyto standardy bývají nejčastěji přidány do rozpouštědla, kterým se extrahuje papír, případně ještě před vlastní extrakcí je definovaný objem roztoku standardů napipetován na proužek papíru napuštěný vzorkem^{23,28}.

Po extrakci je vzorek podroben odstředění, příp. filtraci a supernatant (filtrát) je převeden do čisté vialky nebo jamky mikrotitrační destičky. Takto připravené vzorky se buď přímo analyzují, anebo se provádí derivatizace.

Ke kapalným vzorkům moči nebo plazmy se přidává roztok isotopově značených standardů a po případné deproteinizaci acetonitrem a centrifugací se zpracovávají podobně jako extrakty z papíru.

Metody stanovení acylkarnitinů a většina metod stanovení aminokyselin využívají derivatizace analytů na butylestery. Esterifikují se karboxyly aminokyselin, karnitinu a acylů s dvěma karboxylovými skupinami. Blokování těchto skupin zabraňuje výskytu analytů ve formě neutrálních amfiontů a (v případě sloučenin se dvěma nebo více karboxylovými skupinami) záporně nabitých iontů již v roztoku. To výrazně zvyšuje podíl kladně ionizovaných molekul analytu v iontovém zdroji. Zvýšení účinnosti ionizace má za následek snížení detekčního limitu metody².

Před derivatizací se extrakt odpaří do sucha v proudu dusíku. K odparku se přidává 3 M-HCl v butan-1-olu příp. směs acetylchloridu a butanolu. Esterifikace probíhá 15 až 30 minut při teplotě 65 °C. Pak se přebytečný butanol a HCl odpaří v proudu dusíku. Nakonec se odparek rozpustí v rozpouštědle vhodném pro další analýzu (viz 3.3.).

Žlučové kyseliny se ze vzorku moči, krve, plazmy nebo i žluči izolují extrakcí pevnou fází na C-18 kolonkách^{24,26,27}. Jiný postup²⁵ je založen na přídatku roztoku isotopově značených standardů a acetonitrilu k plazmě. Po centrifugaci se supernatant odpaří k suchu, odparek se rozpustí a analyzuje.

Purinové a pyrimidinové metabolity se pouze extrahu-

jí z proužků filtračního papíru bez další derivatizace^{23,28}.

Metoda pro stanovení mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem využívá jejich převedení na dimethylaminoethyls-tery¹¹.

3.3. Zavádění vzorku, spojení s vysokoučinnou kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou

Největší přínos zejména pro screening lze připsat aplikacím, které se obejdou bez předchozí separace vzorku na chromatografické koloně. Do tohoto stadia byly dopracovány některé metody stanovení acylkarnitinů, aminokyselin a mastných kyselin s dlouhým řetězcem. K tomu přispěla zejména skutečnost, že měkké ionizační techniky poskytují jednoduché pseudomolekulární ionty analytů, a ne fragmenty, tak jako elektronová ionizace. Systém pro analýzu bez on-line separace se skládá z HPLC čerpadla, automatického dávkovače a hmotnostního spektrometru, které jsou zapojeny v sérii. Čerpadlo zajišťuje kontinuální průtok v řádu desítek $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Složení „mobilní fáze“ je podobné jako v případě chromatografie na reverzní fázi (viz níže). Automatický dávkovač v pravidelných intervalech dvou až pěti minut nastříkuje vzorky (5 až 20 μl) – jedná se tedy o průtokovou analýzu.

Spojení HPLC/MS/MS je nutné využít zejména tehdy, kdy je potřeba rozdělit isomery nerozlišitelné ani tandemovou hmotnostní spektrometrií (což jsou v rámci diagnostiky DMP výjimečné případy), nebo je účinnost ionizace pro dané analyty snižována současnou přítomností složek matrice v iontovém zdroji a signál se ztrácí v šumu^{23,28}. HPLC se pak realizuje na běžných analytických kolonách C-18 délky 100–250 mm, někdy i kratších^{22,25}. Pracuje se isokraticky nebo gradientovou elucí, pH mobilní fáze (směs methanolu nebo acetonitrilu

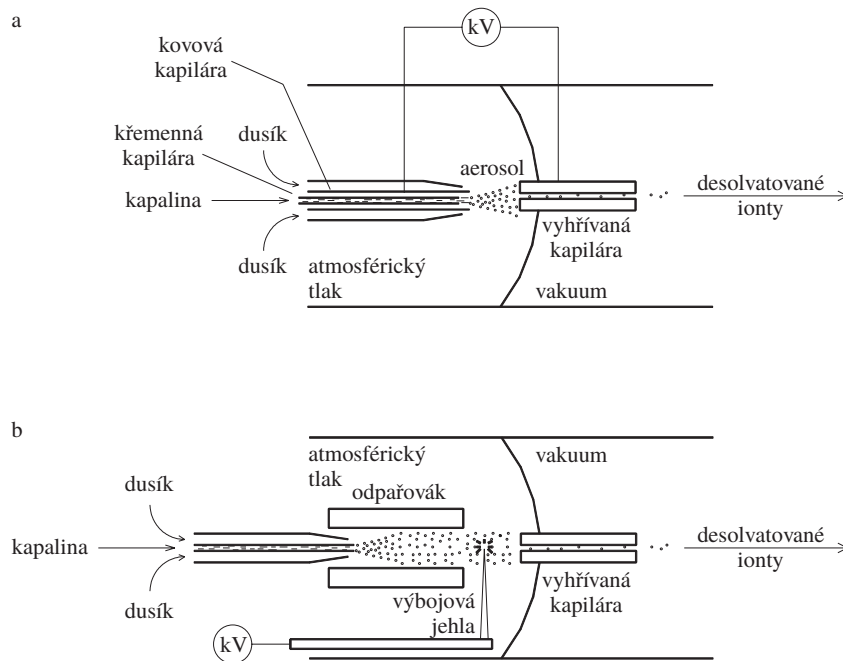
a vody) bývá upraveno přidávkem kyseliny (mravenčí, octová, trifluoroctová) anebo těkavým pufrem (mravenčan, octan amonný).

Pokrok v rozvoji elektroforetických metod a jejich spojení s hmotnostní spektrometrií přes elektrosprejové rozhraní s sebou přináší i diagnostické aplikace techniky CE/ESI/MS/MS (cit.²⁰), kterou je možné považovat za alternativu spojení HPLC/MS/MS. Výhodou CE je práce s malým objemem vzorku, minimální potřeba jeho předúpravy a nízká spotřeba chemikálií. Rutinnímu využití této techniky zatím brání technické obtíže jejího spojení s hmotnostní spektrometrií, nevýhodou je rovněž vysoká koncentrační mez detekce.

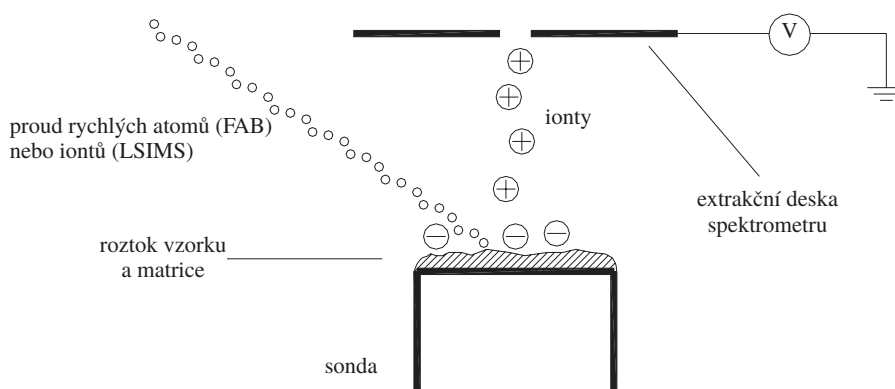
3.4. Iontové zdroje

V současnosti je elektrosprej (obr. 1a) nejpoužívanější iontový zdroj v oblasti hmotnostní spektrometrie nízkomolekulárních metabolitů. Je vhodný pro středně polární až iontové látky. Ionizace nastává odpařováním nabitých kapiček roztoku vzorku rozprašovaného proti vstupní štěrbině spektrometru z tzv. ESI jehly (kovové kapiláry) připojené na vysoký potenciál 3–5 kV. ESI zdroj je vhodný pro průtoky od jednotek do několika málo stovek $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, proto se v případě spojení s HPLC využívá děliče toku, aby bylo dosaženo optimálního průtoku eluátu do iontového zdroje. Při spojení s CE se naopak průtok zvyšuje pomocnou kapalinou (methanol apod.) na několik $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ (při použití nanospreje se pracuje bez této pomocné kapaliny).

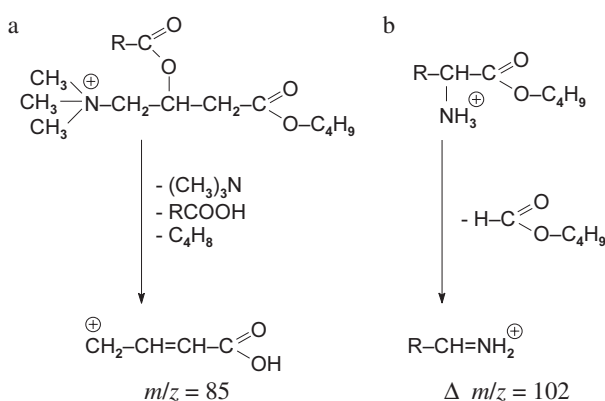
Rozhraní pro chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (obr. 1b) je alternativou elektrosprejové ionizace. Komerční přístroje bývají obvykle vybaveny oběma typy ionizace, jejichž záměna je snadná a netrvá více než několik minut. Obecně je APCI vhodná pro méně polární látky než ESI, i když oblasti vhodné polarity analytů se u obou technik do značné



Obr. 1. Zjednodušená schémata ESI (a) a APCI (b), uspořádání s vyhřívanou kapilárou



Obr. 2. Zjednodušené schéma FAB a LSIMS

Obr. 3. Kolizí indukovaná disociace butylesterů acylkarnitinů^{8,21} (a) a aminokyselin^{16,17} (b)

míry překrývají. V rozhraní APCI se roztok vzorku zmlžuje do vyhřívaného prostoru cylindrického odpařovačku. Směs horkých par a plynů pak proudí oblastí koronového výboje u špičky jehly, kterou prochází proud o velikosti několik μA . Výboj ionizuje molekuly rozpouštědla a zmlžujícího plynu (dusíku), a tyto ionty předávají náboj molekulám analytů. APCI je v diagnostice DMP používána daleko méně než ESI. Důvodem je např. vyšší spotřeba rozpouštědel a vzorku: dolní hranice optimálního průtoku pro běžná rozhraní APCI je asi $200 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Vývojově starší měkké ionizační techniky FAB a LSIMS (obr. 2) jsou založené na aplikaci roztoku vzorku na sondu vkládanou do iontového zdroje. Na sondu je zaměřen paprsek rychlých atomů Xe (FAB) nebo iontů Cs⁺ (LSIMS). Dopad rychlých částic způsobí ionizaci molekul vzorku a jejich převedení z kapalně do plynné fáze. Rozpouštědlo musí obsahovat glycerol, zajišťující obnovu kapalného filmu na sondě, aby měl signál dostatečnou dobu trvání. Existují průtočné modifikace těchto technik (*continuous flow*) určené pro spojení s HPLC; i v tomto případě je nutný přídavek glycerolu do mobilní fáze.

Všechny výše uvedené měkké ionizační techniky poskytují nejčastěji pseudomolekulární ionty [M+H]⁺ a [M-H]⁻. Někdy dochází i k tvorbě aduktů s jinými kationty, jako jsou

např. [M+Na]⁺, [M+NH₄]⁺, [M-2H+Na]⁻ a klastrových iontů, např. [M+M+H]⁺, [M+M+Na]⁺, [M+M-H]⁻.

3.5. Analyzátor iontů, skenovací režimy

V diagnostice DMP se téměř výhradně používá trojitý kvadrupól (uspořádání QQQ). První a třetí kvadrupól (Q₁ a Q₃) slouží jako analyzátor iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z), druhý kvadrupól (Q₂) plní funkci kolizní cely. V prostoru Q₂ podléhají pseudomolekulární ionty kolizí indukované disociaci (CID). Kolizním plynem bývá inertní plyn (Ar, Xe, He, N₂) pod tlakem desetin Pa a kolizní energie se pohybuje v řádu desítek eV.

Různými kombinacemi funkcí Q₁ a Q₃ se nastavují následující režimy skenování:

Sledování vybraného dceřiného iontu (Selected reaction monitoring, SRM)

Q₁ i Q₃ jsou nastaveny na ionty se specifickým m/z , tzn. ze všech iontů vzniklých ve zdroji se vybere jeden (Q₁) a po fragmentaci v Q₂ se pomocí Q₃ vybere jeden jeho fragment (většinou ten s největším zastoupením), který prochází až do detektoru. Takto se postupuje u všech analytů obsažených ve vzorku. SRM se mj. používá v případech stanovení více analytů, z nichž každý fragmentuje jiným mechanismem. V rámci diagnostiky DMP to jsou purinové a pyrimidinové látky a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem.

Sledování dceřiných iontů (Product (daughter) ion scan)

Q₁ je nastaven na ion se specifickým m/z , Q₃ skenuje určitý interval m/z , tzn. ze všech iontů vzniklých ve zdroji se vybere jeden (Q₁) a po fragmentaci v Q₂ se pomocí Q₃ sledují všechny jeho fragmenty. Tento režim se používá zejména při vývoji metody, protože poskytuje nejvíce informací o struktuře látky a o průběhu její fragmentace.

Sledování mateřských iontů (Precursor (parent) ion scan)

Q₁ skenuje určitý interval m/z , Q₃ je nastaven na ion se specifickým m/z , tzn. že Q₁ postupně vybírá ionty z daného intervalu m/z a Q₃ sleduje, zda a v jaké míře z nich vzniká fragment s nastavenou hodnotou m/z . Sken se využívá při

sledování skupiny strukturně příbuzných analytů s podobnou fragmentací, v případě diagnostiky DMP jsou to acylkarnitiny poskytující fragment $m/z = 85$ (obr. 3a).

Sledování neutrální ztráty (Neutral loss scan)

Q_1 skenuje interval m/z . Q_3 zároveň skenuje interval s m/z nižší o určitou konstantní hodnotu, tzn. Q_1 postupně vybírá ionty z daného intervalu m/z a Q_3 sleduje, zda a v jaké míře při fragmentaci ztrácejí ze své struktury neutrální část dané hmotnosti. Stejně jako „precursor ion scan“ se „neutral loss scan“ používá pro strukturně příbuzné analyty; pro diagnostické účely jsou to především aminokyseliny, které odštěpují butylesterovou skupinu a vodík jako butyl-formiát ($\Delta m/z = 102$, obr. 3b).

3.6. Zpracování a vyhodnocení primárních dat

Diagnostické metody směřují ke stanovení koncentrací metabolitů. Pro hmotnostní spektrometrii neplatí žádný jednoduchý vztah mezi absolutním signálem detektoru a koncentrací analytu, koncentrace analytů se proto stanovuje na základě kalibrace signálu analytu vůči signálu vnitřního standardu. Jako vnitřní standardy se v hmotnostní spektrometrii s výhodou užívají isotopově značené molekuly samotných analytů. Značení se provádí stabilními isotopy ^2H , ^{13}C nebo ^{15}N . Standardy obsahují alespoň tři atomy těchto nuklidů, aby jejich signál nebyl zvyšován příspěvkem píků majících původ v přirozeném výskytu těžších isotopů H, C, N, O a S v molekulách analytu.

Signálem daného iontu se rozumí výška, případně plocha píku u příslušné hodnoty m/z integrovaná přes všechny skeny věnované sledování tohoto iontu. Koncentrace analytu je pak zjištěna z kalibrační závislosti poměru signálu analytu a signálu vnitřního standardu na koncentraci analytu při konstantní koncentraci vnitřního standardu. Sestrojit kalibrační závislost je nutné zejména v případech, kdy pro některé analyty nejsou isotopově značené standardy dostupné, a stanovení se pak provádí pomocí standardu podobné struktury.

Kromě koncentrace jednotlivých metabolitů jsou často užitečné i další ukazatele, jako jsou poměry koncentrací nebo i jen prosté poměry signálů dvou metabolitů. Rozhodnutí o diagnóze se učiní jejich porovnáním s referenčními hodnotami stanovenými jako určitý kvantil souboru hodnot charakterizujících zdravou populaci.

Významným aspektem především screeningových metod je využití výpočetní techniky pro automatické vyhodnocení naměřených dat. Systémy analyzující až několik stovek vzorků za den shromažďují tak obrovské množství dat, že jejich „manuální“ posuzování je v podstatě nemožné. Řešením je počítačové vyhodnocování – na základě přednastavených referenčních hodnot se vzorky rozdělí na klinicky vyhovující a na vzorky, které mohou vypovídat o metabolické poruše a je potřeba se jimi dále zabývat. Takový algoritmus detailně popisuje např. Rashed a spol.¹

4. Závěr

V uplynulých deseti letech došlo k významnému posunu v diagnostice DMP. Přejít od spojení GC/MS s klasickou

ionizací elektronem k moderním ionizačním technikám umožnil vyvinout metody s velmi vysokou dostupností vzorků. Ionizace za atmosférického tlaku (ESI, APCI) v oblasti diagnostiky DMP nahrazuje i starší měkké ionizační techniky FAB a LSIMS.

Přednost moderních metod je nutno vidět zejména v možnosti prvotního záchytu jedinců s DMP, i když definitivní diagnóza je v každém konkrétním případě ověřována a potvrzována nezávislými metodami (stanovení aktivity enzymu spojeného s danou poruchou, analýza příslušného genu aj.). Plošný screening je v současnosti prováděn jen v některých vyspělých státech (např. USA, Nizozemsko, SRN); v budoucnosti však lze očekávat významné rozšíření screeningu DMP tandemovou hmotnostní spektrometrií i do dalších států.

Seznam použitých zkratk

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
CE	kapilární elektroforéza
CID	kolizí indukovaná disociace
CoA	koenzym A
DMP	dědičné metabolické poruchy
ESI	ionizace elektrosprejem
FAB	ionizace nárazem rychlých atomů
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LSIMS	hmotnostní spektrometrie s ionizací z kapalně matrice nárazem rychlých iontů
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie

Práce vznikla za podpory MŠMT ČR (grant MSM 153100013).

LITERATURA

1. Rashed M. S., Bucknall M. P., Little D., Awad A., Jacob M., Alamoudi M., Alwattar M., Ozand P. T.: Clin. Chem. 43, 1129 (1997).
2. Chace D. H.: Chem. Rev. 101, 445 (2001).
3. Bauer M. F., Gempel K., Hofmann S., Jaksch M., Philbrook C., Gerbitz K.: Clin. Chem. Lab. Med. 37, 855 (1999).
4. Wanders R. J. A., Vreken P., den Boer M. E. J., Wijburg F. A., van Gennip A. H., Ijlst L.: J. Inherited Metab. Dis. 22, 442 (1999).
5. Albers S., Marsden D., Quackenbush E., Stark A. R., Levy H. L., Irons M.: Pediatrics 107, e103 (2001) (URL: <http://www.pediatrics.org>).
6. Vianey-Saban C., Guffon N., Delolne F., Guibaud P., Mathieu M., Divry P.: J. Inherited Metab. Dis. 20, 411 (1997).
7. Vreken P., van Lint A. E. M., Bootsma A. H., Overmars H., Wanders R. J. A., van Gennip A. H.: J. Inherited Metab. Dis. 22, 302 (1999).
8. Chace D. H., Hillman S. L., Van Hove J. L. K., Naylor E. W.: Clin. Chem. 43, 2106 (1997).
9. Clayton P. T., Doig M., Ghafari S., Meaney C., Taylor C., Leonard J. V., Morris M., Johnson A. W.: Arch. Dis. Child. 79, 109 (1998).
10. Chace D. H., DiPerna J. C., Mitchell B. L., Sgroi B., Hofman L. F., Naylor E. W.: Clin. Chem. 47, 1166 (2001).

11. Johnson D. W.: *J. Inherited Metab. Dis.* 23, 475 (2000).
12. Van Hove J. L. K., Kahler S. G., Feezor M. D., Ramakrishna J. P., Hart P., Treem W. R., Shen J.-J., Matern D., Millington D. S.: *J. Inherited Metab. Dis.* 23, 571 (2000).
13. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: *Harperova biochemie*. H&H, Jinočany 1998.
14. Tuchman M., McCann M. T.: *Clin. Chem.* 45, 571 (1999).
15. Chace D. H., Sherwin J. E., Hillman S. L., Lorey F., Cunningham G. C.: *Clin. Chem.* 44, 2405 (1998).
16. Chace D. H., Millington D. S., Terada N., Kahler S. G., Roe C. R., Hofman L. F.: *Clin. Chem.* 39, 66 (1993).
17. Chace D. H., Hillman S. L., Millington D. S., Kahler S. G., Roe C. R., Naylor E. W.: *Clin. Chem.* 41, 62 (1995).
18. Buchanan D. N., Muenzer J., Thoene J. G.: *J. Chromatogr.* 534, 1 (1990).
19. Ito T., Kidouchi K., Sugiyama N., Kajita M., Chiba T., Niwa T., Wada Y.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 670, 317 (1995).
20. He T., Quinn D., Fu E., Wang Y. K.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 727, 43 (1999).
21. Rashed M. S., Ozand P. T., Harrison M. E., Watkins P. J. F., Evans S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 129 (1994).
22. Magera M. J., Helgeson J. K., Matern D., Rinaldo P.: *Clin. Chem.* 46, 1804 (2000).
23. Ito T., van Kuilenburg A. B. P., Bootsma A. H., Haasnoot A. J., van Cruchten A., Wada Y., van Gennip A. H.: *Clin. Chem.* 46, 445 (2000).
24. Evans J. E., Ghosh A., Evans B. A., Natowicz M. R.: *Biol. Mass Spectrom.* 22, 331 (1993).
25. Bootsma A. H., Overmars H., van Rooij A., van Lint A. E. M., Wanders R. J. A., van Gennip A. H., Vreken P.: *J. Inherited Metab. Dis.* 22, 307 (1999).
26. Libert R., Hermans D., Draye J.-P., van Hoof F., Sokal E., de Hoffmann E.: *Clin. Chem.* 37, 2102 (1991).
27. Lemonde H. A., Johnson A. W., Clayton P. T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 1159 (1999).
28. van Lenthe H., van Kuilenburg A. B. P., Ito T., Bootsma A. H., van Cruchten A., Wada Y., van Gennip A. H.: *Clin. Chem.* 46, 1916 (2000).
29. Hill J. B., Palmer P.: *Clin. Chem.* 15, 381 (1969).

P. Fryčák^a, K. Lemr^a, T. Adam^b, and R. Hušková^b
(^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, ^bLaboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Chemistry, Medical Hospital, Olomouc): **Diagnostics of Some Inherited Metabolic Disorders by Mass Spectrometry Using Modern Ionisation Techniques**

The review deals with the progress in the diagnostics of inherited metabolic disorders by mass spectrometry in the last decade. It is focused on the atmospheric pressure ionisation techniques, i.e. electrospray ionisation and atmospheric pressure chemical ionisation. The first part of the article describes very briefly the molecular causes of inherited metabolic disorders, such as disorders of metabolisms of fatty acids, amino acids, bile acids, purine and pyrimidine and related metabolites. The other part describes the procedures from sampling over the analysis itself to the raw data evaluation.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

DEGRADACE SUPRAMOLEKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ TYPU HOSTITEL–HOST INDUKOVANÁ HYDROXYLOVÝMI RADIKÁLY – VLIV HOSTITELE NA REAKTIVITU HOSTA

LENKA HYKRDOVÁ

Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Akademie věd
České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
e-mail: lenka.hykrdova@jh-inst.cas.cz

Došlo 4.3.02, přepracováno 5.12.02, přijato 12.12.02.

Klíčová slova: supramolekulární komplex, hostitel–host, fotodegradace, hydroxylový radikál

Obsah

1. Úvod
2. Experimentální část
3. Výsledky a diskuse
 - 3.1. Inkluzní komplex naftalenu s α -cyklodextrinem
 - 3.1.1. UV/VIS absorpční spektroskopie – stechiometrie, rovnovážné konstanty a konformace komplexu
 - 3.1.2. Nanosekundová laserová fotolýza – reaktivita molekuly naftalenu
 - 3.1.3. Rychlostní konstanty reakcí s hydroxylovým radikálem
 - 3.1.4. Degradace fotoindukovaná Fe^{3+}
 - 3.2. Inkluzní komplex 4-chloranilinu s kalix[4]arenem
 - 3.2.1. UV/VIS absorpční a $^1\text{H-NMR}$ spektroskopie: stechiometrie, rovnovážná konstanta a konformace komplexu
 - 3.2.2. Reakce s hydroxylovými radikály
 - 3.2.3. Degradace fotoindukovaná chloristanem železitým
4. Závěr

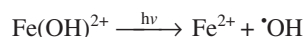
1. Úvod

Degradace organických škodlivin zamořujících životní prostředí je možná s využitím tzv. pokročilých oxidačních procesů (advanced oxidation processes)¹, založených na tvorbě hydroxylových radikálů. Tyto reaktivní částice napadají organické molekuly, které jsou pak v několika následných reakčních krocích za účasti kyslíku mineralizovány až na CO_2 , H_2O a příslušné minerální kyseliny. Dvojice některých organických látek vzájemně příhodných strukturálních vlastností vytvářejí tzv. supramolekulární komplexy typu hostitel–host (inkluzní komplexy). Vzhledem k jejich rostoucímu praktickému využívání v různých chemických a biologických pro-

cesech, např. při výrobě léků, katalýze analogické působení enzymů, při vývoji molekulárních senzorů, v genetickém inženýrství² atd., je důležité posoudit, jak vznik takových komplexů ovlivňuje reaktivitu jejich jednotlivých složek. Problematikou degradace supramolekulárních komplexů se dosud zabývalo jen několik autorů^{3,4}.

V této studii byly pro roli hostů vybrány dvě sloučeniny, jejichž zvýšený výskyt v životním prostředí je nežádoucí, a to naftalen a 4-chloranilin. V naší laboratoři^{5,6} byla studována jejich degradace fotoindukovaná trojmocným železem. Jako hostitel naftalenu byl zvolen α -cyklodextrin (*I*), jehož schematický vzorec je na obrázku 1. Jejich inkluzní komplexy jsou stabilizovány van der Waalovými silami. Tetrasulfonovaný derivát kalix[4]arenu (*II*) (cit.⁷) v deprotonované formě (obr. 1) představoval vhodnou hostitelskou molekulu pro protonovaný 4-chloranilin. Stabilitu tohoto systému pak zajišťovaly převážně elektrostatické přitažlivé síly mezi opačně nabitými složkami⁸.

Vodné roztoky solí trojmocného železa podléhají hydrolyze za vzniku různých hydroxokomplexů a oligomerních rozpustných agregátů⁹, jejichž fotochemické reakce vedou k produkci hydroxylových radikálů. Nejvyšší fotoaktivita byla zjištěna u komplexního iontu $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}]^{2+}$ (zkráceně označovaného jako $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$). Jeho fotolýzu lze popsat rovnicí:

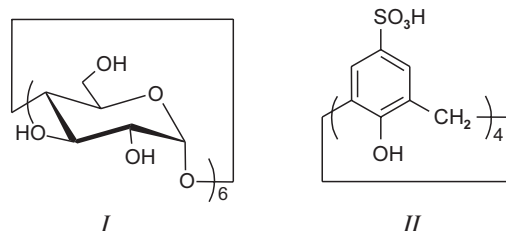


Železnaté ionty jsou v průběhu reakce za přítomnosti kyslíku reoxidovány na Fe^{3+} (cit.¹⁰⁻¹²).

2. Experimentální část

Naftalen (scintillation grade, Eastman Kodak Company N.Y.), α -cyklodextrin (Fluka), 4-chloranilin (98 %, Aldrich), sodná sůl tetrasulfonovaného kalix[4]arenu (cit.⁷) a kyselina chloristá (p.a., Merck) byly použity bez dalšího přečištění. Roztoky Fe^{3+} byly připravovány rozpuštěním chloristanu železitého $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (>97 %, Fluka) v deionizované vodě (Millipore αQ).

Pro kontinuální fotoindukovanou degradaci byla použita dvě různá experimentální uspořádání. V prvním případě byl vzorek umístěn do mikrofotoreaktoru tvořeného standardní

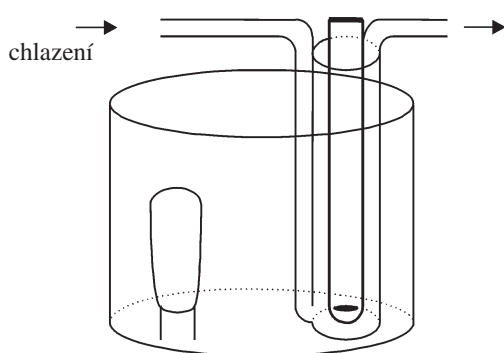


Obr. 1. Schematické vzorce α -cyklodextrinu (*I*) a tetrasulfonovaného derivátu kalix[4]arenu (*II*)

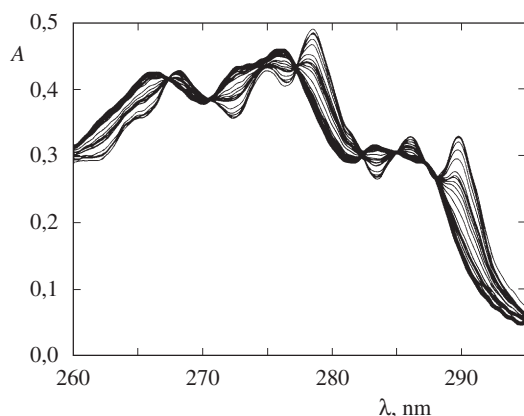
křemennou spektroskopickou kyvetou (optická délka 1 cm) a ozařován vysokotlakou rtuťovou výbojkou (Osram HBO 200 W) s vřazeným monochromátorem (Bausch and Lomb). V druhém případě byl reakční roztok (objem do 100 ml) ozařován ve válcovitém fotoreaktoru z křemenného skla střednětlakou rtuťovou výbojkou (Mazda MAW typ 125 W), emitující z 93 % při 365 nm (viz obr. 2). Roztok ve fotoreaktoru byl chlazen vodou protékající pláštěm z křemenného skla. Intenzita vstupujícího záření byla stanovena ferrioxalátovým aktinometrem¹³. Při užití metody nanosekundové spektroskopie byla excitace prováděna excimerovým laserem (Lambda Physics) nebo laserem Nd:YAG (Quanta-Ray DCR-1).

Pro měření absorpčních UV/VIS spekter byly použity spektrofotometry Cary 3 (Varian) a Lambda 19 (Perkin-Elmer). ¹H-NMR spektra byla získána na přístroji Bruker AC400 při frekvenci 400 MHz v prostředí D₂O okyselené přidávkou CD₃COOD (1,0·10⁻² mol.l⁻¹).

Pro analýzy HPLC byly použity sestavy Waters 510 (autosampler Waters 717 a DA detektor Waters 996) a Merck (L-6200A Intelligent Pump, UV-VIS absorpční detektor L-4250 a integrátor D-2500), v obou případech s chromatografickou kolonou s reverzní fází Lichrospher RP 18 (Merck)



Obr. 2. Schéma fotoreaktoru



Obr. 3. Absorpční spektra vodného roztoku naftalenu (1,13·10⁻⁴ mol.l⁻¹) bez α-cyklo-dextrinu (tučná křivka) a obsahujícího α-cyklo-dextrin o koncentraci: 0,625; 2,5; 3,75; 4,38; 16,25; 50; 62,5; 93,7; 125; 137,5; 150; 175; 187,5; 250; 312,5; 375; 437,5 a 500·10⁻³ mol.l⁻¹

o délce 250 mm, vnitřním průměru 4,6 mm, naplněnou částicemi o průměru 10 nm tvořícími kulovité shluky o průměru 5 μm. Detailní podmínky jednotlivých analýz jsou popsány v práci Belháčové⁵.

3. Výsledky a diskuse

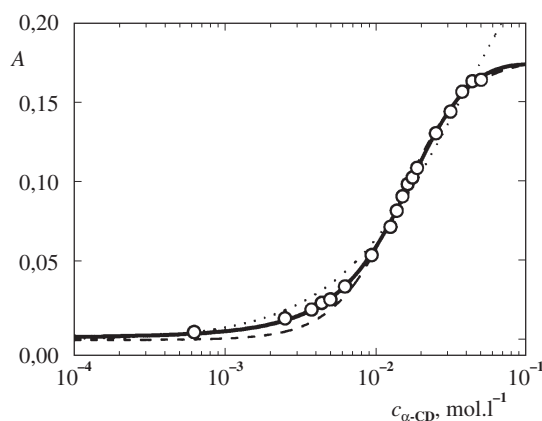
3.1. Inkluzní komplex naftalenu s α-cyklo-dextrinem

3.1.1. UV/VIS absorpční spektroskopie – stechiometrie, rovnovážné konstanty a konformace komplexu

Na základě změn v absorpčním spektru vodného roztoku naftalenu (1,13·10⁻⁴ mol.l⁻¹), k němuž byl přidáván α-cyklo-dextrin v koncentracích od 0 do 0,5 mol.l⁻¹, byla studována termodynamická rovnováha příslušného inkluzního komplexu (obr. 3). Při koncentracích α-cyklo-dextrinu přesahujících 3·10⁻³ mol.l⁻¹ se ve spektrech naftalenu zřetelně objevily isobestické body, vibrační struktura byla zvýrazněna a absorpční pásy se posunuly k delším vlnovým délkám, typickým pro naftalen v nepolárních rozpouštědlech. Pozorované spektrální změny byly v souladu s předpokladem, že dutina α-cyklo-dextrinu představuje nepolární prostředí¹⁴.

Termodynamická rovnováha inkluzního komplexu naftalenu s α-cyklo-dextrinem byla analyzována s použitím experimentální závislosti absorbance na koncentraci α-cyklo-dextrinu, a to pro vybrané vlnové délky, u nichž byla změna absorbance největší. Byly navrženy 3 modely, předpokládající i) vznik komplexu s poměrem naftalenu k α-cyklo-dextrinu 1:1, ii) následnou tvorbu komplexů 1:1 a 1:2 a iii) přímou tvorbu komplexu 1:2. Pro každý z těchto modelů byla metodou nelineární regrese proložena experimentálními daty teoretická křivka (obr. 4). Zatímco křivky odpovídající modelům i) a iii) nevystihovaly skutečné hodnoty zcela přesně, model (ii) pro následnou tvorbu komplexů 1:1 a 1:2 vykázal velmi dobrou shodu.

Hodnoty rovnovážných konstant $K_1 = 2,8 \pm 0,5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l}$

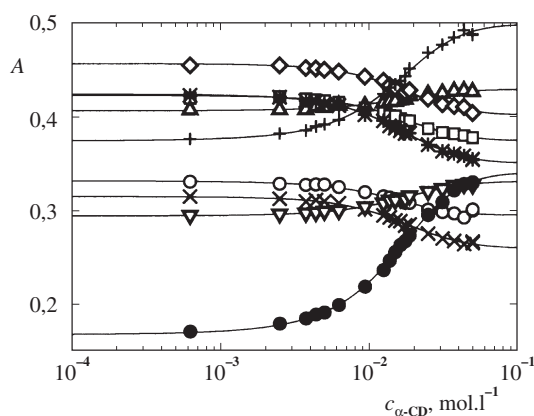


Obr. 4. Závislost absorbance (A) vodného roztoku naftalenu (1,13·10⁻⁴ mol.l⁻¹) při vlnové délce 298,75 nm na koncentraci α-cyklo-dextrinu (c_{α-CD}) a křivky proložené touto závislostí na základě modelů rovnovážně tvorby inkluzního komplexu 1:1 (.....); následného vzniku komplexů 1:1 a 1:2 (—); a přímé tvorby komplexu 1:2 (- - -)

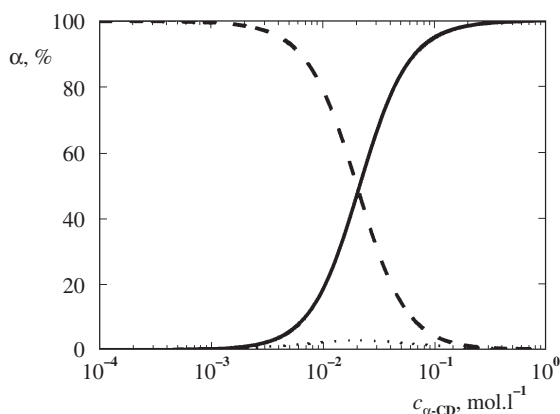
(odpovídající tvorbě komplexu 1:1) a $K_2 = 850 \pm 200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l}$ (pro následný vznik komplexu 1:2) byly získány souhrnným zpracováním experimentálních závislostí pro devět vybraných vlnových délek modelem *ii*) (obr. 5). Srovnání obou hodnot ukazuje, že komplex 1:2 je stabilnější než komplex 1:1, jehož zastoupení dosahuje nejvýše jen několika procent (obr. 6).

Grabner a spol.¹⁵ studovali konformaci a fotofyzikální chování komplexů naftalenu s cyklodextriny. V případě α -cyklodextrinu rovněž popsali komplex 1:2, přičemž součin konstant $K_1 \cdot K_2$ získaný dvěma různými postupy byl roven $3200 \text{ mol}^{-2} \cdot \text{l}^2$ a $3800 \text{ mol}^{-2} \cdot \text{l}^2$. Autoři rovněž zjistili převažující zastoupení komplexu 1:2 a odhadli, že konstanta K_2 je o několik řádů vyšší než konstanta K_1 .

Na základě kvantově chemických výpočtů byla navržena konformace komplexu 1:2. Nejprve byly semiempirickou metodou AM1 optimalizovány geometrie jednotlivých molekul. Pomocí molekulární mechaniky s využitím silového pole



Obr. 5. Závislost absorpance (A) vodného roztoku naftalenu ($1,13 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na koncentraci α -cyklodextrinu ($c_{\alpha\text{-CD}}$) pro vlnové délky 261 nm (O), 266,5 nm (□), 268 nm (Δ), 272,25 nm (*), 276,25 nm (◇), 278,5 nm (+), 283,5 nm (×), 286,25 nm (∇), 289,75 nm (●)



Obr. 6. Procentuální zastoupení (α) jednotlivých složek komplexu naftalenu ($1,13 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) s α -cyklodextrinem v závislosti na koncentraci α -cyklodextrinu ($c_{\alpha\text{-CD}}$); naftalen (- - -), komplex 1:1 (.....), komplex 1:2 (—)

MM+ pak byla minimalizací potenciální energie vypočtena nejpravděpodobnější konformace inkluzního komplexu naftalenu s dvěma molekulami α -cyklodextrinu (obr. 7).

3.1.2. Nanosekundová laserová fotolýza – reaktivita molekuly naftalenu

Reaktivita naftalenu rozpuštěného ve vodě a vázaného v komplexu se dvěma molekulami α -cyklodextrinu byla porovnána sledováním zániku jeho tripletového stavu metodou nanosekundové laserové fotolýzy. Vodné roztoky naftalenu jak bez α -cyklodextrinu, tak v jeho dostatečném nadbytku, byly ozářeny nanosekundovým laserovým pulsem ($\lambda = 308 \text{ nm}$), který excitoval naftalen do prvního singletového stavu. Ten se zčásti rychlou reakcí transformoval na déle žijící stav tripletový, jehož zánik byl sledován při vlnové délce odpovídající maximu triplet-tripletové absorpce (412 nm pro volný naftalen a 416 nm pro jeho komplex s α -cyklodextrinem). Roztoky byly nasyceny buď kyslíkem, nebo argonem. Tripletový stav inkudované molekuly naftalenu zanikal mnohem pomaleji (obr. 8), a to jak za přítomnosti, tak i nepřítomnosti kyslíku.

Pozorované vlivy byly detailně analyzovány s využitím kinetického modelu paralelních reakcí prvního a druhého řádu. Na zániku tripletového stavu se podílely tři souběžné reakce, a to intramolekulární deaktivace (s rychlostní konstantou prvního řádu k_1) a dva intermolekulární procesy, triplet-tripletová anihilace a zhášení kyslíkem (s rychlostními kon-

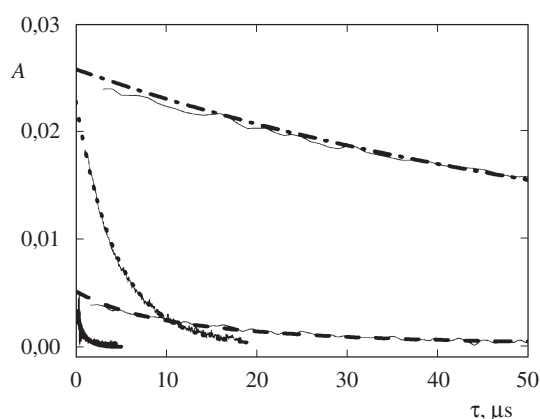


Obr. 7. Konformace inkluzního komplexu 1:2 tvořeného naftalenum (vyznačen černě) a α -cyklodextrinem (atomy H jsou vyznačeny bíle, C světle šedě, O tmavě šedě) navržená na základě kvantově chemických výpočtů

Tabulka I

Rychlostní konstanty zániku tripletového stavu naftalenu volného a v inkluzním komplexu 1:2 s α -cyklodextrinem

Prostředí	Plyn	k_{T-T} [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]	$k_2 [\text{O}_2] + k_1$ [s^{-1}]	k_1 [s^{-1}]	$k_2 [\text{O}_2]$ [s^{-1}]
Voda	Ar	$2,1\cdot 10^9$ ^a	$(3,3\pm 0,1)\cdot 10^4$	$3,3\cdot 10^4$ ^b	0
	vzduch	$2,1\cdot 10^9$ ^a	$(7,9\pm 0,1)\cdot 10^5$	$3,3\cdot 10^4$ ^b	$7,6\cdot 10^5$
	O ₂	$2,1\cdot 10^9$ ^a	$(1,14\pm 0,04)\cdot 10^6$	$3,3\cdot 10^4$ ^b	$1,1\cdot 10^6$
Dutina α -cyklodextrinu	Ar	$(9,6\pm 0,3)\cdot 10^7$	$(5,2\pm 0,1)\cdot 10^3$	$5,2\cdot 10^3$ ^b	0
	vzduch	$9,6\cdot 10^7$ ^b	$(1,46\pm 0,01)\cdot 10^5$	$5,2\cdot 10^3$ ^b	$1,4\cdot 10^5$
	O ₂	$9,6\cdot 10^7$ ^b	$(2,16\pm 0,01)\cdot 10^5$	$5,2\cdot 10^3$ ^b	$2,1\cdot 10^5$

^a Cit.¹⁵, ^b hodnota vypočtená pro roztok nasycený Ar

Obr. 8. Časová závislost zániku tripletového stavu naftalenu volně rozpuštěného (absorbance měřena při vlnové délce 412 nm) a v komplexu 1:2 s α -cyklodextrinem (měřeno při 416 nm) ve vodných roztocích nasycených O₂ resp. Ar; volný naftalen, O₂ (—); naftalen v komplexu, O₂ (---); volný naftalen, Ar (- - -); naftalen v komplexu, Ar (- · - · -). Experimentálními časovými závislostmi absorbance (slabé čáry) byly na základě kinetického modelu paralelních reakcí prvního a druhého řádu metodou nejmenších čtverců proloženy teoretické křivky (silné čáry)

stantami druhého řádu k_{T-T} a k_2). Rychlostní konstanty všech tří reakcí byly vyhodnoceny pro naftalen volný i vázaný v dutině tvořené dvěma molekulami α -cyklodextrinu (tabulka I). V důsledku vzniku komplexu byly všechny rychlostní konstanty sníženy.

Pozorovaný pokles reaktivity hosta inkudovaného v dutině hostitele při vlastní bimolekulární reakci i při reakci s malou molekulou (zhášení kyslíkem) je významným zjištěním s možnou souvislostí s reaktivitou hydroxylového radikálu s oběma složkami komplexu v průběhu jejich fotoindukované degradace (viz dále).

3.1.3. Rychlostní konstanty reakcí s hydroxylovým radikálem

Celková kinetika fotoindukované degradace je řízena rychlostí vzniku hydroxylového radikálu a jeho následnou primární reakcí s organickou látkou, tzv. OH-atakem¹⁶. Rychlostní konstanta reakce druhého řádu hydroxylového radikálu s danou organickou sloučeninou tedy představuje důležitou

veličinu, korelující s formální rychlostní konstantou prvního řádu fotoindukované pseudomonomolekulární degradace této organické látky.

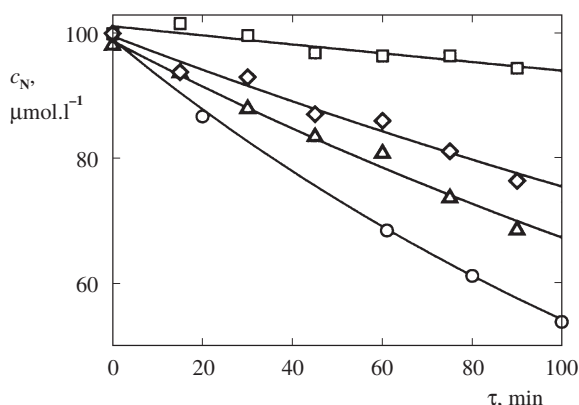
Rychlostní konstanta reakce hydroxylového radikálu s naftalenum, $k_N = 1,2\cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, byla převzata z literatury¹⁷. Rychlostní konstanta reakce hydroxylového radikálu s α -cyklodextrinem byla stanovena metodou popsanou Macounovou a spol.¹⁸, založenou na nanosekundové laserové fotolýze vodných roztoků obsahujících $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a zkoumanou organickou sloučeninou a současně nasycených N₂O. Vyhodnocením experimentálních kinetických křivek odpovídajících různým koncentracím α -cyklodextrinu byla získána hodnota rychlostní konstanty reakce α -cyklodextrinu s hydroxylovým radikálem, $k_{CD} = (4,5\pm 0,2)\cdot 10^9 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$.

Hodnoty rychlostních konstant reakcí obou složek komplexu s hydroxylovým radikálem byly následně využity při kinetické analýze fotoindukovaných procesů, tj. pro srovnání reakční rychlosti degradace naftalenu volného a vázaného v inkluzním komplexu s α -cyklodextrinem.

3.1.4. Degradace fotoindukovaná Fe³⁺

Kinetika fotoindukované degradace naftalenu za přítomnosti α -cyklodextrinu byla sledována s použitím mikrofoto-rektoru (popsaného v experimentální části) během kontinuálního monochromatického ozařování ($\lambda = 365 \text{ nm}$). Roztoky obsahovaly $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ naftalenu, různé koncentrace α -cyklodextrinu a $3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ (50 % $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$) (cit.^{5,10}). Změna koncentrace naftalenu v průběhu degradace byla stanovována chromatograficky. Za účelem kvantifikace počáteční reakční rychlosti byly několika prvními experimentálními body prokládány kinetické křivky prvního řádu (obr. 9).

Získané rychlostní konstanty k_{exp} jsou shrnuty v tabulce II a porovnány s hodnotami hypotetických rychlostních konstant k_{vyp} vypočtených pro reakční soustavu naftalenu (N) s α -cyklodextrinem (CD) za modelového předpokladu, že tyto komponenty spolu netvoří inkluzní komplexy a že jsou degradovány nezávisle. V tomto modelu pak obě složky pouze kineticky soutěží o hydroxylové radikály a podléhají nezávislým transformacím indukovaným OH-ataky, které řídí celkovou kinetiku jejich dílčích degradací. Příslušné formální rychlostní konstanty degradace naftalenu a α -cyklodextrinu jsou pak přímo úměrné rychlostním konstantám druhého řádu jejich dílčích reakcí s hydroxylovým radikálem (viz část 3.1.3.).



Obr. 9. Závislost koncentrace naftalenu (c_N) na době ozařování (τ) v průběhu jeho degradace fotoindukované $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ ($3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, 50 % $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$) za přítomnosti α -cyklodextrinu o koncentracích 0 (O), $6 \cdot 10^{-4}$ (Δ), $6 \cdot 10^{-3}$ (\diamond) a $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ (\square); experimentálními body jsou proloženy teoretické kinetické křivky prvního řádu

Na tomto základě lze formulovat jednoduchý kinetický model. Reakční rychlost vzniku hydroxylového radikálu ($v_{\text{vznik}}^{(\text{OH})}$) je úměrná intenzitě světla (I_{abs}) absorbovaného Fe^{3+} :

$$v_{\text{vznik}}^{(\text{OH})} = \Phi_{\text{OH}} \cdot I_{\text{abs}} \quad (1)$$

kde Φ_{OH} je příslušný kvantový výtěžek. Reakční rychlost zániku hydroxylového radikálu ($v_{\text{zánik}}^{(\text{OH})}$) je dána součtem dvou příspěvků:

$$v_{\text{zánik}}^{(\text{OH})} = k_N [\cdot\text{OH}] [\text{N}] + k_{\text{CD}} [\cdot\text{OH}] [\text{CD}] \quad (2)$$

Za ustáleného stavu, tj. $v_{\text{vznik}}^{(\text{OH})} = v_{\text{zánik}}^{(\text{OH})}$, může být fotostacionární koncentrace hydroxylových radikálů vypočtena s využitím vztahů (1) a (2):

$$[\cdot\text{OH}] = \frac{\Phi_{\text{OH}} \cdot I_{\text{abs}}}{k_N [\text{N}] + k_{\text{CD}} [\text{CD}]} \quad (3)$$

Pokud je tato hodnota konstantní, lze pro matematický popis degradace naftalenu uplatnit kinetiku 1. řádu (4):

$$v_{\text{degrad}}^{\text{N}} = -\frac{d[\text{N}]}{d\tau} = k_N [\cdot\text{OH}] [\text{N}] = k_{\text{exp}} [\text{N}] \quad (4)$$

kde k_{exp} představuje formální konstantu prvního řádu získanou analýzou experimentálních dat pro rozklad naftalenu (obr. 9). Integrací vztahu (4) se obdrží výraz pro molární koncentraci naftalenu jako funkci doby ozařování τ :

$$[\text{N}] = [\text{N}]_0 e^{-k_{\text{exp}}\tau} \quad (5)$$

Tento vztah byl při zpracování experimentálních dat (obr. 9) použit k výpočtu hodnot rychlostních konstant k_{exp} uvedených v tabulce II. Pro případ nulové koncentrace α -cyklodextrinu, $[\text{CD}] = 0$, lze vyčíslit reakční rychlost vzniku hydroxylových radikálů $v_{\text{vznik}}^{(\text{OH})}$ a neznámý faktor $\Phi_{\text{OH}} I_{\text{abs}}$. S využitím vztahu (4) pak byla vyčíslena rovněž fotostacionární koncentrace hydroxylových radikálů, tj. $[\cdot\text{OH}] = 8,3 \cdot 10^{-15} \text{ mol.l}^{-1}$, a násled-

Tabulka II

Experimentální k_{exp} a vypočtené k_{vyp} rychlostní konstanty fotoindukované degradace naftalenu ($1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) za nepřítomnosti a přítomnosti α -cyklodextrinu

α -Cyclodextrin [mol.l ⁻¹]	Naftalen v komplexu [%]	k_{exp} [s ⁻¹]	k_{vyp} [s ⁻¹]
0	0,0	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$
0,0006	8,0	$(6,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$
0,006	50,6	$(4,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$4,3 \cdot 10^{-6}$
0,03	89,1	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$8,8 \cdot 10^{-7}$

ně z upraveného vztahu (3) též faktor $\Phi_{\text{OH}} \cdot I_{\text{abs}} = 1,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Rychlost vzniku hydroxylových radikálů nezávisí na koncentraci odbourávaných organických látek, a proto mohou být hodnoty získané za nepřítomnosti α -cyklodextrinu použity také k výpočtům pro reakční soustavy za jeho přítomnosti. Kombinací vztahů (3) a (4) lze odvodit vztah pro formální rychlostní konstantu prvního řádu degradace naftalenu za přítomnosti α -cyklodextrinu:

$$k_{\text{vyp}} = \frac{k_N \Phi_{\text{OH}} \cdot I_{\text{abs}}}{k_N [\text{N}] + k_{\text{CD}} [\text{CD}]} \quad (6)$$

Tento vzorec byl použit k výpočtu hodnot k_{vyp} uvedených v tabulce II. Srovnání hodnot k_{exp} a k_{vyp} ukázalo, že s rostoucí koncentrací α -cyklodextrinu, tj. s nižším zastoupením naftalenu volného a vyšším podílem naftalenu inkudovaného, vzrůstá poměr odpovídajících konstant k_{exp} a k_{vyp} (viz tabulka II). Degradace naftalenu tedy probíhala ve skutečnosti rychleji, než by se dalo očekávat u systému, v němž by nedocházelo ke vzniku supramolekulárních komplexů ani interakcím organických složek s radikálovými meziprodukty vznikajícími při degradacích indukovaných ataky hydroxylových radikálů.

Na rozdíl od ochranného efektu α -cyklodextrinu, pozorovaného při zániku tripletového stavu naftalenu, byla fotoindukovaná degradace hosta inkudovaného hostitelskými molekulami urychlena. Tento fakt je v souladu s představou o existenci následných radikálových reakcí, při nichž krátce žijící radikálové meziprodukty, vznikající primárním OH-atakem molekuly α -cyklodextrinu, reagují následně s inkudovanou molekulou naftalenu, a tak druhotně indukují její vlastní degradaci.

3.2. Inkluzní komplex 4-chloranilinu s kalix[4]arene

3.2.1. UV/VIS absorpční a ¹H-NMR spektroskopie: stechiometrie, rovnovážná konstanta a konformace komplexu

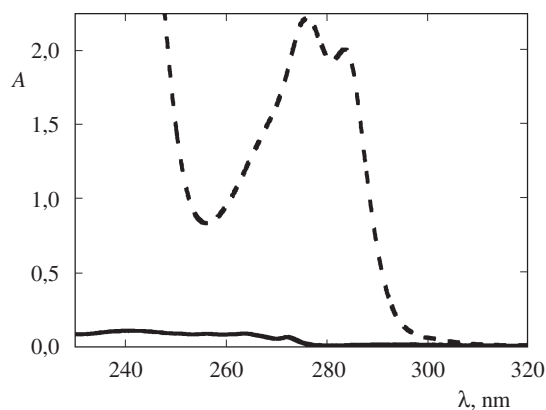
Výše uvedené ovlivnění reaktivity inkudovaného hosta hostitelskou molekulou bylo zkoumáno také pro supramolekulární komplex protonované formy 4-chloranilinu s deprotonovaným tetrasulfonovaným derivátem kalix[4]arenu. Ten

se od komplexu naftalenu s α -cyklodextrinem odlišuje charakterem hostitelské molekuly, iontovými interakcemi uplatňujícími se při stabilizaci komplexu a složitějším mechanismem degradace hosta. Zatímco hlavními degradačními cestami naftalenu byly jeho monomolekulární transformace⁵, při fotoindukované oxidační degradaci 4-chloranilinu dominovala jeho oligomerace⁶.

UV/VIS absorpční spektra komplexu i jeho jednotlivých složek, tj. 4-chloranilinu a derivátu kalix[4]arenu, byla měřena v roztocích obsahujících kyselinu chloristou o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ (obr. 10). Za těchto podmínek byl 4-chloranilin ($\text{p}K_{\text{b}} = 4,0$) téměř kvantitativně protonován a zároveň všechny čtyři sulfoskupiny kalix[4]arenu deprotonovány. Obě látky absorbovaly v téže spektrální oblasti, což znesnadnilo analýzu termodynamické rovnováhy komplexu.

Vzhledem k překrývajícím se spektrům obou složek byla pro zjištění stechiometrie komplexu a stanovení jeho rovnovážné konstanty použita Jobova metoda založená na spektroskopickém měření roztoků obsahujících vždy konstantní součet molárních koncentrací obou složek. Od každého spektra bylo pak odečteno hypotetické spektrum vypočtené pro příslušný roztok o stejném složení za předpokladu, že mezi 4-chloranilem a kalix[4]aremem nedochází k tvorbě komplexu. Nejvýraznější změny absorbance byly pozorovány při vlnové délce 272,4 nm. Závislosti jejich hodnot na poměrech koncentrací obou složek jsou znázorněny na obr. 11. Maximální rozdíl skutečné a vypočtené absorbance odpovídá složení inkluzního komplexu 1:1. Proložení teoretické křivky odpovídající experimentální závislosti byla vyčíslena rovnovážná konstanta $(5,8 \pm 4,3) \cdot 10^2 \text{ l.mol}^{-1}$. Velká statistická chyba je dána skutečností, že Jobova metoda je primárně určena ke zjišťování stechiometrie komplexů, a tudíž poskytuje méně přesné hodnoty rovnovážných konstant.

Při charakterizaci inkluzních komplexů tvořených deriváty kalixarenu je často využívána také NMR spektroskopie. Vznik komplexu 4-chloranilinu s kalix[4]aremem byl doprovázen negativní změnou chemického posunu všech protonů, a to v řádu setin až tisícín ppm (tabulka III). Arena a spol.⁸ pozorovali změny chemických posunů řádově v desetínách ppm u protonů těch částí molekul aromatických hostů (kationty *N,N,N*-trimethylanilinium a benzyltrimethylamonium),



Obr. 10. Absorpční spektra 4-chloranilinu ($0,93 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, —) a tetrasulfonovaného derivátu kalix[4]arenu ($0,99 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, - - -), při pH 2,0

kteří byly zanořeny hlouběji v dutině derivátu kalix[4]arenu, a v setínách ppm u protonů vně dutiny.

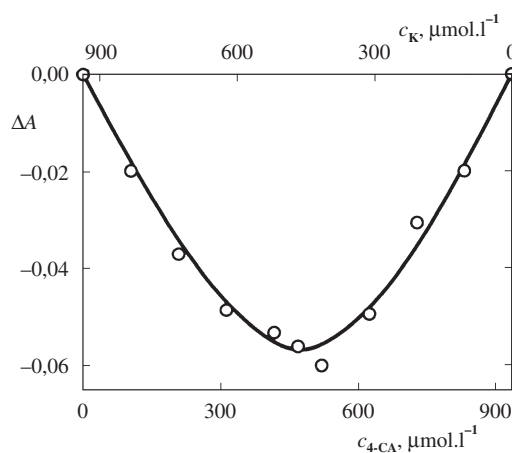
Kvantově chemickými výpočty byla také studována konformace komplexu protonovaného 4-chloranilinu s deprotonovaným tetrasulfonovaným derivátem kalix[4]arenu. Nejprve byly semiempirickou metodou AM1 optimalizovány geometrie jednotlivých molekul. Poté byly pomocí molekulární mechaniky s využitím silového pole MM+ nalezeny tři možné konformace inkluzního komplexu odpovídající lokálním minimům energie, a to struktura a s atomem chloru 4-chloranilinu směřujícím do dutiny kalix[4]arenu, struktura b s protonovanou aminoskupinou směřující do dutiny, struktura c s molekulou 4-chloranilinu orientovanou napříč dutinou. Pro tyto tři konformace byly dále provedeny výpočty simulující vodné prostředí (představované trojrozměrným kvádrem o rozměrech $15 \times 15 \times 20$ molekul vody). Energie optimalizovaných struktur byly srovnány s výše uvedenými hodnotami ve vakuu (tabulka IV). Solvatační příspěvky dosáhly podobných hodnot pro všechny tři konformace.

Optimalizované geometrie ve vodném prostředí byly dále podrobeny simulaci molekulární dynamiky, přičemž konformace a byla v důsledku vzájemného odpuzování atomu chloru a negativně nabitých sulfoskupin nestabilní. Konformace c by

Tabulka III

Změny chemických posunů v důsledku vzniku komplexu 4-chloranilinu s kalix[4]aremem. H_{Cl} : aromatický proton 4-chloranilinu v *meta*-poloze k aminoskupině; H_{NH_2} : aromatický proton 4-chloranilinu v *ortho*-poloze k aminoskupině; H_{arom} : aromatický proton kalix[4]arenu; H_{metylen} : proton metylenové skupiny kalix[4]arenu

4-Chloranilin: kalix[4]aren	H_{Cl}	H_{NH_2}	H_{arom}	H_{metylen}
14:1	-0,005	-0,006	-0,015	-0,010
3:10	-0,026	-0,014	-0,010	-0,009



Obr. 11. Závislost změny absorbance (ΔA) na vzájemných poměrech koncentrací 4-chloranilinu ($c_{4\text{-CA}}$) a kalix[4]arenu (c_{K}) v důsledku vzniku inkluzního komplexu; experimentálními body je proložena teoretická křivka pro komplex 1:1

měla v NMR spektrech vykazat čtyři různé signály pro aromatické protony 4-chloranilinu v důsledku jeho asymetrické orientace vzhledem k dutině kalix[4]arenu, což nebylo zjištěno. Jako nejstabilnější lze proto považovat konformaci b s protonovanou aminoskupinou 4-chloranilinu směřující do dutiny kalix[4]arenu (obr. 12). V důsledku relativně nízké rigidity kalix[4]arenového cyklu je však pravděpodobná existence dalších konformací, které mohou patrně snadno přecházet jedna v druhou.

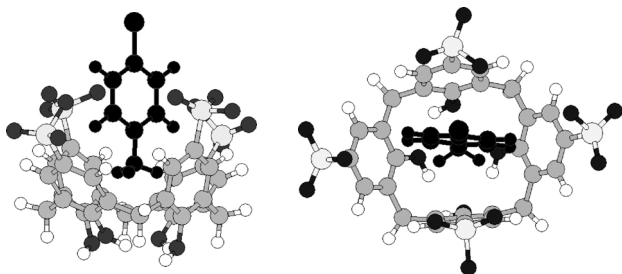
3.2.2. Reakce s hydroxylovými radikály

Rychlostní konstanty reakce hydroxylového radikálu s 4-chloranilinem (4-CA) a kalix[4]aremem (C) byly určeny metodou nanosekundové laserové fotolýzy. Roztoky, obsahující zkoumanou organickou látku, $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$, kyselinu chloristou ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) a různé koncentrace ethanolu, byly ozářeny laserovým pulsem o vlnové délce 355 nm. Absorpce vzniklého OH-adiktu byla snížena úměrně koncentraci přidaného ethanolu. Vyhodnocením experimentálních dat metodou nelineární regrese byly získány hodnoty rychlostních konstant reakce hydroxylového radikálu s 4-chloranilinem, $k_{4\text{-CA}} = 6,7 \cdot 10^9 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, a s kalix[4]aremem, $k_K = 7,3 \cdot 10^9 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2.3. Degradace fotoindukovaná chloristanem železitým

Kinetika fotoindukované degradace 4-chloranilinu, a to jak za nepřítomnosti kalix[4]arenu, tak i v přítomnosti jeho trojnásobného přebytku byla sledována ve fotoreaktoru druhého typu (popsaného v experimentální části). Roztoky obsahovaly $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ 4-chloranilinu, $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ (hydrolyza $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ byla potlačena přidáním kyseliny chloristé o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) a ve druhém případě navíc $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ kalix[4]arenu. Koncentrace 4-chloranilinu a jeho degradačních produktů byla sledována chromatograficky. Za účelem kvantifikace počáteční reakční rychlosti byly několika prvními experimentálními body proloženy teoretické kinetické křivky prvního řádu.

Vyčíslené hodnoty rychlostní konstanty k_{exp} jsou shrnuty v tabulce V, kde jsou zároveň porovnány s hodnotami hypotetické rychlostní konstanty k_{vyp} vypočtenými ze vztahů (3), (4) a (6) (s použitím hodnot $[\text{OH}] = 6,2 \cdot 10^{-15} \text{ mol.l}^{-1}$, $\Phi_{\text{OH}} I_{\text{abs}} = 2,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Podobně jako v případě inkluzního komplexu naftalenu s α -cyklodextrinem probíhala degradace



Obr. 12. Konformace supramolekulárního komplexu protonovaného 4-chloranilinu (vyznačen černě) s deprotonovaným tetrasulfonovaným derivátem kalix[4]arenu (atomy H jsou vyznačeny bíle, C světle šedě, O černě a S tmavě šedě) navržená na základě kvantové chemických výpočtů

4-chloranilinu za přítomnosti kalix[4]arenu rychleji, než by se dalo očekávat v soustavě, v níž by nedocházelo ke vzniku supramolekulárních komplexů ani k jiným interakcím mezi oběma složkami.

Při analýze ozařovaných vzorků 4-chloranilinu pomocí HPLC byla pozorována řada oligomerních i monomerních degradačních produktů⁶. Hlavní degradační cesta vedla k tri-

Tabulka IV

Energie optimalizovaných struktur inkluzního komplexu protonované formy 4-chloranilinu s deprotonovaným tetrasulfonovaným derivátem kalix[4]arenu vypočtené ve vakuu a ve vodném prostředí ($15 \times 15 \times 20$ molekul)

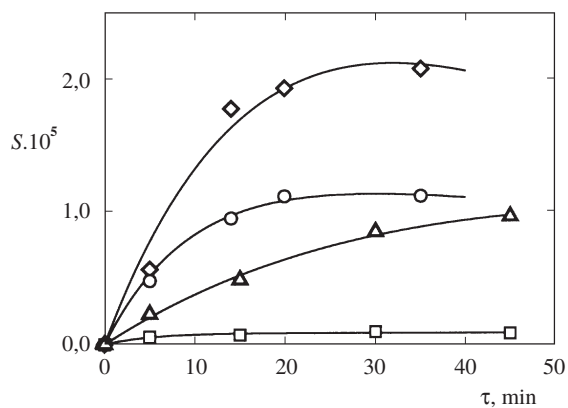
Prostředí	Konformace [kcal.mol^{-1}]		
	a ^a	b ^b	c ^c
Vakuum	38,48	36,69	33,39
Voda	44,75	42,94	39,57

^a Atom chloru 4-chloranilinu směřující do dutiny, ^b aminoskupina směřující do dutiny, ^c molekula 4-chloranilinu orientovaná napříč dutinou

Tabulka V

Rychlostní konstanty experimentální k_{exp} a vypočtené k_{vyp} fotoindukované degradace 4-chloranilinu ($5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) za nepřítomnosti a přítomnosti kalix[4]arenu

Kalix[4]aren [mol.l^{-1}]	4-Chloranilin v komplexu [%]	k_{exp} [s^{-1}]	k_{vyp} [s^{-1}]
0	0	$4,2 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^{-5}$
$1,5 \cdot 10^{-3}$	86	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$9,8 \cdot 10^{-6}$



Obr. 13. Závislost integrovaných ploch chromatografických pásů (S) monomerního a trimerního produktu na době ozařování (τ) v průběhu degradace 4-chloranilinu ($5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) fotoindukované $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ ($1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, 100% $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, pH 2,0) za nepřítomnosti, resp. přítomnosti kalix[4]arenu ($1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$); monomer, bez kalix[4]arenu (○), monomer, s kalix[4]aremem (Δ); oligomer, bez kalix[4]arenu (◇); oligomer, s kalix[4]aremem (□)

mernímu produktu, a to substituovanému benzochinondiiminu 4-chlor-3-[(4-chlorfenyl)imino]-6-[4-hydroxyfenyl)imino]-cyklohexa-1,4-dien-1-aminu, jehož prekurzorem byl dimerní meziprodukt, derivát difenylaminu. Zastoupení monomerních a oligomerních degradačních produktů 4-chloranilinu bylo experimentálně sledováno jak za nepřítomnosti, tak i přítomnosti kalix[4]arenu. Závislost koncentrace vybraného monomerního a trimerního derivátu na čase byla analyzována pomocí modelu následných reakcí prvního řádu⁵ (obr. 13). Za přítomnosti kalix[4]arenu byla rychlost tvorby obou produktů snížena.

Rychlostní konstanta degradace 4-chloranilinu (k_{exp}) klesla za přítomnosti trojnásobného přebytku kalix[4]arenu z $4,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ na $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, tj. přibližně 2,3× (tabulka V). Rychlostní konstanta tvorby monomerního produktu, vypočtená pomocí modelu následných reakcí prvního řádu, se snížila za přítomnosti kalix[4]arenu z $8,9 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ na $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, tj. přibližně třikrát, kdežto rychlostní konstanta tvorby trimerního derivátu klesla více než dvanáctkrát (z $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ na $8,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$). Pozorovaná inhibice tvorby trimeru může být dána do souvislosti s odstíněním hosta dutinou hostitele, což se projevuje sníženou reaktivitou hosta při bimolekulárních reakcích, vedoucích ke vzniku oligomerních produktů.

4. Závěr

V této práci byla studována reaktivita hostů ve dvou supramolekulárních komplexech, a to jednak naftalenu s α -cyklo-dextrinem, jednak protonované formy 4-chloranilinu s deprotonovaným tetrasulfonovaným derivátem kalix[4]arenu. Fotoindukovaná oxidativní degradace naftalenu i 4-chloranilinu probíhala za přítomnosti příslušného hostitele rychleji, než by se očekávalo u obdobné reakční soustavy, u níž by její složky netvořily inkluzní komplexy a byly degradovány nezávisle. Toto urychlení bylo vysvětleno možnou existencí následných radikálových reakcí, při nichž je rozklad hosta druhotně indukován krátce žijícími radikálovými meziproducty vzniklými transformacemi hostitele po jeho prvotním napadení hydroxylovým radikálem.

Při studiu komplexu naftalenu s α -cyklo-dextrinem metodou nanosekundové laserové fotolýzy se však projevil ochranný vliv dutiny hostitele na molekulu hosta, neboť intermolekulární reakce naftalenu v tripletovém stavu byly zpomaleny. V důsledku vzniku komplexu byla potlačena tvorba oligomerních produktů degradace hosta, jak bylo pozorováno při fotoindukované degradaci komplexu 4-chloranilinu s kalix[4]arenem.

Děkuji RNDr. Jaromíru Jirkovskému, CSc., za užitečné rady a laskavou pomoc, Dr. Michèle Bolteové a jejím kolegům z Laboratoře molekulární a makromolekulární fotochemie Univerzity Blaise Pascala v Clermont-Ferrandu ve Francii a Dr. Gottfriedu Grabnerovi a jeho kolegům z Institutu teoretické chemie a strukturní molekulární biologie Vídeňské univerzity v Rakousku za umožnění studijních pobytů na jejich ústavech. Doc. Dr. Pavlu Lhotákovi z Ústavu organické chemie VŠCHT Praha a Dr. Kamilu Langovi z Ústavu anorganické chemie AV ČR děkuji za poskytnutí vzorku derivátu kalix[4]arenu.

Společnosti Shimadzu děkuji za finanční ocenění této práce v soutěži Shimadzu 2001.

LITARATURA

1. Bahnmann D., v knize: *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2, Part L: Environmental Photochemistry (Boule P., ed.), str. 285. Springer, Berlin 1998.
2. Schneider H.-J.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 30, 1417 (1991).
3. Lehmann M. N., Bakker M. G., Patel H., Partin M. L., Dormady S. J.: *J. Inclusion Phenom. Mol. Recogn. Chem.* 23, 99 (1995).
4. Shigemasa I., Mamoru K.: *Chemosphere* 39, 1595 (1999).
5. Belháčová L.: *Dizertační práce*. VŠCHT, Praha 2001.
6. Mailhot G., Belháčová L., Lemr K., Jirkovský J., Grabner G., Bolte M.: *Environ. Sci. Technol.*, v tisku.
7. Shinkai S., Araki K., Tsubaki T., Arimura T., Manabe O.: *J. Org. Chem.* 52, 2297 (1987).
8. Arena G., Casnati A., Contino A., Lombardo G. G., Sciotto D., Ungaro R.: *Chem. Eur. J.* 5, 738 (1999).
9. Faust B. C., Hoigné J.: *J. Atmos. Environ.* 24A, 79 (1990).
10. Mazellier P., Jirkovský J., Bolte M.: *Pestic. Sci.* 49, 259 (1997).
11. Butler J., Jayson F. F., Swallow A. J.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 1974, 1394.
12. Bielski B. H. J., Cabelli D. E., Arudi R. L., Ross A. B.: *J. Phys. Chem. Ref. Data* 14, 1041 (1985).
13. Calvert J. G., Pitts J. M., v knize: *Photochemistry*. str. 783. Wiley, New York 1966.
14. Szejtli J., v knize: *Topics in Inclusion Science*, kap. 1. Kluwer, Dordrecht 1988.
15. Grabner G., Rechthaler K., Mayer B., Köhler G., Rotkiewitz K.: *J. Phys. Chem.* 104, 1365 (2000).
16. Macounová K., Krýsová H., Ludvík J., Jirkovský J.: *J. Photochem. Photobiol., A*, v tisku.
17. Zevov N., Sehested K.: *J. Phys. Chem.* 82, 138 (1978).
18. Macounová K., Belháčová L., Jirkovský J., Grabner G.: *Proceedings of XVIIth IUPAC Symposium on Photochemistry, Barcelona, July 20–25, 1998*, str. 355.

L. Hykrdová (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Degradation of Supramolecular Host–Guest Complexes Induced by Hydroxyl Radicals – Effect of the Host on the Guest Reactivity**

The article deals with photoinduced degradation of two supramolecular host–guest complexes of naphthalene with α -cyclodextrin and of 4-chloroaniline with tetrasulfonated calix[4]arene. The properties of both the complexes were studied by UV/VIS and NMR spectroscopy and also theoretically using quantum-chemical calculations. Degradation of both the guests induced by attack of hydroxyl radicals was accelerated due to the formation of the complexes. It can be assumed that transient products formed after the initial attack induce secondary decomposition of other guest molecules in consecutive radical reactions. The protective effect of α -cyclodextrin manifests itself by slowing down reactions of naphthalene in triplet state (oxygen quenching, triplet-triplet annihilation). In addition, in the case of the 4-chloroaniline – calix[4]arene complex, an influence of the host on the population of individual degradation products was observed: while the reactions leading to the formation of oligomeric products were inhibited, transformations of the host were accelerated.

ANALÝZA PEPTIDŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI-TOF

ONDREJ ŠEDO* a JOSEF HAVEL

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: sedo@post.cz

Došlo 7.6.02, přepracováno 17.12.02, přijato 10.1.03.

Klíčová slova: analýza peptidů, neuroprotektivní peptidy, MALDI-TOF MS, PSD

Úvod

Význam metody hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice (MALDI) v poslední době neobyčejně vzrůstá. Důvodem je schopnost této techniky ionizovat za účasti matrice i velké biomolekuly (>1 000 000 Da) a detegovat vzniklé ionty v analyzátoru měřením doby letu (TOF), což dává metodě nezastupitelnou roli zejména v analýze lidského proteomu, v současnosti nejrozsáhlejším výzkumném projektu v oblasti přírodních věd.

Kromě molekulové hmotnosti je metoda MALDI-TOF MS schopna poskytnout údaje i o struktuře peptidů. Zvýšením výkonu laseru je možné dosáhnout nadměrné excitace molekul analytu, které se v důsledku přebytku energie rozpadají na menší fragmenty (obr. 1), z jejichž molekulových hmotností lze odvodit část sekvence aminokyselin nebo celou strukturu peptidu. Sledován může být rozpad molekul peptidu přímo v iontovém zdroji metodou ISD/ISF (in-source decay/fragmentation – rozpad/fragmentace ve zdroji) nebo během letu v analyzátoru TOF metodou PSD (post-source decay – rozpad za iontovým zdrojem).

Při PSD jsou laserovými pulsy získány molekulové ionty všech peptidů z analyzované směsi, zvolený peptid je pak od ostatních separován pomocí tzv. iontové brány (ion gate, viz obr. 2). Během letu se část iontů rozpadá. Kinetická energie těchto iontů se distribuuje na vznikající fragmenty v závislosti na jejich hmotnosti. V reflektoru poté dochází k separaci iontů na základě různé kinetické energie. Metoda PSD byla úspěšně aplikována pro určování struktury peptidů izolovaných z živočišných tkání¹, při studiu exprese genů² nebo pro identifikaci proteinů určením malé části jejich struktury³. S její pomocí lze lokalizovat posttranslační modifikace jako například radikálovou nitraci⁴ nebo fosforylaci⁵. Metoda ISD se používá méně často kvůli nutnosti předchozí separace analyzovaného peptidu, navíc lze s její pomocí získat informaci jen o části struktury peptidů⁶.

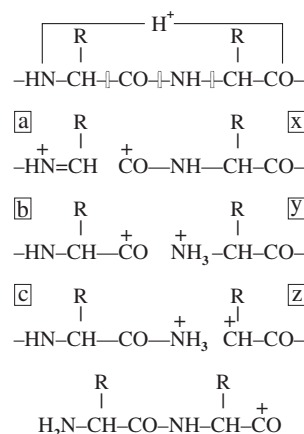
Přítomnost určitých druhů peptidů v mozku má spojitost s Alzheimerovou chorobou. Vedle tzv. β -amyloidů a prese-

nilinů, které poškozují mozkové synapse, byl v nedávné době objeven peptid nazvaný humanin^{7,8}, který naopak neurony chrání před neurotoxickými účinky patologických peptidů. Jde o peptid s molekulovou hmotností 2686,3 a strukturou Met-Ala-Pro-Arg-Gly-Phe-Ser-Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Thr-Ser-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala. Mechanismus jeho neuroprotektivního působení nebyl doposud objasněn, jeho biologická účinnost může být výrazně ovlivněna substitucí některé z aminokyselin.

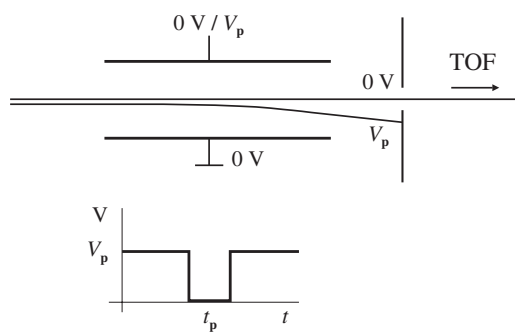
Experimentální část

Chemikálie a přístroje

Pro přípravu všech roztoků byla použita voda redestilovaná v křemenné aparatuře od fy. Heraeus (Německo), acetonitril a kyselina trifluoroctová byly dodány firmou Merck



Obr. 1. Struktura a názvosloví fragmentů vznikajících rozpadem peptidů, struktura vnitřního fragmentu



Obr. 2. Schéma principu funkce iontové brány; ionty jsou během průletu mezi destičkami iontové brány vychylovány napětím V_p . V okamžiku, kdy iontovou bránou procházejí ionty zvoleného peptidu (čas t_p), je napětí V_p vypnuto, a pouze tyto ionty pokračují dále do reflektoru

* Ondrej Šedo získal 1. místo za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie v celostátní soutěži o cenu firmy Merck v Praze 6.–7. února 2002.

(Německo). Jako matrice pro MALDI byla použita kyselina α -kyan-4-hydroxysočicová (CHC – 3-(4-hydroxyfenyl)-2-kyanpropenová kyselina) od firmy Sigma-Aldrich (Německo).

Analýzy byly provedeny na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF Axima-CFR (Kratos Analytical Shimadzu Corporation, Anglie).

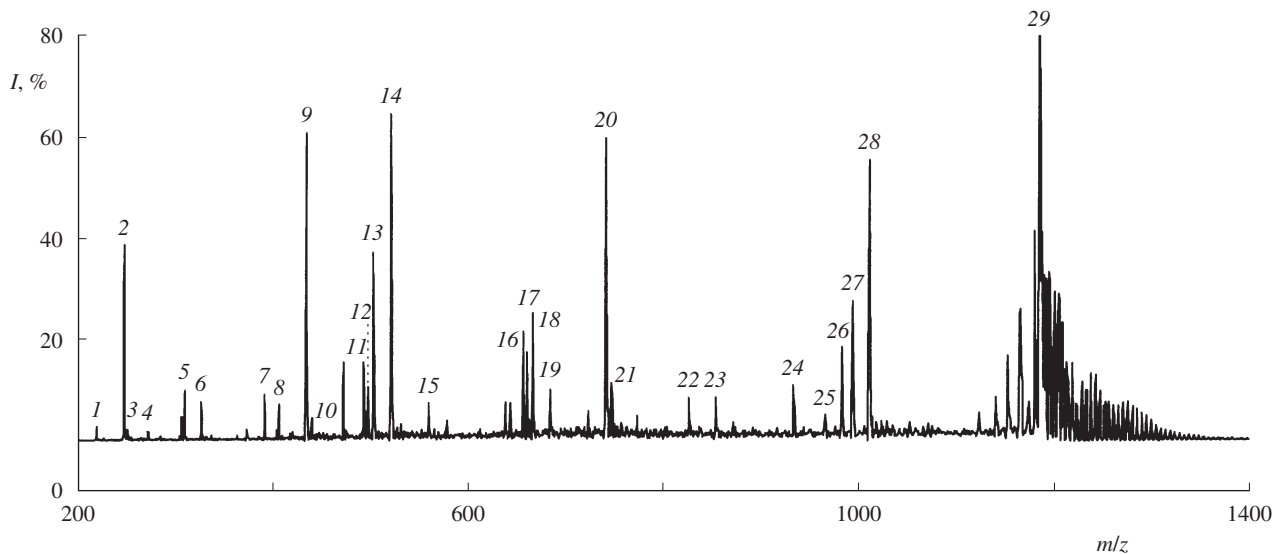
Příprava vzorků

Pro analýzu byl používán nasycený roztok matrice CHC

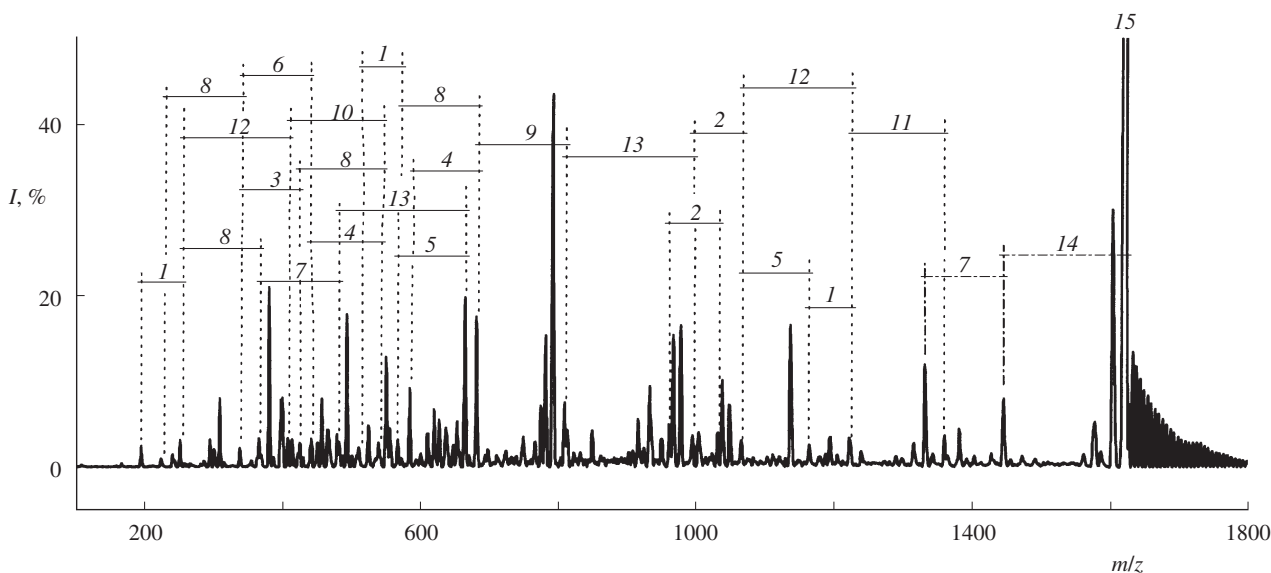
ve směsi 0,1% trifluoroctové kyseliny a acetonitrilu 1:1. Bylo postupováno tak, že 1 μ l roztoku matrice byl s 1 μ l vzorku smíchán přímo na destičce spektrometru a směs byla poté sušena proudem vzduchu při laboratorní teplotě.

Výsledky a diskuse

Metodou PSD bylo analyzováno několik peptidů s molekulovými hmotnostmi 1000–2500, přičemž u všech byl pozorován vznik iontů typu a, b a y, fragmentů vytvořených



Obr. 3. PSD spektrum lidského luteinizačního a vylučovacího hormonu (struktura pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂); koncentrace peptidu 10 μ mol.l⁻¹, matrice CHC, naměřeno v reflektorném pozitivním módu se zpožděnou extrakcí a iontovou bránou nastavenou na 1170–1190 Da, výkon laseru 1,67 mW; 1 – a₁, 2 – b₁, 3 – SY, 4 – WS, 5 – y₃-NH₃, 6 – y₃, 7 – SYGL-28, 8 – a₂, 9 – b₂, 10 – y₄, 11 – a₃, 12 – b₃-H₂O, 13 – y₅, 14 – b₃, 15 – SYGLR-NH₃, 16 – a₄, 17 – y₆, 18 – b₄-H₂O, 19 – b₄, 20 – b₅, 21 – y₇, 22 – a₆, 23 – b₆, 24 – y₈, 25 – a₇-NH₃, 26 – a₇, 27 – b₇-NH₃, 28 – b₇, 29 – [M+H]⁺



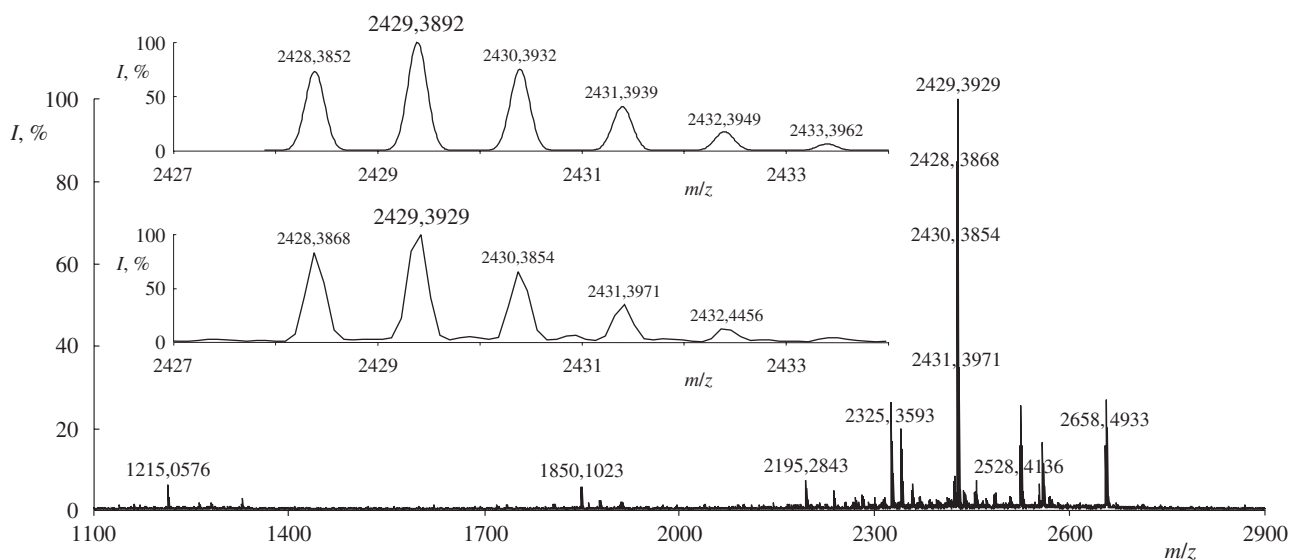
Obr. 4. Nalezení části sekvence aminokyselin v neznámém peptidu; koncentrace peptidu 10 μ mol.l⁻¹, matrice CHC, naměřeno v reflektorném pozitivním módu se zpožděnou extrakcí a iontovou bránou nastavenou na 1610–1635 Da, výkon laseru 2,33 mW; 1 – Gly, 2 – Ala, 3 – Ser, 4 – Pro, 5 – Val, 6 – Cys, 7 – Leu/Ile, 8 – Asn, 9 – Lys/Gln, 10 – Met, 11 – His, 12 – Arg, 13 – Trp, 14 – CO-Met-NH₃, 15 – [M+H]⁺

odštěpením vody nebo amoniaku od těchto iontů a vnitřních fragmentů (příklad jednoho z naměřených PSD spekter je uveden na obr. 3).

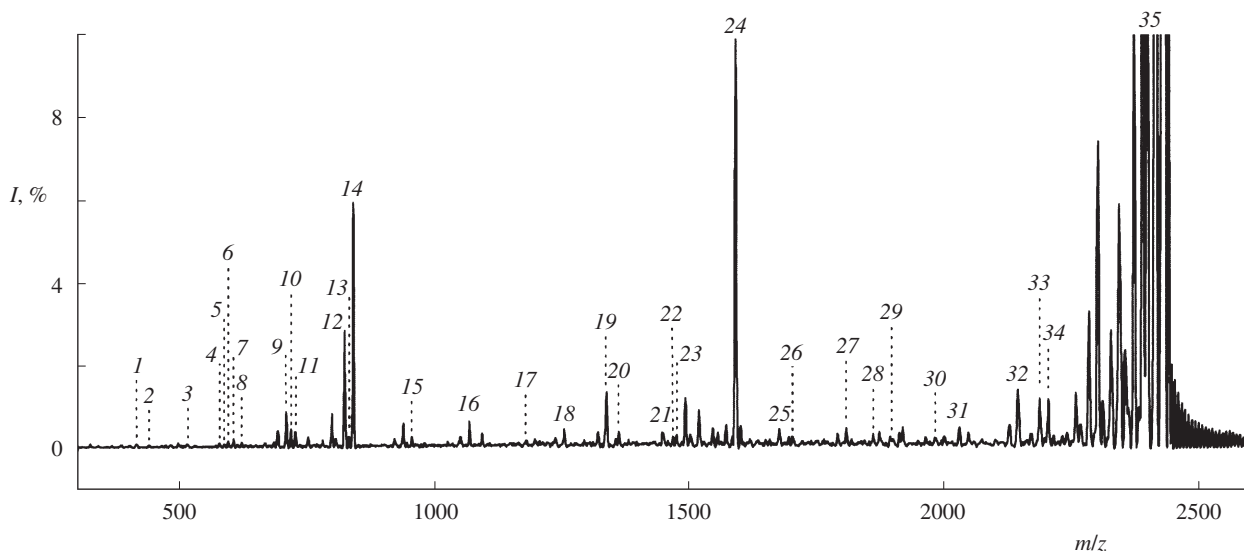
Určení struktury „neznámého“ peptidu

V tomto případě byl analyzován peptid o „neznámé“ struktuře, jejíž určení popíšeme jako ukázkou. Monoizotopická relativní hmotnost tohoto peptidu byla zjištěna analýzou ve směsi se čtyřmi jinými peptidy se známými hmotnostmi, které sloužily jako vnitřní kalibrační standardy. Výsledná hodnota molekulové hmotnosti „neznámého“ peptidu byla určena

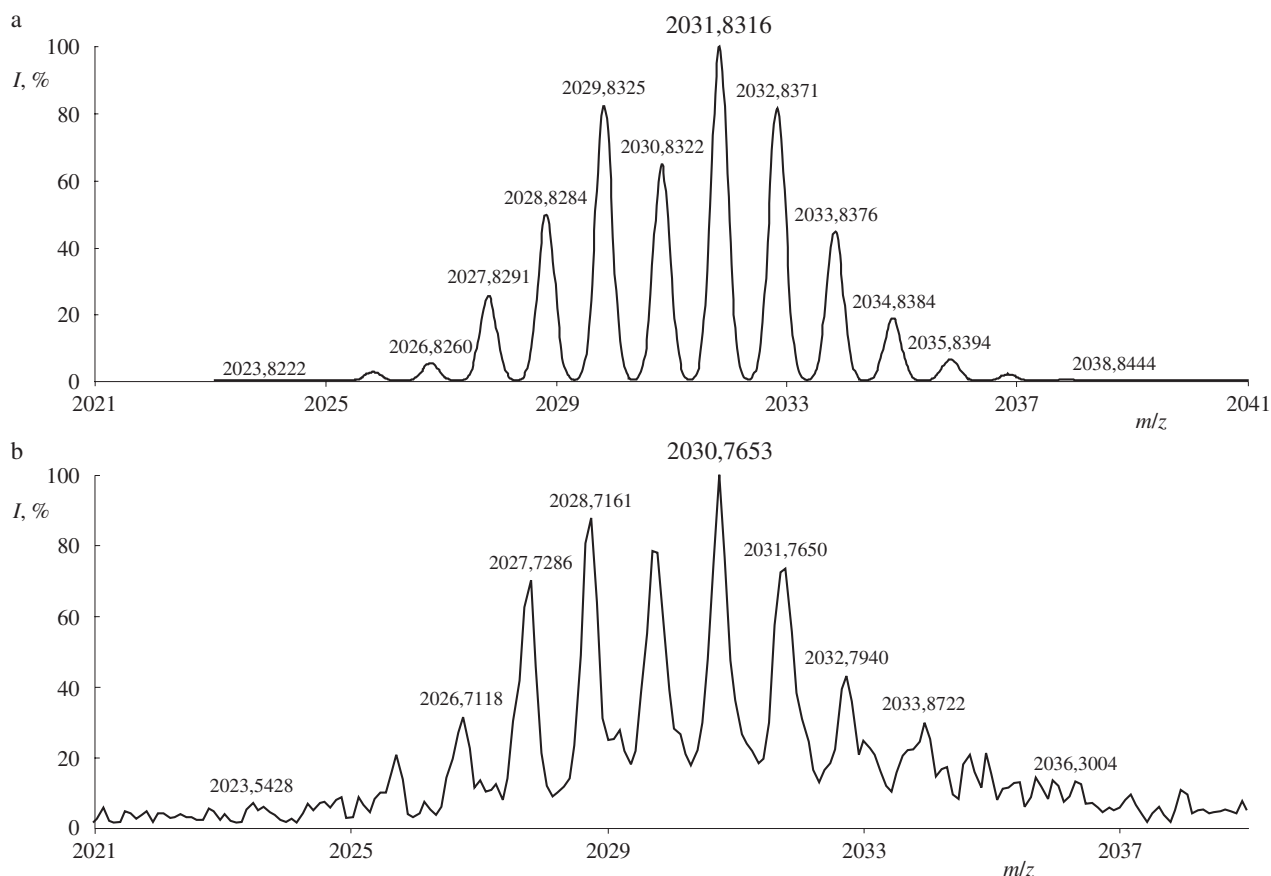
s přesností 23 ppm ($1618,851 \pm 0,037$). S použitím vyšší energie laseru pak byla provedena analýza pomocí PSD. Při vyhodnocování spekter bylo využito skutečnosti, že se molekulové hmotnosti iontů typu a a b liší o 28 Da. Z takto identifikovaných možných iontů typu b se podařilo určit část sekvence aminokyselin (obr. 4). Všechny zjištěné údaje byly poté zapsány do programu ProteinProspector MS-Seq (cit.⁹), ve kterém byl v databázi OWL (aktualizace 7.2.2001) nalezen pouze jeden peptid odpovídající zadaným parametrům. Šlo o peptid bombesin, který má monoizotopickou molekulovou hmotnost 1618,815 a strukturu pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂.



Obr. 5. Hmotnostní spektrum směsi vzniklé při syntéze derivátů neuroprotektivního peptidu; vodný roztok o koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹, matrice CHC, měřeno v reflektornovém pozitivním módu se zpožděnou extrakcí, výkon laseru 1,57 mW; srovnání teoretického modelu molekuly C₁₀₈H₁₈₆N₃₂O₂₉S + H⁺ (ve výřezu nahoře) s detailním pohledem na pík hlavního produktu (ve výřezu dole)



Obr. 6. PSD spektrum derivátu neuroprotektivního peptidu; matrice CHC, naměřeno v reflektornovém pozitivním módu se zpožděnou extrakcí a iontovou bránou nastavenou na 2420–2450 Da, výkon laseru 3 mW; 1 – y₃, 2 – b₄-NH₃⁺, 3 – y₄⁺, 4 – a₆-NH₃⁺, 5 – a₆, 6 – b₆-NH₃⁺, 7 – b₆, 8 – y₅, 9 – y₆-NH₃⁺, 10 – b₇-NH₃⁺, 11 – y₆, 12 – y₇-NH₃⁺, 13 – b₈-NH₃⁺, 14 – y₇, 15 – y₈, 16 – y₉, 17 – y₁₀, 18 – y₁₁, 19 – y₁₂-NH₃⁺, 20 – b₁₃, 21 – a₁₄, 22 – y₁₃, 23 – b₁₄, 24 – b₁₅, 25 – y₁₅-H₂O, 26 – b₁₆, 27 – y₁₆, 28 – a₁₈, 29 – b₁₈, 30 – a₁₉, 31 – b₁₉, 32 – y₁₉, 33 – b₂₀, 34 – y₂₀, 35 – [M+H]⁺



Obr. 7. Srovnání modelového spektra (a) derivatizovaného peptidu bombesinu o struktuře $C_{71}H_{110}N_{24}O_{18}S$ (bombesin). $OsO_4 \cdot C_{10}H_8N_2$ (OsO_4 -bipy). H^+ , vypočítaného na základě přirozeného isotopového zastoupení prvků, s naměřeným spektrem (b); měřeno v reflektornovém pozitivním módu se zpožděnou extrakcí, výkon laseru 1,67 mW

Analýza směsi peptidů

Pomocí metody MALDI-TOF byla analyzována směs vzniklá při pokusu o syntézu derivátu neuroprotektivního peptidu humaninu. Cílem analýzy bylo potvrzení struktury hlavního produktu a pokus o určení složení fragmentů peptidu obsažených v preparátu. Na základě struktury předpokládaného produktu syntézy (Ala-Arg-Gly-Phe-Gly-Cys-Leu-Leu-Leu-Thr-Gly-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala) byla vypočítána jeho teoretická molekulová hmotnost a isotopový vzor jeho molekulových píků, které byly srovnány s naměřeným spektrem (obr. 5). Metodou PSD byla potvrzena struktura hlavního produktu (obr. 6) a nalezena struktura dalších dvou peptidů. Z deseti měření intenzit píků všech ionizovaných produktů bylo odhadnuto zastoupení hlavního produktu na $30,9 \pm 3,1$ %.

Derivatizace peptidů a jejich analýza

Jedním z mnoha činidel, která by mohla sloužit k určování struktury proteinů, je komplex oxid osmičelý-bipyridin (OsO_4 -bipy), který podle literatury^{10,11} reaguje v peptidových řetězcích především s tryptofanem a ze sterických důvodů není schopen pronikat do vnitřních částí struktur proteinů. Na obr. 7 je uvedeno srovnání spektra peptidu bombesinu derivatizova-

ného OsO_4 -bipy s modelem vytvořeným na základě předpokládaného mechanismu reakce.

Závěr

Byla vytvořena a prověřena metodologie určování molekulových hmotností a struktury peptidů metodou MALDI-TOF MS. Získané zkušenosti byly úspěšně aplikovány při určování sekvence aminokyselin v peptidech a při kontrole čistoty a potvrzení struktury nového derivátu neuroprotektivního peptidu humaninu. Demonstrována byla principiální možnost ionizace peptidů derivatizovaných OsO_4 -bipy.

Některé peptidy byly laskavě poskytnuty prof. RNDr. Emilem Palečkem, DrSc., z Biofyzikálního ústavu AV ČR, Brno. Tato práce je součástí projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, projekt č. CEZ: J 07/98: 143100011.

LITERATURA

1. Marvin L. F., Zatylny C., Leprince J., Vandry H., Henry J.: Peptides 9, 1391 (2001).

2. Ovsyannikova G., Johnson K. L., Naylor S., Poland G. A.: *J. Immunol. Methods* 246, 1 (2000).
3. Flad T., Kalbacher H., Kaufmann R., Spangler B., Meyer H.: *Immunol. Lett.* 56, 336 (1997).
4. Sarver A., Scheffler N. K., Shetler M. D., Gibson B. W.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 439 (2001).
5. Talbo G. H., Suckau D., Malkoski M., Reynolds E. C.: *Peptides* 22, 1093 (2001).
6. Reiber D., Grover T. A., Brown R. S.: *Anal. Chem.* 70, 673 (1998).
7. Hashimoto Y., Niikura T., Tajima H., Yasukawa T., Sudo H., Ito Y., Kita Y., Kawasumi M., Kouyama K., Doyu M., Sobue G., Koide T., Tsuji S., Lang J., Kurokawa K., Nishimoto I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6336 (2001).
8. Patočka J., Slaninová J.: *Cesk. Slov. Psychiat.* 98, 221 (2002).
9. <http://prospector.ucsf.edu/ucshtml4.0u/msseq.htm>; 23.11.2001.
10. Deetz J. S., Behrman E. J.: *J. Org. Chem.* 45, 135 (1980).
11. Emerman M., Behrman E. J.: *J. Histochem. Cytochem.* 30, 395 (1981).

O. Šedo and J. Havel (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Analysis of Peptides by MALDI-TOF Mass Spectrometry**

The MALDI-TOF MS method can be used for the exact determination of molecular weight of peptides. Detailed study of fragmentation of metastable ions after leaving the ion source (post-source decay, PSD) makes it possible to determine also the sequence of amino acids in peptides. If complete primary structure cannot be reliably determined due to the complexity of PSD spectra, the missing part of the sequence can be found in Internet bases. Because of a simple preparation of samples and short analysis times, MALDI-TOF MS is an extraordinarily suitable method for checking purity of peptide preparations. It can be also used for study of peptide derivatization.

**STANOVENÍ STOPOVÝCH MNOŽSTVÍ
2-METHYL-4,6-DINITROFENOLU
POMOCÍ MODERNÍCH POLAROGRAFICKÝCH
A VOLTAMETRICKÝCH METOD
NA RTUŤOVÝCH ELEKTRODÁCH**

JAN FISCHER*, JIŘÍ BAREK a JIŘÍ ZIMA

*UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 6, 128 43 Praha 2
e-mail: jfischer@natur.cuni.cz*

Došlo 31.10.02, přepracováno 10.11.02, přijato 28.11.02.

Klíčová slova: 2-methyl-4,6-dinitrofenol, polarografie, voltametrie, rtuťová kapková elektroda

Úvod

2-Methyl-4,6-dinitrofenol (MDNF) je průmyslově vyráběn jako insekticid, fungicid, herbicid a defoliant. Je prodáván pod různými obchodními názvy jako Antinonin, Detal, Dinitrol a u nás Nitrosan 25 (cit.¹). Jeho použití jako kontaktního insekticidu je omezeno pouze na období vegetačního klidu, obzvláště u ovocných stromů, jako je jablono či broskvoň. Je silně fytotoxický pro dvouděložné plevely, proto byl využit jako kontaktní herbicid k jejich regulaci v obilovinách a k odlišování brambor a luskovin před sklizní².

Toxicita této látky pro člověka je dobře prostudována³. Nejpravděpodobnější je inhalační a dermální kontaminace látkou při aplikaci postřiků⁴. Opakovaný akutní kontakt s látkou může vyvolat precitlivělost, astma či chronickou bronchitidu. Jsou také potvrzeny jeho genotoxické účinky⁵, ale podíl na vzniku rakoviny nebyl dosud studován.

Vysoká akutní toxicita vedla v roce 1991 EPA (Environmental Protection Agency) k zahájení jednání o zrušení registrace tohoto pesticidu v USA (cit.⁶). Dnes není 2-methyl-4,6-dinitrofenol zařazen mezi povolené pesticidy ani v České republice⁷. 2-Methyl-4,6-dinitrofenol se objevuje jako meziprodukt při syntézách fungicidů a bioaktivních sloučenin, barviv a léčiv a také jako inhibitor radikálových polymerací vinylaromatických sloučenin^{8,9}.

Polarografické a voltametrické vlastnosti nitroskupiny na aromatickém kruhu byly již studovány mnoha autory za různých podmínek na řadě sloučenin. I této sloučenině a jí podobným látkám byla v tomto směru věnována pozornost v několika člancích^{10–16}. Cílem práce bylo ověřit použitelnost moderních polarografických a voltametrických metod pro sledování submikromolárních koncentrací této látky a určit meze stanovitelnosti při použití jednotlivých technik.

Experimentální část

Reagencie

Zásobní roztok 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,0099 g látky v 50 ml tohoto rozpouštědla. Zásobní roztok 2-methyl-4,6-dinitrofenolu ve vodě o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,0099 g látky v 500 ml deionizované vody. Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku příslušným rozpouštědlem. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě za laboratorní teploty. Dále byla použita kyselina boritá, kyselina octová, kyselina fosforečná, hydroxid sodný, chlorid draselný a methanol (vše čistoty p.a., Lachema, Brno, Česká republika). Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny obvyklým způsobem¹⁷. pH těchto roztoků i pH jejich směsí s methanolem bylo kontrolováno digitálním pH-metrem Jenway (Jenway Ltd., Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou, kalibrovaným na standardní vodné roztoky pufrů. Pro přípravu vodných roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Milli-Q plus systém, Millipore, USA). Používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách.

Aparatura

Byl používán Eco-Tribo polarograf s řídicím programem PolarPro verze 4 (Polaro-Sensors, Praha, Česká republika) pracujícím v operačním systému Windows 98 (Microsoft, USA). Bylo pracováno v tříelektrodovém zapojení s referenční argentchloridovou elektrodou ($1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$) a platinovou pomocnou elektrodou. Při DC tast polarografii (DCTP) a diferenční pulzní polarografii (DPP) byla používána klasická rtuťová kapková elektroda (DME), rychlost polarizace 4 mV.s^{-1} , elektronicky řízená doba kapky 1 s a výška rtuťového rezervoáru 49 cm. Při této výšce rezervoáru měla použitá DME dobu kapky $\tau = 5,1 \text{ s}$ (měřeno v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$ při vloženém nulovém napětí) a průtokovou rychlost $m = 1,15 \text{ mg.s}^{-1}$. Při diferenční pulzní voltametii (DPV) a adsorpční rozpouštěcí voltametii (AdSV) byla používána visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) typu UM μ E (Polaro-Sensors, Praha, Česká republika). Velikost kapky byla dána otevřením ventilku po dobu 200 ms. Pokud není uvedeno jinak, byly při pulzních technikách na elektrody vkládány pulzy o šířce 100 ms a modulační amplitudě -50 mV . Při technice DPV byla vždy použita rychlost nárůstu potenciálu 20 mV.s^{-1} .

Pracovní postupy

Při polarografických a voltametrických měřeních bylo postupováno následujícím způsobem: Do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno příslušné množství roztoku 2-methyl-4,6-dinitrofenolu (0,1–1,0 ml) v methanolu o potřebné koncentraci, byl přidán methanol do 1 ml a roztok byl doplněn Brittonovým-Robinsonovým pufrům o příslušném pH po značku.

* Jan Fischer se s touto prací úspěšně zúčastnil celostátní soutěže o nejlepší studentskou práci v oboru analytické chemie o cenu firmy Merck v Praze 6.–7. února 2002.

Při přípravě vodných roztoků neobsahujících methanol pro měření metodou AdSV bylo postupováno následujícím způsobem: Do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno příslušné množství roztoku 2-methyl-4,6-dinitrofenolu (0,1–1,0 ml) v deionizované vodě o potřebné koncentraci, byla přidána voda do celkového objemu 1 ml a roztok byl doplněn Brittonovým-Robinsonovým pufrům o příslušném pH po značku.

Takto připravený roztok byl po promíchání převeden do polarografické nádoby a zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs vody a methanolu ve stejném poměru jako analyzovaný roztok. Poté byl proveden záznam polarografické či voltametrické křivky. Před každým dalším záznamem byl roztok 30 s probubláván.

Při AdSV byla akumulace prováděna v míchaném roztoku, po skončení akumulace bylo míchání vypnuto a po 10 s byl v ustáleném roztoku proveden záznam. Všechny křivky byly měřeny pětkrát.

Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

Mez stanovitelnosti (L_Q) byla počítána pomocí programu ADSTAT (TriloByte Statistical Software, Pardubice, Česká republika), který ji počítá jako nejmenší hodnotu signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního grafu dostatečně malá, rovná hodnotě 0,1 (cit.¹⁸).

Výsledky a diskuse

Jak je patrné z tabulky I a obr. 1, poskytuje 2-methyl-4,6-dinitrofenol při DCTP na DME v celé studované oblasti pH dvě vlny. Při pH 2 lze na změřených polarogramech rozlišit

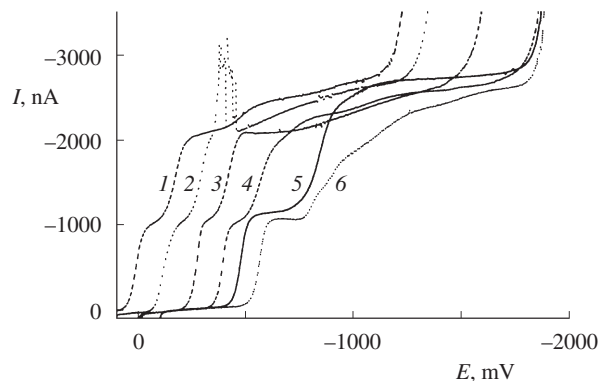
Tabulka I

Vliv pH na DCT polarogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), měřeno v prostředí BR pufr–methanol (9:1); $\text{pH}^{(a)}$ – pH použitého BR pufru, $\text{pH}^{(t)}$ – výsledné pH směsi BR pufr–methanol, $E_{1/2}^1$ – půlvlnový potenciál první vlny, I_{lim}^1 – limitní difuzní proud první vlny, $E_{1/2}^2$ – půlvlnový potenciál druhé vlny, I_{lim}^2 – limitní difuzní proud druhé vlny, $E_{1/2}^3$ – půlvlnový potenciál třetí vlny, I_{lim}^3 – limitní difuzní proud třetí vlny

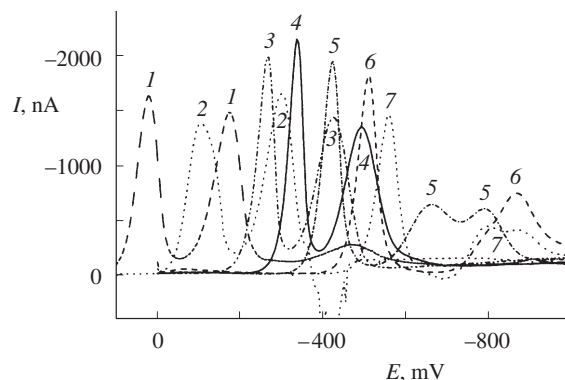
$\text{pH}^{(a)}$	$\text{pH}^{(t)}$	$-E_{1/2}^1$ [mV]	$-I_{\text{lim}}^1$ [nA]	$-E_{1/2}^2$ [mV]	$-I_{\text{lim}}^2$ [nA]
2,0	2,1	12	868	171	825 ^a
3,0	3,2	61	780	237	688
4,0	4,2	116	854	298	705
5,0	5,1	190	934	355	789
6,0	6,2	269	955	425	834
7,0	7,2	343	918	499	882
8,0	8,3	387	903	584	971
9,0	9,3	432	987	740	1330
10,0	10,1	475	1063	848	1452
11,0	11,1	519	1064	894	1326
12,0	12,0	562	1018	930	1297

^a Při tomto pH byla patrna ještě 3. vlna ($E_{1/2}^3 = -490 \text{ mV}$, $I_{\text{lim}}^3 = -187 \text{ nA}$)

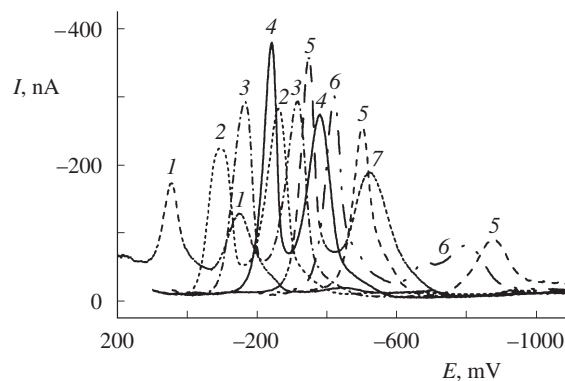
ještě třetí, výrazně nižší vlnu. V silně alkalickém prostředí (výsledné pH vodně-methanolicke směsi $\text{pH}^{(t)} = 12,0$) je druhá vlna silně ireverzibilní a v podstatě se rozpadá na několik po sobě následujících vln. Poměr první a druhé vlny je v oblasti



Obr. 1. Polarogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$); měřeno technikou DCTP v prostředí BR pufr–methanol (9:1) o výsledném $\text{pH}^{(t)}$ 2,1 (1); 4,2 (2); 6,2 (3); 8,3 (4); 10,1 (5); 12,0 (6)



Obr. 2. Polarogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$); měřeno technikou DPP na DME v prostředí BR pufr–methanol (9:1) o výsledném $\text{pH}^{(t)}$ 2,1 (1); 4,2 (2); 6,2 (3); 7,2 (4); 9,3 (5); 11,1 (6); 12,0 (7)



Obr. 3. Voltamogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$); měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr–methanol (9:1) o výsledném $\text{pH}^{(t)}$ 2,1 (1); 4,2 (2); 5,1 (3); 6,2 (4); 8,3 (5); 10,1 (6); 12,1 (7)

Tabulka II

Vliv pH na DP polarogramy a DP voltamogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v prostředí Brittonův-Robinsonův pufr–methanol (9:1); pH^(a) – pH použitého BR pufru, pH^(f) – výsledné pH směsi BR pufr–methanol, E_p^1 – potenciál prvního píku, I_p^1 – proud prvního píku, E_p^2 – potenciál druhého píku, I_p^2 – proud druhého píku, E_p^3 – potenciál třetího píku, I_p^3 – proud třetího píku

pH ^(a)	pH ^(f)	DPP ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$)						DPV ($c = 1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$)					
		E_p^1 [mV]	I_p^1 [μA]	E_p^2 [mV]	I_p^2 [nA]	E_p^3 [mV]	I_p^3 [nA]	E_p^1 [mV]	I_p^1 [nA]	E_p^2 [mV]	I_p^2 [nA]	E_p^3 [mV]	I_p^3 [nA]
2,0	2,1	-22	-1,630	-170	-1483	- ^a	- ^a	45	-120	-151	-101	- ^a	- ^a
3,0	3,2	-47	-1,445	-247	-988	- ^a	- ^a	-38	-218	-215	-205	- ^a	- ^a
4,0	4,2	-104	-1,391	-301	-1655	- ^a	- ^a	-99	-209	-267	-257	- ^a	- ^a
5,0	5,1	-192	-1,601	-360	-1548	- ^a	- ^a	-167	-294	-327	-283	- ^a	- ^a
6,0	6,2	-268	-1,988	-424	-1440	- ^a	- ^a	-243	-372	-382	-267	- ^a	- ^a
7,0	7,2	-336	-2,156	-492	-1355	- ^a	- ^a	-306	-359	-447	-233	- ^a	- ^a
8,0	8,3	-384	-1,914	-560	-960	- ^a	- ^a	-351	-345	-525	-178	- ^a	- ^a
9,0	9,3	-424	-1,937	-661	-642	-789	-592,5	-382	-322	-618	-119	- ^a	- ^a
10,0	10,1	-467	-1,854	- ^a	- ^a	-831	-1045,6	-423	-289	-685	-43	-802	-68
11,0	11,1	-513	-1,796	- ^a	- ^a	-867	-761,0	-462	-281	- ^a	- ^a	-858	-96
12,0	12,0	-560	-1,455	-797	-451	-873	-417,7	-501	-248	- ^a	- ^a	-877	-79

^a Pík není patrný

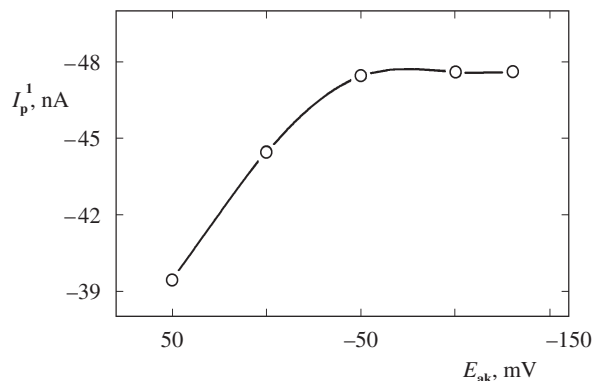
pH 2–8 prakticky 1:1, zatímco třetí vlna odpovídá asi 20 % první či druhé vlny.

V oblasti pH 3–5 se na křivce objevuje vířivé maximum, které lze potlačit přidáním želatiny. Půlvalnový potenciál obou vln se s rostoucím pH posouvá k zápornějším hodnotám.

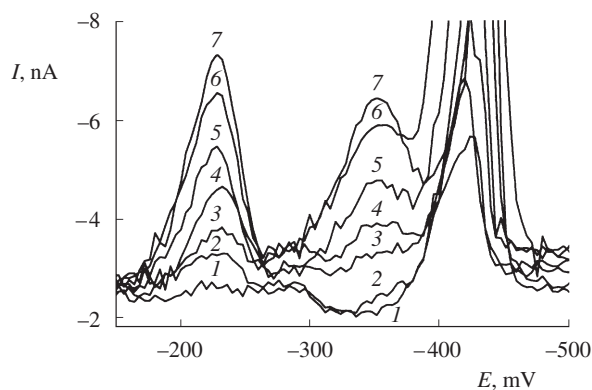
Lze předpokládat, že první dvě vlny odpovídají čtyřelektronové redukci skupiny –NO₂ na skupinu –NHOH a případně další vlny následné dvoelektronové redukci skupiny –NHOH až na skupinu –NH₂.

Z obr. 2 a 3 i z tabulek I a II je patrné, že chování 2-methyl-4,6-dinitrofenolu při DPP na DME či DPV na HMDE v podstatě odráží jeho chování při tast polarografii. Z obr. 1 až 3 je patrné, že nejlépe vyvinuté a nejsnáze vyhodnotitelné vlny při DCTP na DME byly získány při pH^(f) 10,1. Naproti tomu optimální píky při DPP na DME byly získány v prostředí o pH^(f) 7,2 a při DPV na HMDE v prostředí o pH^(f) 6,2. U všech metod byla lépe vyhodnotitelná první vlna (popř. píky). Kalibrační závislosti pro všechny tyto techniky byly proměřeny u obou vln (píků) ve směsi Brittonův-Robinsonův pufr–methanol (9:1). Parametry proměřených koncentračních závislostí jsou uvedeny v tabulce III, z níž je patrná značná citlivost zejména pulzních metod.

Dále byla věnována pozornost možnosti dalšího zvýšení citlivosti pomocí adsorpční akumulace 2-methyl-4,6-dinitrofenolu na povrchu HMDE. Jelikož přítomnost methanolu negativně ovlivňuje adsorpci látky, byl jako základní elektrolyt použit roztok Brittonova-Robinsonova pufru pH 6,0 s přidáním zásobního roztoku stanovované látky v deionizované vodě. Vliv potenciálu akumulace na výšku píku byl proměřen v rozmezí +50 až –150 mV při koncentraci 2-methyl-4,6-dinitrofenolu $2.10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. Roztok byl při akumulaci míchan a doba akumulace byla 60 s. Jako optimální potenciál akumulace byla zvolena hodnota –50 mV, při níž byly získány nejvyšší, snadno vyhodnotitelné a dobře reprodukovatelné píky (viz obr. 4). Na základě proměření vlivu doby akumulace



Obr. 4. Závislost proudu píku I_p^1 2-methyl-4,6-dinitrofenolu ($c = 2.10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$) na potenciálu akumulace E_{ak} ; měřeno technikou AdSV na HMDE v míchaném roztoku BR pufru pH 6,0 při době akumulace $t_{ak} = 60 \text{ s}$



Obr. 5. Voltamogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu; měřeno technikou AdSV na HMDE v BR pufru pH 6,0, potenciál akumulace –50 mV, doba akumulace 60 s, $c(\text{MDNF}) = 0$ (1), 1.10^{-9} (2), 2.10^{-9} (3), 4.10^{-9} (4), 6.10^{-9} (5), 8.10^{-9} (6), 1.10^{-8} (7) mol.l^{-1}

Tabulka III

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-methyl-4,6-dinitrofenolu moderními polarografickými a voltametrickými metodami

Technika	Prostředí	c [mol.l ⁻¹]	1. vlna nebo 1. pík				2. vlna nebo 2. pík			
			směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	úsek [nA]	korelační koef.	L _Q ^a [mol.l ⁻¹]	směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	úsek [nA]	korelační koef.	L _Q ^a [mol.l ⁻¹]
DCTP/DME	BR pufr pH 10 – methanol (9:1, pH ^(f) 10,1)	(2–10).10 ⁻⁵	-1,12.10 ⁷	-5,1	0,9964	–	-8,09.10 ⁶	-7,4	0,9976	–
		(1–10).10 ⁻⁶	-1,09.10 ⁷	0,4	0,9996	1.10 ⁻⁶	-1,22.10 ⁷	0,2	0,9994	2.10 ⁻⁶
DPP/DME	BR pufr pH 7 – methanol (9:1, pH ^(f) 7,2)	(2–10).10 ⁻⁵	-2,02.10 ⁷	-178	0,9953	–	-1,21.10 ⁷	-42,2	0,9994	–
		(2–10).10 ⁻⁶	-2,52.10 ⁷	1,14	0,9982	–	-1,42.10 ⁷	5,97	0,9995	–
		(1–10).10 ⁻⁷	-2,51.10 ⁷	0,33	0,9994	1.10 ⁻⁷	-1,47.10 ⁷	0,03	0,9998	4.10 ⁻⁷
DPV/HMDE	BR pufr pH 6 – methanol (9:1, pH ^(f) 6,2)	(2–10).10 ⁻⁶	-3,65.10 ⁷	-43,18	0,9912	–	-2,66.10 ⁷	-29,49	0,9977	–
		(2–10).10 ⁻⁷	-4,49.10 ⁷	0,27	0,9969	–	-3,64.10 ⁷	-1,13	0,9995	–
		(1–10).10 ⁻⁸	-4,19.10 ⁷	0,03	0,9994	1.10 ⁻⁸	-3,40.10 ⁷	-1,34	0,9988	3.10 ⁻⁸
AdSV/HMDE ^b	BR pufr pH 6	(2–10).10 ⁻⁸	-4,52.10 ⁸	-0,016	0,9999	–	-3,76.10 ⁸	0,859	0,9996	–
		(1–10).10 ⁻⁹	-4,24.10 ⁸	0,013	0,9998	1.10 ⁻⁹	-3,91.10 ⁸	0,376	0,9993	4.10 ⁻⁹

^a L_Q – mez stanovitelnosti, ^b E_{ak} = -150 mV, t_{ak} = 60 s

na výšku píku byla pro koncentrační rozmezí (1–100).10⁻⁹ mol.l⁻¹ zvolena jako optimální doba akumulace 60 s. Při této době akumulace byly píky dobře vyvinuté a dostatečně vysoké a další prodloužení doby akumulace již nebylo účelné. Parametry kalibračních přímek proměřených za těchto podmínek jsou uvedeny v tabulce III, odpovídající voltamogramy jsou znázorněny na obr. 5. Prodloužení doby akumulace v míchaném roztoku na 180 s nevedlo přes zvětšení píků ke zvýšení citlivosti metody.

Závěr

Byly nalezeny podmínky umožňující dosažení co nejnižších mezí stanovitelnosti na použitých rtuťových elektrodách. Jako nejcitlivější se ukázala dle předpokladů technika AdSV na HMDE. Tato metoda vykazuje daleko vyšší nároky na čistotu základního elektrolytu než ostatní metody a je značně citlivá na přítomnost interferujících látek. Proto byla při praktických stanoveních použita technika DPV na HMDE (cit.¹⁹). Její výhodou je vedle značné citlivosti i rychlost měření.

Autoři děkují za finanční podporu Fondu rozvoje vysokých škol (grant 2291/2002).

LITERATURA

1. Anonym: *Seznam povolených přípravků*, str. 27. Federální ministerstvo zemědělství a výživy ČSSR, Praha 1981.
2. Worthing C. R.: *The Pesticide Manual*, 8. vyd., str. 326. The Lavenham Press, Suffolk 1987.
3. Brown M. A., Chessin R. L.: *Dinitroresols*, str. 8. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta 1995.
4. Bidstrup P. L., Bonnell J. A. L., Harvey D. G.: *Lancet* 1, 794 (1952).
5. Hrelia P., Morotti M., Scotti M.: *Pharmacol. Res. Commun.* 22, 93 (1990).
6. EPA: *Code of Federal Regulations*. 40 CFR 122.42. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 1983.
7. Kolektiv autorů SRS: *Seznam registrovaných přípravků na ochranu rostlin 2000*. Státní rostlinolékařská správa, Praha 2000.
8. EPA: *Health and Environmental Effects Profile for Dinitroresols*. Environmental Protection Agency, Cincinnati 1988.
9. Hawley G. G.: *The Condensed Chemical Dictionary*, 10. vyd., str. 374. Van Nostrand Reinhold Co., New York 1981.
10. Smyth M. R., Osteryoung J. G.: *Anal. Chim. Acta* 96, 335 (1978).
11. Beňadiková H., Popl M., Jakubíčková V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 48, 2636 (1983).
12. Vaneesorn Y., Smyth W. F., v knize: *Electroanalysis in Hygiene, Environmental, Clinical and Pharmaceutical Chemistry* (Smyth W. F., ed.). Elsevier, Amsterdam 1980.
13. Nürnberg H. W., Wolf G.: *Z. Anal. Chem.* 216, 169 (2000).
14. Polák J.: *Chem. Listy* 77, 306 (1983).
15. Beňadiková H., Kalvoda R.: *Anal. Lett.* 17, 196 (1984).
16. Kotouček M., Halata M., Růžička J.: *Acta Univ. Palackianae Olomucensis, Chemica* XXXIII 117, 31 (1994).

17. Sýkora V., Zátka V.: *Příruční tabulky pro chemiky*. SNTL, Praha 1967.
18. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*. FINISH, Pardubice 1992.
19. Fischer J.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha 2002.

J. Fischer, J. Barek, and J. Zima (*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Charles University, Prague*): **Determination of**

Trace Amounts of 2-Methyl-4,6-dinitrophenol Using Modern Polarographic and Voltammetric Methods at Mercury Electrodes

Optimum conditions are described for the determination of 2-methyl-4,6-dinitrophenol using fast polarography (limit of determination $L_Q = 1 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) and differential pulse polarography ($L_Q = 1 \times 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$) at a classic dropping mercury electrode and differential pulse voltammetry ($L_Q = 1 \times 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$) and adsorptive stripping voltammetry ($L_Q = 1 \times 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$) at a hanging mercury drop electrode.

IZOLACE TERPENŮ DESTILACÍ JEHLIČÍ SMRKU ZTEPILÉHO

PAVEL ŘEZANKA* a JAN FÄHRICH

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: prezanka@seznam.cz, jan.fahrnich@vscht.cz

Došlo 3.9.02, přepracováno 10.10.02, přijato 28.11.02.

Klíčová slova: destilace, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, smrk ztepilý, terpeny

Úvod

Studium výskytu a složení terpenických látek v jehličnanech bylo předmětem mnoha studií. Kromě porovnávání různých druhů jehličnanů může být jejich cílem i monitorování vlivu životního prostředí na rostliny. K izolaci terpenických látek z rostlinného materiálu pro analytické účely je používána řada metod. Mezi nejrozšířenější patří destilace¹⁻⁴, paralelní destilace a extrakce^{5,6}, extrakce rozpouštědlem¹⁻⁹ (SE) a extrakce superkritickou kapalinou^{3,5} (SFE). Izolačním postupům se podrobně věnuje studie Holubové, Chvílíčkové a Kubáně¹, kteří srovnávali různé metody izolace monoterpenů z jehličí smrku ztepilého (*Picea abies*) a smrku omorika (*Picea omorica*). Jüttner⁷ zjišťoval změny koncentrací terpenů v jehličí smrku ztepilého rostoucího ve znečištěném prostředí. Množství nejvíce zastoupených terpenů (v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ jehličí) izolovaných těmito autory z jehličí smrku ztepilého jsou uvedena v tabulce I.

Většina monoterpenů jsou látky opticky aktivní. Kromě stáčení roviny polarizovaného světla se tyto látky projevují i v infračervené oblasti ve spektrech vibračního cirkulárního dichroismu (VCD). Touto metodou by proto mohlo být sledováno složení terpenických látek v jehličí s případným využitím při monitorování vlivu prostředí na jejich tvorbu. Nevýhodou metody VCD je to, že potřebuje poměrně velké množství vzorku (řádově jednotky až desítky mg ve 100 μl

Tabulka I

Množství terpenů izolovaných z jehličí smrku ztepilého ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) v závislosti na metodě izolace

Metoda izolace	α -Pinen	Limonen	Kamfen	Lit.
SE	44,4	53,9	84,1	1
SFE	44,3	50,2	78,7	1
Destilace	14,0	22,8	31,9	1
SE ^a	131	120	241	7

^a U této metody použit jiný způsob zpracování jehličí

* Pavel Řezanka se s touto prací úspěšně zúčastnil celostátní soutěže o nejlepší studentskou práci v oboru analytické chemie o cenu firmy Merck v Praze 6.–7. února 2002.

rozpouštědla), a proto je třeba zpracovat navážku několika desítek gramů jehličí. To je poměrně snadno proveditelné metodou destilace z vodného prostředí. Tato práce se proto zabývá několika různými variantami destilace se snahou dosáhnout uspokojivé výtěžnosti postupu při současném zakoncentrování izolovaných látek v co nejmenším objemu rozpouštědla. Tyto varianty byly studovány na mesitylenu (1,3,5-trimethylbenzenu) jako modelové látky. Jako perspektivní z těchto variant se jevila destilace z vodného prostředí spojená s přímým zakoncentrováním destilátu na tuhém sorbentu. Tento postup byl pak použit pro izolaci terpenů z jehličí. Pro porovnání byly některé aspekty izolace terpenických látek studovány i metodou přímé extrakce rozpouštědlem.

Experimentální část

Použité přístroje

Absorpční spektra v UV oblasti byla měřena na spektrofotometru Cary 50 (Varian) v rozsahu vlnových délek 200–400 nm. Obsah mesitylenu v modelových pokusech byl vyhodnocen z rozdílu absorbance při vlnové délce 272,5 nm (vlnová délka absorpčního maxima mesitylenu) a 285 nm (pozadí).

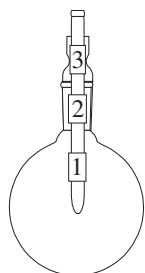
K separaci kapalinovou chromatografií byla použita skleněná kolona 150×3 mm plněná sorbentem Separon SGX C18, 7 μm (Tessek, Praha). Methanol jako mobilní fáze byl čerpán rychlostí 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ čerpadlem LCP 4000 (Ecom, Praha). K fotometrické detekci při vlnové délce 202 nm sloužil spektrofotometrický detektor Knauer (Německo), nebo byla zaznamenávána spektra eluátů v rozsahu 190 až 360 nm detektorem s diodovým polem SM 5000 (LDC Analytical, USA). Naměřené chromatogramy byly zpracovány programem CSW (Data Apex, Praha).

Analýzy plynovou chromatografií byly prováděny na chromatografu Varian 3350 na kapilární koloně 25 m × 0,32 mm s NB-54 stacionární fází (Nordion), s dusíkem jako nosným plynem a plamenovým ionizačním detektorem. Počáteční teplota kolony byla 45 °C po dobu 2 min, potom byla zvyšována rychlostí 10 °C·min⁻¹ na teplotu 180 °C a při ní byla kolona udržována další 4,5 min. Injektor a detektor byly vyhřáty na teplotu 200 °C.

Spektra VCD byla měřena ve střední infračervené oblasti na spektrometru s Fourierovou transformací IFS-66/S (Bruker, Německo) vybaveném modulem PMA 37 (Bruker, Německo). Metoda měření byla detailně popsána dříve¹⁰.

Destilační postupy

Při destilaci modelových vzorků s mesitylenem bylo ke 400 ml destilované vody v 0,5 l varné baňce přidáno 200 μl mesitylenu. Směs byla destilována po dobu 45 až 60 minut. K zachyceným frakcím destilátu bylo přidáno dostatečné množství methanolu (několik ml) tak, aby se mesitylen přítomný ve frakcích rozpustil. Po skončení destilace byla destilační aparatura rozebrána a její jednotlivé části opláchnuty methanolem do připravených baněk. Při použití polyuretha-



Obr. 1. Destilační aparatura č. 5; čísla 1, 2 a 3 označují umístění polyurethanových válečků

nové pěny byly po skončení destilace polyurethanové válečky promyty methanolem. Ve frakcích i extraktech byl obsah mesitylenu stanoven absorpční spektrometrií.

Destilace byla prováděna s pěti variantami destilačních aparatur:

Aparatura č. 1 byla tvořena destilační baňkou a sestupným chladičem o délce 50 cm.

Aparatura č. 2 se od aparatury č. 1 lišila pouze destilační baňkou s postranním otvorem, jímž byl v průběhu destilace vstříkován ethanol.

Aparatura č. 3 byla tvořena destilační baňkou, límcovkou s postranní trubicí pro odběr destilátu a zpětným chladičem.

Aparatura č. 4 byla shodná s aparaturou č. 3, pouze do postranní trubice pro odběr destilátu byly umístěny tři válečky z polyurethanové pěny.

Aparatura č. 5 (obr. 1) byla tvořena destilační baňkou s nasazenou redukcí NZ 32-14, do níž byl zasunut vodou chlazený tm osazený válečky z polyurethanové pěny. Na obrázku jsou vyznačena místa, kde byly válečky umístěny.

Výsledky a diskuse

Modelové pokusy

Postupy, jako je destilace s vodní parou, jsou často s výhodou používány při izolaci těkavých složek z matrice vzorku. Postup je obtížnější pro látky, které jsou velmi málo rozpustné ve vodě. Tato skutečnost je sice příznivá pro urychlení přechodu látky do plynné fáze, avšak z kondenzuje-li tato látka jako oddělená fáze v chladiči nebo na jiných místech aparatury, pak je jen velmi pomalu transportována předestilovanou vodou do předlohy. To se velmi zřetelně projevilo při modelovém pokusu s destilací mesitylenu v aparatuře č. 1, která se jinak v laboratořích k destilacím běžně používá. V sestupném chladiči aparatury se velmi rychle vytvořily kapičky mesitylenu, které dlouho ulpávaly na jeho stěnách, takže do prvních 70 ml destilátu se dostalo pouze 37 % vneseného množství mesitylenu. Hlavní nevýhodou aparatury č. 1 je tedy velký objem destilátu potřebný k předestilování mesitylenu s dostatečnou výtěžností (tabulka II).

Ve snaze urychlit vymytí z kondenzovaného mesitylenu z aparatury byl v dalším pokusu s aparaturou č. 2 přidán během destilace do varné baňky postranní trubicí ethanol. Výrazného urychlení destilace mesitylenu se ale tímto způsobem nedo-

Tabulka II

Celkový objem destilátů a extraktů vzorků V_C a výtěžnost R_V mesitylenu při použití různých destilačních aparatur

Aparatura	V_C [ml]	R_V [%]
1	213	74,9
2	211	81,2
3	32	81,0
4	34	84,6
5	22	89,8

sáhlo. Úspěšnější byla destilační aparatura č. 3; díky jejím menším rozměrům bylo 63 % mesitylenu obsaženo v prvních 10 ml destilátu. Poměrně značný podíl (asi 13 %) mesitylenu zůstával v postranní trubicí pro odběr destilátu.

Vzhledem k tendenci mesitylenu ulpívat na stěnách aparatury se nabízí možnost využít této skutečnosti k jeho zachycení na vhodném materiálu přímo v destilační aparatuře. Při prvním pokusu v tomto směru byla aparatura č. 3 upravena tak, že do postranní trubice byly vloženy tři válečky z polyurethanové pěny, takže odebíraný destilát protékal těmito válečky (aparatura č. 4). Zachytilo se v nich 57 % mesitylenu, v protoklém destilátu o celkovém objemu 25 ml bylo nalezeno 39 % mesitylenu. Účinnost záchytu v polyurethanových válečkách je v tomto případě snižována vysokou teplotou destilátu, který jimi protéká. Proto byla v destilační aparatuře č. 5 polyurethanová pěna navléknuta ve třech segmentech přímo na chladič tm umístěný nad vroucí kapalinou (obr. 1). Po 30 minutách varu a vychladnutí aparatury bylo v segmentech polyurethanové pěny nalezeno 90 % mesitylenu, okolo 3 % mesitylenu bylo nalezeno ve vodě zbylé v destilační baňce. Dostatečně vysoká výtěžnost byla zjištěna i v případě, že do vody bylo kromě mesitylenu přidáno 50 g jehličí. V tomto případě extrakty z polyurethanových válečků obsahovaly kromě mesitylenu příliš mnoho jiných látek absorbujících v UV oblasti spektra, a proto byl mesitylen stanoven kapalinovou chromatografií.

Destilace jehličí

Při prvním experimentu se zpracováním jehličí bylo v aparatuře č. 5 vařeno ve 400 ml vody 5 g čerstvého jehličí po dobu 30 minut. Jehličí bylo jen minimálně poškozené při oddělování ze smrkové větvičky. Po týdnu byl týž vzorek destilován znovu. Methanolicke extrakty tří válečků z polyurethanové pěny byly analyzovány kapalinovou chromatografií s fotometrickou detekcí. Ze složek patrných na chromatogramech bylo možno porovnáním se standardy identifikovat tři monoterpeny, jejichž celkové množství nalezené v jednotlivých válečkách polyurethanové pěny je uvedeno v tabulce III. Překvapivě bylo po týdnu izolováno větší množství monoterpenů než při prvé extrakci. Je patrné, že terpeny jsou z nepoškozeného jehličí extrahovány jen velmi pomalu, a ani teplota varu vody nestačí k jejich uvolnění. To se potvrdilo i dalším pokusem, při kterém bylo zpracováno 15 g jehličí a polyurethanové válečky byly pro účely VCD extrahovány tetrachlormethanem. Po zředění hexanem byl roztok analyzován plynovou chromatografií. Tabulka IV udává celkové množství izolova-

ných monoterpenů ze všech tří polyurethanových válečků, tabulka V distribuci celkového množství monoterpenů mezi jednotlivé válečky. Opět je po týdenním stání patrný nárůst množství izolovaných monoterpenů.

Tabulka III

Celkové množství izolovaných monoterpenů (α -pinenu, limonenu a kamfenu) z jehličí smrku ztepilého ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) získané destilací 5 g jehličí v aparatuře č. 5 a analyzované kapalinovou chromatografií

Váleček	1. destilace	2. destilace ^a
1	51	89
2	23	64
3	21	33
<i>Celkem</i>	95	186

^a Destilace opakována týden po první destilaci

Tabulka IV

Množství izolovaných monoterpenů z jehličí smrku ztepilého ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) získané destilací 15 g jehličí v aparatuře č. 5 a analyzované plynovou chromatografií

Destilace	Limonen		Borneol		Kafr		Celkem
	α -Pinen	Kamfen	Kamfen	Terpinol	Terpinol	Celkem	
1	1,3	4,5	3,7	9,5	15	15	49
2 ^a	32	87	94	11	11	27	262

^a Destilace opakována týden po první destilaci

Tabulka V

Distribuce celkového množství terpenů ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) v jednotlivých válečcích z polyurethanové pěny získaných destilací 15 g jehličí v aparatuře č. 5

Váleček	1. destilace	2. destilace ^a
1	18	179
2	21	50
3	10	33
<i>Celkem</i>	49	262

^a Destilace opakována týden po první destilaci

Tabulka VI

Množství jednotlivých monoterpenů ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) v hexanových extraktech stanovené plynovou chromatografií

Destilace	Limonen		Borneol		Celkem	
	α -Pinen	Kamfen	Kamfen	Terpinol	Terpinol	Celkem
Rozdrcené	210	420	430	31	64	1155
Nepoškozené	9,2	21	22	16	17	85,2

Význam narušení povrchu jehličí pro uvolnění monoterpenů byl sledován plynově-chromatografickou analýzou hexanových extraktů. Ve dvou vialkách s 1 ml hexanu byly po dobu 12 hodin extrahovány tři jehlice, přičemž v jedné vialce byly jehlice na počátku extrakce pod hladinou hexanu rozdrčeny skleněnou tyčinkou. Množství extrahovaných monoterpenů uvádí tabulka VI.

I v další sérii experimentů nebylo v hexanových extraktech nepoškozených jehlic nalezeno významné množství terpenů, a to ani tehdy, jestliže byla extrakce hexanem podpořena mikrovlnným ohřevem. Mikrovlnná energie není absorbována hexanem, ale pouze jehličím, které se tak intenzivně zahřívá, ačkoliv hexan přitom zůstává poměrně chladný. Ohřev byl ukončen, když jehličí ztratilo jasně zelený odstín; přitom se od jehličí oddělila povrchová vrstva vosků. V hexanu ale ani v tomto případě nebyly terpeny nalezeny ve významném množství. Jak jehlice zpracované mikrovlnným ohřevem v hexanu, tak i jehlice čerstvé byly extrahovány hexanem. V jedné řadě pokusů byly 3 jehlice rozdrčeny v 1 ml hexanu skleněnou tyčinkou, v druhé byly rozdrčeny v kulovém mlýnku za teploty kapalného dusíku. Hexan byl k jehlicím přidáván ještě před ochlazením na teplotu kapalného dusíku a drcením. Pokud byl přidán až po rozdrčení jehlic, byly nalezeny podstatně nižší obsahy monoterpenů, protože během temperace a další manipulace s jemně rozdrčeným vzorkem značná část monoterpenů ze vzorku vytékala.

Výsledky analýz jsou pro dva až tři paralelní pokusy uvedeny v tabulce VII. Nalezené obsahy se (na 5% hladině významnosti) neliší ani podle způsobu rozdrčení jehlic, ani při porovnání čerstvých jehlic s jehlicemi předběžně extrahovanými hexanem s mikrovlnným ohřevem.

Použitelnost postupu pro VCD analýzu

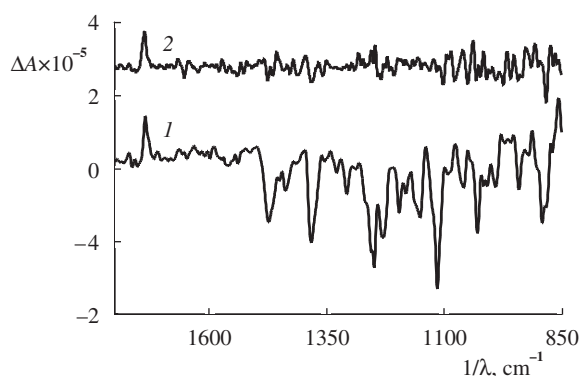
Ukazuje se, že i destilační postup izolace terpenů z jehličí s aparaturou č. 5 má pro praktické použití ve VCD spektro-

Tabulka VII

Množství jednotlivých monoterpenů ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvého jehličí) nalezené v hexanových extraktech pro různé způsoby zpracování jehlic

Zpracování jehlic ^a	Limonen		Borneol		Kafr		Celkem
	α -Pinen	Kamfen	Kamfen	Terpinol	Terpinol	Celkem	
CR	155	138	284	84	65	163	890
	118	105	220	81	72	180	776
	164	146	312	90	70	191	972
CD	236	200	423	109	71	194	1234
	131	120	260	69	49	114	743
	211	200	385	89	63	224	1171
MR	120	113	226	67	50	174	751
	156	131	276	64	42	154	824
	202	195	388	91	75	189	1141
MD	137	117	266	63	53	126	762
	89	102	175	53	37	102	559

^a C – čerstvé jehličí, M – jehličí podrobené mikrovlnnému ohřevu, R – jehlice rozdrčeny v hexanu skleněnou tyčinkou, D – jehlice drcené v kulovém mlýnku za teploty kapalného dusíku



Obr. 2. VCD spektrum tetrachlormethanového extraktu jehličí; 1 – VCD spektrum, 2 – šum (k hodnotám je přičtena hodnota $3 \cdot 10^{-5}$)

metrii řadu nevýhod. K extrakci monoterpenů z polyurethanových válečků je třeba použít poměrně velký objem tetrachlormethanu (celkem asi 1,5 ml na jeden váleček). Spojené extrakty získané zpracováním 15 g jehličí byly proto po vysušení bezvodým síranem sodným zakoncentrovány odpařením přebytečného tetrachlormethanu proudem dusíku. To bylo nevyhnutelně doprovázeno ztrátami monoterpenů. Spektrum VCD odpařeného extraktu o výsledném objemu asi 100 μ l je na obr. 2. Ve spektru je zřetelná přítomnost opticky aktivních látek v extraktu. Signály jsou slabé, ale dobře odlišené od šumu přístroje. Je jich poměrně značný počet. Porovnáním s dostupnými standardy není možno jednoznačně určit, kterým látkám signály přísluší. V extraktu byla zřejmě obsažena příliš složitá směs opticky aktivních látek. Pravděpodobně bude v dalším postupu třeba získanou směs rozdělit na jednodušší skupiny látek. Také bude třeba ověřit, zda ztráty terpenických látek při odpařování extraktu bude možno udržet v přijatelných mezích.

Tato práce byla řešena v rámci grantu MŠMT ČR, č. MSM 223400008 a grantu MŽP ČR, č. VaV 340/1/01. Autoři děkují Ing. Vladimíru Setničkovi za změření VCD spektra.

LITERATURA

- Holubová V., Chvříčková I., Kubáň V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 1073 (2000).
- Pfeifhofer H. W.: Flavour Fragrance J. 15, 266 (2000).
- Muzika R. M., Campbell C. L., Hanover J. W., Smith A. L.: J. Chem. Ecol. 16, 2713 (1990).
- Owens M. K., Straka E. J., Carroll C. J., Taylor C. A.: J. Range Manag. 51, 540 (1998).
- Orav A., Kailas T., Koel M.: J. Essential Oil Res. 10, 387 (1998).
- Hennig P., Steinborn A., Engewald W.: Chromatographia 38, 689 (1994).
- Jüttner F.: Physiol. Plant. 72, 48 (1988).
- Kainulainen P., Holopainen J. K., Oksanen J.: New Phytol. 130, 231 (1995).
- Kainulainen P., Holopainen J. K., Oksanen J.: Water, Air, Soil Pollut. 85, 1393 (1995).
- Urbanová M., Setnička V., Volka K.: Chirality 12, 199 (2000).

P. Řezanka and J. Fährich (Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Isolation of Terpenes from Norway Spruce Needles by Distillation**

A novel approach to isolation of semivolatile organic compounds from aqueous media is proposed based on combined distillation and solid phase extraction. A model compound, 1,3,5-trimethylbenzene, was concentrated with good yield on polyurethane foam coating of a cooler positioned above the boiling aqueous mixture. It was found that terpenes are released very slowly from intact Norway Spruce (*Picea abies*) needles even at the boil. Also microwave-assisted extraction with hexane was inefficient. The vibrational circular dichroism spectrum of compounds isolated from the needles by distillation and solid phase extraction was too complex to be easily interpreted.

OSOBNÍ ZPRÁVY

RNDr. PhMr. Ladislav Novotný, DrSc., osmdesátníkem

Doktor Novotný, bývalý dlouholetý vědecký pracovník Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR a nyní stále ještě plně zaměstnaný a sympaticky nakažlivou vitalitou oplývající farmaceut, oslavil v prosinci 2002 své osmdesáté narozeniny. My všichni, kteří našeho jubilanta známe dlouhá léta, s radostí konstatujeme, že jeho rázný a rychlý krok se jen velmi mírně zkrátil, že jeho oči září stále stejným nadšením jako dřív, když mluví o své práci, rodině, nových léčích, dobrém jídle a dalších půvabech života. Jeho velkou vitalitu a vždy dobré zdraví jsme obdivovali nejenom jako dar života, ale také trochu i jako plod jeho životní a farmaceutické moudrosti. Ať tak nebo tak, přejeme mu, aby mu oba tyto zdroje bohatě sloužily i nadále.

Doktor Novotný se narodil 26.12.1922 v Třemešné u Táboru. Svá gymnaziální studia začal v Litoměřicích a po jejich záboru v r. 1938 pokračoval v Terezíně a Nymburce a studia ukončil v r. 1942 v Táboře. Ještě téhož roku se v rámci totálního nasazení ocitl až ve Vídni. V roce 1945 pak nastoupil do lékárny jako aspirant farmacie a po dvouleté praxi odešel studovat farmacii na Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. Po ukončení farmaceutických studií v r. 1949 (PhMr.) pokračoval ve studiu chemie a promoval v r. 1952 (RNDr.). Pak byl přijat do tehdy ještě Ústředního ústavu chemického, jenž se stal vzápětí Ústavem organické chemie a biochemie ČSAV. Tam se podílel na vzniku, rozvoji, úspěchu i na různých transformacích oddělení přírodních látek ve všech pozicích od vědeckého aspiranta (CSc. v r. 1961) přes vědeckého pracovníka (DrSc. v r. 1970) až po vedoucího oddělení. V oddělení a také v různých vedoucích funkcích ÚOCHB pracoval až do r. 1989, kdy odešel do důchodu.

Odborným zaměřením Dr. Novotného byla chemie přírodních látek rostlinného původu. Samozřejmě, že ze všeho nejvíce se věnoval tradičním léčivým rostlinám, od devětsilů (rod *Petasites*) přes starčky (rod *Senecio*) až po celý okruh rostlin subtribu *Senecioneae*. V těchto rostlinách objevil a pak většinu svého odborného úsilí věnoval furoeremofilanům, terpenoidům chemotaxonomicky typickým pro tento subtribus – látkám zodpovědným za mnohé z léčivých účinků těchto rostlin. Jeho badatelská práce, zveřejněná ve více než stovce publikací, a tím i jeho pracoviště, dosahovaly mezinárodního uznání a mnoha plodných a zajímavých spoluprací.

Dr. Novotný se po celý čas své odborné činnosti zajímal také o farmacii a farmakologii. Byl aktivním členem výboru sekce přírodních léčiv České farmaceutické společnosti. Dlouhodobě externě spolupracoval s Farmaceutickou fakultou UK v Hradci Králové, kde byl kontinuálně členem různých komisí. Vedl a vychovával řadu domácích i zahraničních aspirantů a stážístů v oboru přírodních látek a ještě více diplomantů právě z oboru farmacie. Nebyla snad v Čechách významnější lékárna, kde by Dr. Novotný neměl alespoň jednu svoji bývalou diplomantku, a to navíc s duší vděčnou a přátelsky spřízněnou. A co víc, nyní existuje lékárna „U sv. Antonína“ v Praze 7, kde pracuje sám Dr. Novotný. Svoji činnost, pracovitost, dobrý vztah k lidem a k farmacii přenesl totiž náš

jubilant hned po odchodu do důchodu na lékárenskou praxi. A to naplno, jako u všeho, co měl a má rád. V roce 2001, tedy ve svých 79 letech, složil atestaci 1. stupně, a uzavřel tak své *curriculum pharmaceuticeae* obrazně i doslova, od aspiranta v lékárně „U Anděla strážce“ až po lékárníka „U sv. Antonína“. Jeho *curriculum vitae* je ovšem stále ještě košatě otevřené tak, že i my o generaci mladší mu to jen s obdivem závidíme. U příležitosti jubilea mu všichni gratulujeme a přejeme do dalších let vše nejlepší a i nadále nezlomné zdraví a neutuchající životní elán.

Juraj Harmatha

Prof. Ivan Pavlík sedmdesátiletý

Tempora labuntur tacitisque senescimus annis

(Ovidius)

Dne 18. února 2003 slaví své sedmdesáté narozeniny kolega a zároveň i učitel mnoha nás, absolventů VŠCHT Pardubice i dnešní Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, prof. Ing. Ivan Pavlík, CSc.



Všichni jej známe především jako zakladatele vědecké školy chemie organokovových sloučenin na VŠCHT v Pardubicích. Jeho vědecká práce je orientována takřka výhradně na chemii metalocenů, tedy na oblast chemie teoreticky i experimentálně velmi náročnou, která pro vývoj chemie anorganické, organické, a v současné době i makromolekulární, sehrála a dosud sehrává mimořádně významnou úlohu jak po stránce teoretické, tak i praktické. Této problematice se dnes věnuje řada špičkových vědeckých týmů a světově proslulých

vědeckých pracovníků a skutečnost, že prof. Pavlík v této konkurenci obstál, je dokladem jeho hlubokých znalostí a schopností. Úctyhodný počet původních vědeckých prací, přednášek a posterů na konferencích a sympoziích a citačních ohlasů na ně je však jen jednou stránkou, charakterizující osobnost kolegy Pavlíka. Všichni jej známe i jako výborného pedagoga, který vychoval kolem 120 diplomantů i řadu vědeckých aspirantů a dnešních doktorandů. Rád vzpomínám na cvičení z anorganické chemie v prvním ročníku v roce 1960, kdy nás, tehdy jako odborný asistent, cvičil v chemickém názvosloví a dodnes v duchu slyším jeho „bishafničitan bismutitý“. Za svoji příkladnou pedagogickou práci získal řadu ocenění.

Prof. Pavlík je vynikajícím odborníkem a vynikajícím pedagogem, avšak především je velmi vzdělaným a noblesním člověkem s obrovskými zkušenostmi a znalostmi historie, mechanismů a tradic akademického prostředí. Tuto stránku jeho osobnosti jsem mohl ocenit zejména v období, kdy se mnou po dobu šesti let úzce spolupracoval jako proděkan fakulty chemicko-technologické pro vědu a pedagogiku. V období na počátku devadesátých let, kdy jsme na fakultě postupně měnili čtyřleté studium na pětileté a posléze zaváděli kre-

ditový systém s první a druhou státní zkouškou, zaváděli doktorské studium, formulovali nové studijní a zkušební řády fakulty, zaváděli nové studijní obory biochemického a bioanalytického zaměření a provedli fakultu akreditačními řízeními, to byl právě on, kdo se jako příslušný proděkan o tyto významné úspěchy fakulty osobně zasloužil. Jeho významným přínosem bylo i obnovení tradice užívání akademického jazyka, jazyka latinského, při akademických obřadech a rovněž vypracování nových, univerzitního prostředí důstojných, scénářů akademických obřadů při imatrikulaci, bakalářské sponzi, inženýrské a magisterské promoci, promoci doktorů i čestných doktorů Univerzity Pardubice. Všichni, kdo se tehdejších akademických obřadů zúčastňovali, je velmi vysoce hodnotili a rádi na ně vzpomínají.

Prof. Pavlík, ač dnes již sedmdesátník, je stále velmi aktivní, duševně svěží a podílí se na řešení programu výzkumného centra fakulty i na výchově studentů specializace a doktorandů. Přejeme mu do dalších let zdraví, neutuchající elán a duševní svěžest.

Jaromír Šňupárek

VÝUKA CHEMIE

LUDSKÝ ORGANIZMUS A pH ROZTOKOV

DANICA MELICHERČÍKOVÁ^a
a MILAN MELICHERČÍK^b

^aKatedra vlastivedy a prírodovedy, Pedagogická fakulta, Univerzita Mateja Bela, Ružová 13, 974 11 Banská Bystrica,

^bKatedra chémie, Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica, Slovenská republika

e-mail: dmelicher@pdf.umb.sk, melicher@fpv.umb.sk

Došlo 6.12.01, prepracované 7.4.02, prijaté 20.6.02.

Kľúčové slová: chémia, vyučovanie chémie, pH roztokov, ľudský organizmus, tráviaci systém, vylučovací systém, krvný systém, koža, acidobázická rovnováha, acidóza, alkalóza

Obsah

1. Úvod
2. Metodika a výsledky výskumu
3. Ľudský organizmus a pH roztokov
 - 3.1. Ústna dutina
 - 3.2. Žalúdok
 - 3.3. Pankreatická šťava
 - 3.4. Žlč
 - 3.5. Črevná šťava
 - 3.6. Moč
 - 3.7. Pot
 - 3.8. Koža
 - 3.9. Krv
4. Systémy na udržanie acidobázickej rovnováhy v krvi
5. Záver

1. Úvod

Každá spoločenská zmena je charakterizovaná zmenou hodnotového systému spoločnosti, ale aj jednotlivca. Odráža sa to aj v školskom systéme pri preferovaní vyučovacích predmetov. Platí to aj pre chémiu. Vednému odboru aj vyučovaciemu predmetu chémie klesajú preferencie s porovnaním povojnového obdobia, ktoré považujeme za obdobie rozmachu chemickej výroby, chemickeho priemyslu. Zmena hodnotového systému vyžaduje aj zmenu orientácie učiva. Nie je žiadúce, aby chemické učivo na základných a stredných nechemických školách, kde sa chémia vyučuje ako všeobecnovzdelávací predmet, bolo aj naďalej orientované na technológiu výroby a spracovanie surovín.

Podľa predstáv J. A. Komenského, ale aj súčasných humanizačných trendov v školskom systéme, je potrebné pri chemickom vzdelávaní všeobecného charakteru uprednost-

ňovať tie informácie, ktoré môže každý človek, bez ohľadu na svoje zamestnanie, využiť vo svojom živote. Týmto smerom sú zamerané aj ciele učebných osnov pre základné školy¹ a gymnáziá^{2,3}, ktoré nadobudli platnosť 1.9.1997.

2. Metodika a výsledky výskumu

Sme presvedčení, že medzi informácie využiteľné v bežnom živote možno zaradiť aj poznatky o hodnotách pH ľudského organizmu. Po dvoch rokoch platnosti spomenutých učebných osnov chémie sme realizovali na základných školách (9. roč.) a stredných školách (2. roč.) prieskum schopnosti využívať chemické poznatky v bežnom živote jednotlivca. Prieskum bol realizovaný dotazníkovou formou s výberovými a voľnými odpoveďami na predložené otázky.

Výsledky výskumu ukázali, že vyučovanie chémie sa orientuje stále veľmi výrazne na osvojovanie teoretických poznatkov a len okrajovo na získavanie schopnosti využívať osvojené poznatky na riešenie situácií, problémov každodenného života súčasnosti i budúcnosti.

Pozornosť sme zamerali aj na poznatky o pH prostredí. Tento pojem je v širokej verejnosti používaný najmä v súvislosti s kyslými dažďami. My sme však orientovali pozornosť na ľudský organizmus. Respondentom sme položili nasledujúce otázky:

- Ióny sodíka Na⁺ a draslíka K⁺ sa zúčastňujú na udržiavaní acidobázickej rovnováhy v ľudskom organizme. Aké hodnoty pH má u zdravého človeka krv?
- Máte na výber tri toaletné mydlá, ktoré sa líšia svojím pH: a) pH 5,5; b) pH 7,0; c) pH 9,5. Ktoré by ste si vybrali na umývanie a prečo?

Prieskumu sa zúčastnilo 521 respondentov stredných škôl nechemického zamerania. Boli to študenti druhých ročníkov gymnázií (G), stredných priemyselných škôl (SPŠ), stredných zdravotných škôl (SZŠ) a obchodných akadémií (OA). Predpokladali sme rozdielnu úspešnosť respondentov z dôvodu nerovnakého postavenia chémie v učebných plánoch stredných škôl. Na gymnáziách je chémia zaradená medzi maturitné predmety, na stredných priemyselných školách je začlenená medzi všeobecnovzdelávacie (nie odborné, profilujúce)

Tabuľka I
Výber hodnôt pH krvi zdravého človeka

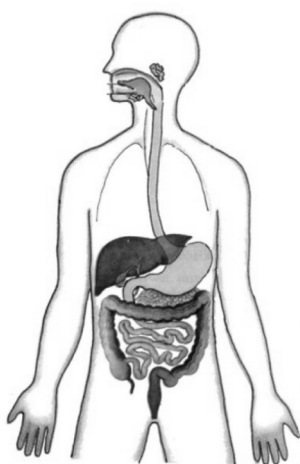
Odpovede	Vyjadrenie respondentov podľa typu škôl [%]			
	SZŠ	G	SPŠ	OA
Bez odpovede	37	79	77,3	83
Správne	27,8	0,8	0	2,3
Nesprávne	35,2	25,2	22,7	14,7
pH 7,0	24,1	12,6	4,8	3,4
pH > 7,0	3,7	1,7	6,0	1,1
pH < 7,0	7,4	10,9	11,9	10,2

Tabuľka II
Výber mydla podľa hodnoty pH pre zdravú pokožku

Odpovede	Vyjadrenie respondentov podľa typu škôl [%]			
	SZŠ	G	SPŠ	OA
Bez odpovede	1,9	3,4	4,8	1,1
pH 5,5	92,5	81,5	83,3	94,4
pH 7,0	3,7	13,4	9,5	3,4
pH 9,5	1,9	1,7	2,4	1,1
Správne zdôvodnenie	63,0	57,1	44,0	56,8

predmety a na obchodných akadémiách sa predmet chémie ani nevyučuje. Niektoré chemické témy sú zaradené do vyučovacieho predmetu Tovaroznalectvo. Predpokladali sme, že respondenti stredných zdravotných škôl budú najúspešnejší pri riešení otázok zameraných na ľudský organizmus. Mali tvoriť porovnávajúcu vzorku. Výsledky získané z prieskumu sú zhrnuté v tabuľke I a II.

Prvá otázka, ako sa vyjadrili mnohí respondenti písomne, okrem respondentov zo SZŠ, ich prekvapila. Až do prečítania otázky sa nikdy nezamýšľali nad tým, že aj ľudská krv má nejaké hodnoty pH. Tento stav zapríčiniť nedostatočné integrovanie učiva biológie, všeobecnej a anorganickej chémie, ale aj minimálna orientácia aplikácie chemických vedomostí na ľudský organizmus. Neuvažovali nad zmenou hodnoty pH krvi vplyvom metabolických procesov (prijímaním potravy), svedčia o tom aj údaje v tabuľke I. V inej pozícii boli respondenti stredných zdravotných škôl. Takmer tretina (27,8 %) respondentov SZŠ určila správne hodnotu pH v intervale 7,36–7,44. To, že 24,1 % respondentov SZŠ uviedlo pH 7,0, súvisí pravdepodobne s tým, že nevedeli presnú odpoveď, ale pamätali si, že je to hodnota blízka neutrálnemu prostrediu 7,0. Medzi nesprávnymi údajmi sa vyskytovali rôzne hodnoty pH, ale najčastejšie sa objavila hodnota 5,5. Dá sa predpokladať, že respondenti boli inšpirovaní ďalšou položenou otázkou, ktorá sledovala problematiku pH mydiel.



- sliny pH 7,0
- žalúdočná šťava
 - prázdny žalúdok pH 7,0
 - pri trávení pH 1,0–1,7
- pankreatická šťava pH 8,5
- žlč
 - v žlčovej pH 7,1–7,3
 - v žlčníku pH 6,99–7,7
- črevná šťava
 - dvanástnik pH 6,0
 - bedrovník pH 8,0

Obr. 1. Hodnoty pH v tráviacej sústave

Len zanedbateľné množstvo respondentov neodpovedalo na druhú položenú otázku, na rozdiel od predchádzajúcej otázky (3/4 respondentov neodpovedalo), hoci obe sledujú hodnoty pH prostredia. Prevažná väčšina odpovedajúcich si vybrala mydlo s pH 5,5. Pri zdôvodňovaní výberu vo všetkých typoch škôl respondenti upozornili, že rozhodnutie urobili na základe reklamy mydla. Väčšiu úspešnosť respondentov zdravotných škôl a obchodných akadémií možno vysvetliť tým, že v triedach počtom prevažujú nad chlapcami dievčatá, ktoré sa zaujímajú o kozmetické výrobky. Tým ale netvrdíme, že chlapci nevedeli správne odpovedať. Odpovede na túto otázku nás ale upozornili na nedostatočné vedomosti o hodnotách pH roztokov, pretože 12,7 % respondentov tvrdilo, že pH 5,5 je neutrálne prostredie. Najhoršie sú na tom respondenti z obchodných akadémií, ktoré v rámci tovaroznaleckej chémie problematike pH roztokov nedávajú priestor. Pri vyhodnocovaní tejto otázky nás napadlo, či by bola tak úspešne zodpovedaná, keby sme sa pýtali na pH pokožky.

3. Ľudský organizmus a pH roztokov

S určovaním pH roztokov sa žiaci stretávajú vo vyučovaní chémie v 8. ročníku základnej školy. Podľa učebných osnov¹ majú získať zručnosť využívať indikátory na určovanie hodnoty pH roztokov. V učebnici chémie⁴ sa upozorňuje na kyslé dažde, „ktoré škodlivo pôsobia nielen na organizmy, ale aj na stavby a priemyselné zariadenia“. V uvedenej učebnici chémie pre základné školy⁴ sa v motivačnom texte učiva *Kyslosť a zásaditosť vodných roztokov* začína nasledujúcou vetou: „Všetky deje v organizmoch prebiehajú vo vodných roztokoch.“ Viac sa text roztokom v ľudskom organizme nevenuje. Inak je to v najnovšej učebnici *Základy chémie pre gymnáziá s osemročným štúdiom*⁵, v ktorej je upozornenie na hraničné hodnoty pH ľudskej krvi. Odporúčame myšlienku o vodných roztokoch v organizme (ľudský organizmus obsahuje 65–80 % H₂O) ďalej rozvíjať za pomoci obrázkov znázorňujúcich ľudskú postavu s vyznačenými orgánmi, v súvislosti s ktorými môžeme uvádzať hodnoty pH v ľudskom organizme. Ide predovšetkým o tráviaci systém – sliny, žalúdočná šťava, žlč, pankreatická šťava (obr. 1), vylučovací systém – moč, pot (obr. 2), krvný systém a kožu (obr. 3).

3.1. Ústna dutina

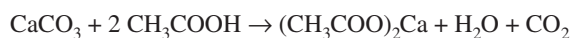
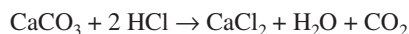
Na základe výsledkov výskumu by bolo vhodné zručnosť určovania pH pomocou indikátorov získať pri určovaní hodnoty pH mydlového roztoku, šampónu, ale aj slín po vyčistení zubov zubnou pastou, bezprostredne po konzumácii jedla, po krátkodobom, či dlhodobom žuvaní žuvačky a pod. Ak budeme sledovať hodnoty pH ústnej dutiny aj od času, môžeme zistiť, do akej miery je pravdivá reklama o vplyve pôsobenia žuvačky na pH v ústnej dutine. Sliny tvorí asi 99 % vody a ich pH je okolo 7,0. Učivo chémie možno aktualizovať aj reakciou na reklamu, ktorá upozorňuje na uvoľňovanie iónov Ca²⁺ zo zubov v ústnej dutine. Je potrebné potvrdiť skutočnosť, že vápnik viazaný v zuboch sa v kyslom prostredí uvoľňuje, čím sa znižuje kvalita zubov. Uvoľňovanie vápnika zo zubov je však výrazné až vtedy, ak pH v ústnej dutine klesne pod hodnotu 5,5 (cit.^{6,7}). Pri normálnych hodnotách pH slín (okolo

7,0) sú sliny v ústnej dutine nasýtené vápnikom, zuby preto vápnik do slín neuvoľňujú^{6,7}.

Vápnik sa v zuboch nachádza vo forme uhličitanov (CO_3^{2-}), fosforečnanov (PO_4^{3-}) a fluoridov (F^-). Informáciu o rozpustnosti CaCO_3 v kyslom prostredí možno demonštrovať pokusom.

Postup experimentu: Do Petriho misky na dve miesta nasypeme tenkú vrstvu rozomletého vápencu CaCO_3 ; môžu byť aj rozdrvené ulity živočíchov (slimákov, ustríc a pod.), na ktoré kvapneme zriedené roztoky kyseliny chlorovodíkovej ($\text{pH} < 5,5$) a kyseliny octovej, napr. ocot ($\text{pH} > 5,5$). Pozorované reakcie premietneme pomocou spätného projektora.

Z pokusu jasne vyplýva, že v kyslejšom prostredí sa uhličitan vápenatý CaCO_3 rozkladá rýchlejšie (pozorujeme výraznejšie šumenie spôsobené uvoľneným CO_2).



V slinách je obsiahnutý aj enzým α -amyláza, ktorý štiepi škrob na oligosacharidy. Podľa zásad racionálneho stravovania máme pokrm v ústach podržať určitý čas (25× požúť každý hlt), aby rozklad škrobu začal už v ústnej dutine. Amyláza slín má optimálnu aktivitu pri pH 6,7 (cit.⁸). Trávenie škrobu α -amylázou prebieha aj v žalúdku, avšak len dovtedy, kým sa enzým neinaktivuje kyslou žalúdočnou šťavou.

3.2. Žalúdok

V prázdnom žalúdku sa vylučuje len malé množstvo žalúdočnej šťavy s neutrálnym alebo alkalickým pH . Prijímaním potravy sa pH znižuje, dosahuje približne hodnotu 1,0. Po premiešaní žalúdočnej šťavy s potravou sa kyslosť zriedením znižuje (hodnota pH sa zvyšuje) na výsledné pH s hodnotou približne 1,7. Pri tomto pH je aktivita enzýmu pepsín (rozklad bielkovín) najvyššia. Trávenie bielkovín z mliečnych potravín ovplyvňuje enzým gastrínsín, ktorého optimálne pH je vyššie ako pre pepsín (okolo pH 3).

Niektorí ľudia po konzumácii určitého druhu potravín (rajčiaková polievka, čierny chlieb a pod.) majú zvýšené vylučovanie žalúdočných štiav a pociťujú pálenie záhy. Nie je to u ľudí stav zriedkavý, niektorí ho pociťujú častejšie, iní len ojedinele. Ako odstrániť tieto nepríjemné pocity v tráviacej sústave? Túto otázku kladú aj autori úloh z chémie pre ZŠ (cit.⁹). Žiakom je poskytnutých na výber 5 možností a jednou z nich je aj konzumácia mandlí. Je možné realizovať pokus na dôkaz vplyvu mandlí na hodnotu pH .

Postup experimentu: Pomocou papierikov s univerzálnym indikátorom zmerajte pH slín. Potom dôkladne pohryzte 4–5 mandlí a ešte pred prehltnutím opäť zmerajte pH slín.

Mandle spôsobia zvýšenie hodnoty pH slín (zásadité prostredie). Po experimente možno nechať žiakov uvažovať nad tým, ako sa pálenie záhy odstráni pomocou mandlí. Po zistení, že mandle môžu pomôcť pri odstraňovaní pálenia záhy, by niekto mohol reagovať tak, že zje naraz väčší počet mandlí (viac ako 4–5) s očakávaním rýchlejšieho a výraznejšieho účinku. Tento postoj by nebol správny, pretože pri väčšom počte konzumovaných mandlí sa môžu prejaviť nepriaznivé účinky na ľudský organizmus. Z amygdalínu, obsiahnutého v mandliach, sa v žalúdku môže uvoľniť jedovatý kyanovodík.

Smrteľná dávka pre dospelého človeka je asi 60 horkých mandlí, pre deti 5–10 horkých mandlí. Tepelnou úpravou (varením, pečením) sa jedovatosť jadier stráca¹⁰.

3.3. Pankreatická šťava

Pankreatická šťava je vylučovaná podžalúdkovou žľazou do dvanástnika. Na rozdiel od žalúdočnej šťavy má pankreatická šťava výrazne zásaditú reakciu a jej pH sa pohybuje v intervale 7,4–8,3. Jednou z úloh pankreatickej šťavy je znižovať kyslú reakciu tráveniny uvoľňovanej zo žalúdka do dvanástnika.

Organizmus má veľa mechanizmov, ktorými zabezpečí požadované hodnoty pH v danom prostredí. Ak je v dvanástniku pH nižšie ako 4,5, uvoľňuje sa zo sliznice dvanástnika do krvi hormón sekretín, ktorý podnecuje vylučovanie pankreatickej šťavy bohatej na alkálie, ale chudobnejšej na enzýmy.

3.4. Žlč

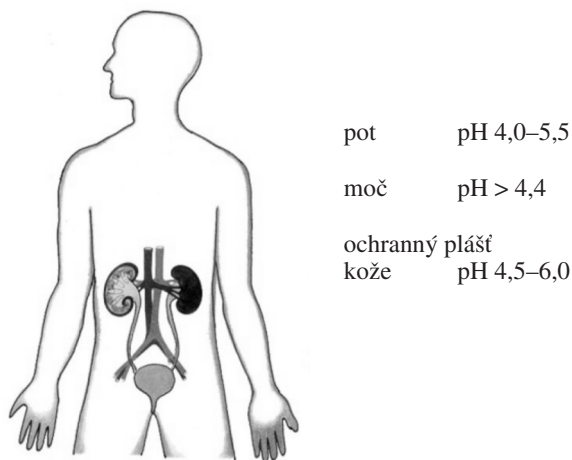
Denne pečeň vylúči 500–700 cm^3 žlče, ktorej pH je slabo alkalické (7,1–7,7). Pečeň produkuje žlč kontinuálne a jej hodnota pH je 7,1. V žlčníku sa žlč mierne zahusťuje a mení aj hodnoty pH (6,99–7,7) (cit.^{6–8}).

3.5. Črevná šťava

Črevná šťava má významnú úlohu pri dokončovaní trávenia, hoci jej tráviaca účinnosť je menšia ako pankreatickej šťavy. Črevná šťava je slabo zásaditá tekutina, v dvanástniku má pH 6,0 a v ďalšej časti (v bedrovníku), kde už natoľko neovplyvňuje prostredie žalúdočná šťava, je pH 8,0.

3.6. Moč

Hodnota pH moču je premenlivá, neklesá však pod hodnotu 4,4. Pri sedavom zamestnaní sa telo okysľuje. Po piatich hodinách práce v uzavretej miestnosti môže pH moču klesnúť zo 7,5 na 5,0. Pohyb na čerstvom vzduchu napomôže k acidobázickej rovnováhe organizmu. Zmizne pocit únavy, zlepši



Obr. 2. Hodnoty pH vo vylučovacej sústave

sa celková nálada. Alkalická reakcia moču môže byť zapríčinená aj vysokou sekréciou žalúdočných kyselín¹¹.

3.7. Pot

Potom organizmus vylučuje prebytočné kyseliny. Pre zdravie človeka je prospešné, ak sa každý deň zapotíme pohybom (práca, cvičenie). Potné žľazy objavil J. E. Purkyně 1833. V koži sú asi 2 milióny potných žliaz dlhých 2,3 mm. Ich celková dĺžka je približne 5 km. Vylučovacia činnosť potných žliaz je rytmická, vylučujú pot s frekvenciou 5–15 cyklov za minútu, pričom pH potu sa pohybuje v intervale 4,0–5,5. Pot obsahuje kyselinu urokanovú, ktorá má ochranný význam pred ultrafialovým žiarením.

Aj v tomto prípade môžeme reagovať na reklamu kozmetickej firmy, ktorá poukazuje na rozdielnosť pH potu ženy a muža. Je vhodné overiť ponúkanú informáciu indikátorovým papierikom na spotených dlaniach tak, ako to prezentuje reklama. Ak máme k dispozícii indikátorové papieriky s možnosťou jemného odlíšenia pH v kyslej oblasti, zistili by sme, že pH potu dievčat (chlapcov) v triede nie je rovnaké, pretože na zloženie potu vplýva veľa faktorov. Okrem zdravotného stavu (telesného, psychického) je to aj zloženie prijímanej potravy.

3.8. Koža

Ochranný plášť kože (voda, bielkoviny, lipidy) má kyslú reakciu. Hodnota pH sa pohybuje v intervale 4,5–6,0. Kyslá reakcia ochranného plášťa kože slúži ako tlmiaci roztok proti účinku slabých kyselín a zásad, aj proti napučivaniu rohoviny vrstvy kože. Ak ochranný plášť kože nadobudne neutrálnu, alebo slabu alkalickú reakciu, je koža citlivejšia na pôsobenie plesní, kvasiniek a baktérií. Je to najmä pod pazuchou, v okolí genitálu a análneho otvoru.

Napučiavanie buniek (keratínu) v alkalickom prostredí pozorujeme aj pri umývaní vlasov šampónmi na báze saponátov a mydiel. Prirodzený obal vlasu (kutikula) je tvorený strieškovite usporiadanými plochými odumretými bunkami, ktoré na seba priliehajú. V alkalickom prostredí keratín v bunkách kutikuly prijíma značné množstvo vody, čo spôsobuje, že bunky kutikuly na seba nepriliehajú. Zvierajú s osou vlasu väčší uhol. To je príčinou toho, že susedné vlasy sa odškerenými doštičkami zakliesnia, dôsledkom toho sa vlasy zle rozčesávajú. Tento nedostatok sa dá odstrániť tak, že sa vlasy po zmývaní opláchnu slabou kyslým roztokom (octovou vodou).

3.9. Krv

V zdravom ľudskom organizme má krv veľmi dôležité funkcie, ktoré si vyžadujú stálu hodnotu pH. Krv má veľmi slabú alkalickú reakciu, krv v tepnách má hodnotu $\text{pH } 7,40 \pm 0,04$ (t.j. 7,36–7,44), v žilách má krv kyslejšiu reakciu. Ako sme už uviedli, organizmus má niekoľko mechanizmov na udržanie acidobázickej rovnováhy, pri ich zlyhaní sa rovnováha narúša, čo sa prejaví ochorením organizmu. Ak hodnota pH krvi klesne pod hodnotu 7,36 ($\text{pH} < 7,36$) nastáva prekyslenie organizmu – acidóza, ak pH krvi narastie nad hodnotu 7,44 ($\text{pH} > 7,44$) vzniká alkalóza. V živom organizme by nemala hodnota pH krvi prekročiť interval 7,0–7,8. Hodnoty

pH krvi mimo tento interval sú nezlučiteľné so životom. Zmena hodnoty pH v krvi vplýva na pevnosť väzby kyslíka na hemoglobín⁷.

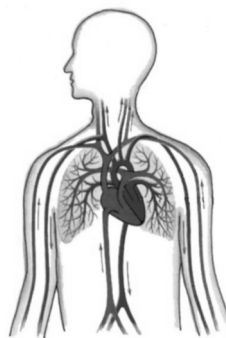
Ľudské telo musí byť schopné vyrovnávať sa s veľkými presunmi iónov H^+ , ktoré túto hodnotu pH ohrozujú z obidvoch strán. Napr. len CO_2 tvoriaci sa metabolizmom v ľudskom organizme je príčinou tvorby 13 mol H^+ za deň^{12,13}, navyše v metabolizme ešte vznikajú aj niektoré kyseliny (fosforečná a sírová) v množstve okolo 70 mmol H^+ . Na acidobázickú rovnováhu výrazne pôsobia zloženie stravy, liečivá, aj konzumácia minerálnych vôd. Každá potrava, ktorú strávime, zanecháva v našom tele zvyškový „popol“, ktorý je kyslý, zásaditý alebo neutrálny. Z uvedeného dôvodu delíme potraviny na kyselinotvorné a zásadotvorné. Pojem kyselinotvorné a zásadotvorné sa nezodpovedá automaticky s chuťou potravy, ale vyjadruje fyziologické pôsobenie potravy na organizmus po metabolizme. Napríklad citrón chutí veľmi kyslo, ale je zásadotvorný.

V prijímanej potrave by mal byť mierne prevyšujúci podiel zásadotvornej potravy nad potravou kyselinotvornou, aby organizmus čo najmenej využíval mechanizmy acidobázickej rovnováhy. Ak je hladina kyselín v tele vyššia, ako je optimum, zapríčiňuje to nielen zníženie odolnosti organizmu voči chorobám, ale aj mnohé ochorenia (dna, obličkové a žľozové kamene, reumatizmus a pod.).

4. Systémy na udržanie acidobázickej rovnováhy v krvi

Ľudský organizmus má zabezpečené mechanizmy na udržanie acidobázickej rovnováhy, ich možnosti sú však obmedzené. Ak sú hodnoty pH mimo interval 7,0–7,8, zlyhávajú mechanizmy na udržanie acidobázickej rovnováhy, v organizme nastávajú významné patologické zmeny, ktoré za určitých podmienok môžu vyvolať smrť. Prehľad tlmivých systémov je v tabuľke III.

Hydrogenuhličitanový systém – tvorí ho kyselina uhličitá H_2CO_3 a hydrogenuhličitan sodný NaHCO_3 v pomere 1:20 (cit.⁸). Tento systém predstavuje viac ako polovicu celkovej tlmivej kapacity, z čoho na plazmu pripadá 35 % a na erytrocyty 18 %. V lekárskejších publikáciách^{6,8} sa stretávame s názvom hydrogenuhličitanový systém. Podľa nášho názoru je potrebné na gymnáziách upozorniť na túto skutočnosť i napriek tomu, že poukážeme na nedodržiavanie chemického názvoslovia v iných vedných odboroch.



krv $\text{pH } 7,40 \pm 0,04$

Obr. 3. Hodnoty pH v cievnej sústave

Tabuľka III

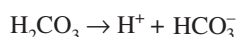
Podiel jednotlivých tlmivých systémov na tlmivej kapacite krvi¹⁴

Tlmivý systém	Plazma [%]	Erytrocyty [%]
Hemoglobín	–	35
HCO ₃ ⁻ /H ₂ CO ₃	35	18
Plazmové bielkoviny	7	–
Fosfáty anorganické	1	1
organické	–	3
<i>Celkom</i>	<i>43</i>	<i>57</i>

Acidóza – hodnoty pH < 7,36, v prostredí je nadbytok iónov H⁺, ktoré sú zachytávané iónmi HCO₃⁻, čím sa ich koncentrácia v roztoku zníži. Vzniknutá kyselina uhličitá sa rozloží na vodu a oxid uhličitý, ktorý je dýchacím systémom uvoľňovaný do okolitého prostredia.



Alkalóza – hodnoty pH > 7,44, v prostredí je nedostatok iónov H⁺, ich zvýšenie sa zabezpečí tým, že sa ióny H⁺ uvoľnia z kyseliny uhličitej.

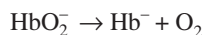


Hemoglobínový systém – hrá úlohu tlmíča v erytrocytoch. Intracelulárne majú ako hemoglobín, tak aj oxyhemoglobín charakter kyseliny s hodnotami pK_a = 7,71 a 7,16. Oxyhemoglobín je teda silnejšia kyselina a táto vlastnosť určuje tlmiacu vlastnosť krvného farbiva.

V pľúcach – hemoglobín sa oxiduje na oxyhemoglobín a uvoľňuje ióny H⁺ (menšia disociácia hemoglobínu v zrovnaní s oxyhemoglobínom bola už vysvetlená), ktoré spolu s iónmi HCO₃⁻ zreagujú na kyselinu uhličitú H₂CO₃, ktorá sa rozloží na H₂O a CO₂, ktoré sa odstránia dýchaním.



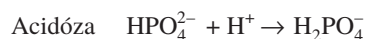
V tkanivách – oxyhemoglobín odovzdá O₂ a je schopný prijať ióny H⁺. Z tkanív do krvi prestupuje oxid uhličitý CO₂, vzniknutý metabolizmom, hydratáciou ktorého vzniká kyselina uhličitá H₂CO₃. Kyselina uhličitá disociuje na H⁺ a HCO₃⁻. Ióny H⁺ sa viažu na hemoglobín. Hemoglobínový systém tvorí 35 % celkovej tlmivej kapacity krvi.



Plazmové bielkoviny – tlmivú schopnosť majú aj niektoré bielkoviny plazmy, ale ich kapacita je pomerne malá. Tvoria sa v pečeni. Viazu na seba ión H⁺. Pri zmenených hodnotách pH sa z bielkovín uvoľňuje ión H⁺ a z bielkovín vznikajú proteínové anióny. Bielkoviny krvnej plazmy sa tak uplatňujú ako významný tlmivý systém, ktorý udržiava stále hodnoty pH krvi.

Fosfátový systém – má menšiu tlmivú schopnosť ako hy-

drogenuhlčitanový systém. Fosfátový systém tvoria dihydrogenfosforečnanové ióny H₂PO₄⁻ (NaH₂PO₄) a hydrogenfosforečnanové ióny HPO₄²⁻ (Na₂HPO₄) v pomere 1:4. Tento systém má veľmi významnú úlohu v intracelulárnej tekutine. Pri prekyslení systému (zníženie hodnoty pH) hydrogenfosforečnanové ióny HPO₄²⁻ sú akceptorom iónov H⁺ za vzniku iónov H₂PO₄⁻. Vzniknutý nadbytok NaH₂PO₄ sa vylúči obličkami. Pri bazicite (zvýšené hodnoty pH) sa pH prostredia upravuje tým, že ióny H₂PO₄⁻ uvoľňujú ióny H⁺ za vzniku iónov HPO₄²⁻.



Porucha acidobázickej rovnováhy sa vyskytuje pri rôznych klinických situáciách, preto medzi základné vyšetrovania akútne chorých pacientov patrí aj stanovenie hodnôt pH, koncentrácie (tlaku) CO₂ a iónov HCO₃⁻ v krvi. Keďže s týmto typom vyšetrovaní sa môžu ziači stretnúť aj v rôznych filmoch, žiadalo by sa, aby vedeli v rámci všeobecného vzdelania niečo aj o vplyve pH krvi na ľudský organizmus. Na doplnenie možno uviesť aj prvú pomoc pri úprave pH krvi v ľudskom organizme. Pri poklese pH pod hodnotu 7,2 sa podáva intravenózne (rýchla úprava pH), alebo perorálne (pomalšia úprava pH) NaHCO₃ (cit.¹¹). Pri alkalóze sa používa chlorid amónny NH₄Cl, ale iba perorálne, intravenózne nie, pre toxicitu NH₄⁺ v krvi. Ióny NH₄⁺ sa po absorpcii z čreva metabolizujú v pečeni na močovinu a HCl znižuje pH (cit.¹¹).

Pri učive o hodnotách pH roztokov je možné považovať nad postupmi pri konzervovaní ovocia a zeleniny. Výsledkom úvah by malo byť poznanie, že v kyslom prostredí sú obmedzené, nevhodné podmienky na rozmnožovanie mikroorganizmov. Aby konzervované ovocie alebo zelenina neplesneli, nekvasili, uchovávali sa v kyslom prostredí. Pri konzervovaní ovocia a zeleniny sa najčastejšie používajú kyselina citrónová (C₆H₈O₇, E 330), jablčná (C₄H₆O₅, E 296), octová (CH₃COOH, E 260) (cit.¹⁵⁻¹⁷). V kyslom prostredí (pH 2,5 až 4,0) sa uplatňuje aj optimálny konzervačný účinok kyseliny benzoovej (C₆H₅COOH, E 210), ako aj kyseliny sorbovej (C₆H₈O₂, E 200) (cit.¹⁷). Uvádzanie označovania kyselín v potravinách má svoje opodstatnenie pri získavaní všeobecného chemického vzdelania.

5. Záver

Ak by sme chceli do časového priestoru vymedzeného vo vyučovacom procese na jednotlivých typoch škôl (základných, stredných) na učivo o pH prostredí vtesnať všetky spomenuté informácie prostredníctvom výkladovej metódy, bolo by to nemožné. Pre učiteľov chémie, ktorí sú flexibilní, kreatívni, iniciatívni, to však taký nere realizovateľný problém nie je, pretože vo vyučovacom procese využívajú aj iné, ako výkladové metódy. Ďalším dôležitým faktorom ovplyvňujúcim kvalitu a kvantitu poskytovaných informácií je skutočnosť, že učiteľ chémie základnej a strednej školy pripravuje žiakov nie len pre vyšší stupeň školy, ale predovšetkým pre život. Preto všetky poskytnuté informácie nemusí žiak vedieť interpretovať presne (skúšanie), predovšetkým má však získať schopnosť správne sa orientovať pri vyhľadávaní, dopĺňaní daných infor-

mácií, na základe vedomostí prehodnocovať informácie poskytované v reklamách, médiách, či sú to informácie tendenčné, neúplné, alebo komplexné, experimentálne overené. Študent má získať trvalú vedomosť, že chémia je súčasťou vedy o prírode, živote.

Keďže zásluhou projektu Infovek sa na Slovensku každoročne zvyšuje počet škôl (základných, stredných) pripojených na Internet, vyučujúci chémie by mal študentov informovať aj o prípadných www stránkach s danou tematikou^{18,19}.

LITERATÚRA

- Adamkovič E.: *Učebné osnovy chémie pre 5. až 9. ročník základnej školy*. MŠ SR, Bratislava 1997.
- Učebné osnovy chémie pre štvorročné gymnázia*. MŠ SR, Bratislava 1997.
- Učebné osnovy chémie pre osemročné gymnázia*. ŠPÚ, Bratislava 1996.
- Adamkovič E.: *Chémia pre 7. ročník základných škôl*. SPN, Bratislava 1993.
- Adamkovič E., Ružičková M., Šramko T.: *Základy chémie pre gymnázia s osemročným štúdiom*. SPN, Bratislava 2000.
- Trojan S.: *Fyziológia 1*. Osveta, Martin 1992.
- Šimek J.: *Čísla o lidském těle a jak jim rozumět*. Victoria Publishing, Praha 1995.
- Ferenčík M., Škarka B.: *Biochémia*. SAP, Bratislava 2000.
- Silný P., Kucharová D.: *Úlohy z chémie pre 8. ročník základných škôl*. Expol pedagogika, Bratislava 2000.
- Melicherčíková D., Melicherčík M.: *Biologicky účinné organické zlúčeniny II*. MC, Banská Bystrica 1996.
- Hulín I.: *Patofyziológia*. SAP, Bratislava 1998.
- Némečková A.: *Lékařská chemie a biochemie*. Avicenum, Praha 1990.
- Keller U., Meier R., Bertoli S.: *Klinická výživa*. Scientia Medica, Praha 1993.
- Racek J.: *Klinická biochemie*. Galén, Praha 1999.
- Šinková T., Kováč M.: *Potravinárske aditívne látky*. VÚP, Bratislava 1995.
- Davídek J., Janíček G., Pokorný J.: *Chemie potravin*. SNTL, Praha 1983.
- Velíšek J.: *Chemie potravin*. OSSIS, Tábor 1999.
- <http://www.infovek.sk>; 20.11.2001.
- <http://www.fpv.umb.sk/~melicher/chemprvky>; 20.11.2001.

D. Melicherčíková^a and M. Melicherčík^b (^aDepartment of Civics and Natural History, Faculty of Pedagogics, ^bDepartment of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Matej Bel University, Banská Bystrica, Slovak Republic): **Human Body and pH of Solutions**

Chemical education is very pronouncedly aimed at accumulation of theoretical knowledge and there is only little effort to acquire skills in using the knowledge for application to problems of everyday life. To make chemical education more topical, pH values in the human digestive tract, urinary system, cardiovascular system and skin are mentioned in teaching pH of solutions.