

## Most přes minulost

Moje paní vypíná rozhlas či televizi pokud je jí moderátorem vnucováno „anoncování performance dýdžeje“ a naskakuje jí husí kůže při sdělení neteře, že jejich „piár oddělení uspořádalo pro VIPy bárbejků párty“. Ani mně tato slovní spojení nezní libě. Snažím se ale být obezřetnější v jejich tvrdém odsudku a to mimo jiné i v souvislosti s oborem chemie, ve kterém se pohybují. Národní jazyk se vyvíjí – a to zřejmě tím rychleji, čím rychleji postupuje globalizace světového společenství a rozvoj technického pokroku.

Jako **spisovná čeština** se obvykle chápe kodifikovaný útvar českého národního jazyka, který má funkci národně reprezentativní a měl by se užívat v úředních dokumentech, v oficiální komunikaci a v médiích (alespoň ve veřejnoprávních). Variantou spisovného jazyka je **hovorová čeština**, která se užívá v neoficiálních mluvených projevech. Za podskupinu hovorového jazyka můžeme považovat **slang**. Technické názvosloví bylo po dlouhou dobu převážně německé a jeho počestění byl významný úkol našeho národního obrození. Původní německé výrazy se pak často dostaly do vrstvy nespisovné a část z nich se stala součástí různých profesních slangů. Jejich znalost bývá považována za znak příslušnosti k dané profesní skupině (jekl, ponk, ráčna, šalunk). Chtěl bych se na chvíli vrátit do oné doby, kdy se vytvářelo české chemické názvosloví a ukázat laskavému čtenáři, že ne každá snaha o vytvoření českého ekvivalentu k cizímu termínu byla úspěšná, ba dokonce, že s odstupem let se toto úsilí může zdát dalším generacím velmi úsměvné.

Významnou osobností buditelské obce poloviny devatenáctého století byl Karel Slavoj Amerling (1807–1884) a letos se patří připomenout 200 let od jeho narození. Byl vzděláním lékař a působením především pedagog. Amerling vybudoval široce koncipovaný vzdělávací ústav s názvem "Budeč" (na podkladě legendy známé z Kosmovy kroniky měl představu, že v Budči existovala již v 10. století latinská škola – považovaná tak za první školu na českém území). Budeč se ve své době stala mimořádně významným střediskem obrozeneckého a vlasteneckého života. Bohužel, neměla dlouhé trvání, protože ústav skončil v konkurzu. Nicméně především Amerlingovou zásluhou byla pak v Praze zřízena první hlavní škola s českým vyučovacím jazykem (vychovávala učitele). Jejím ředitelem byl v roce 1848 jmenován právě MUDr. Karel Slavoj Amerling.

Ve svém působení na poli chemie chtěl navázat na dílo „prvoučitele a otce české chemie“, Jana Svatopluka Presla, který ve spolupráci s Josefem Jungmannem vytvořil první české názvosloví přírodních věd. Toto názvosloví vznikalo pod vlivem tehdejší hovorové češtiny a na základě studia staročeské a jihoslovenské literatury. Amerling se snažil české chemické názvosloví rozvinout a vytvořit zásadní českou učebnici chemie – dílo, které nazval *Lučebné základy hospodářství a řemeslnictví*. K chemii přistupoval jako ke krásnému umění, "jež síly tělesné umí v duševní měniti". Zarytost, s jakou se snažil emancipovat od „všeho

cizáckého, jmenovitě švábského“, vedla k vytvoření podivného, ač domněle čistě národního názvosloví. Jako ukázkou novotvarů, které navrhl, lze prezentovat jeho „rozdělení prvků přírodnické“, se základním pravidlem: „cokoli jest prvek, končí se koncovkou **-ik**, vyjma prvků dávno známých (jako síra, stříbro, železo, zlato, měď)“. Švibíci (nekovy) se podle Amerlinga dělily na řád svěživých neboli svěžíků, švubivých neboli švubíků, trupelivých čili trupelíků, žiravých čili žíříků, náhraživých čili dosadiků atd. Mezi navrženými názvy sloučenin pak nalezneme termíny jako smradavec ( $H_2S$ ), smrt'vodka ( $HCN$ ), železomředník draslikomředivý (žlutá krevní sůl), železitoš ( $FeCl_3$ ), vodičnick čmýžilový (methan). Návrhu na počestění nebyly ušetřeny ani míry a váhy: měrec (metr), stotička (cm), krucha (gram), tisícínuška (miligram) atd. To byla již poněkud silná káva pro obec strážců ryzosti národního jazyka a Karel Ladislav Čelakovský počastoval novátora verši:

Jako tělo pěkné, čisté, má i jazyk meze jisté;  
na to, Amerlingu můj, s pány bratry pamatuj!

Neúspěch projektu "Budeč" a nenadálé nepříznivé přijetí zmíněného díla poznamenalo Amerlinga do konce života a ukončilo i jeho aktivní literární snahy. Všeobecně přijímané se tak stalo až názvosloví vytvořené Vojtěchem Šafaříkem, synem známého buditele Pavla Josefa Šafaříka, v učebnici *Základové chemie čili lučby* (1860). Toto názvosloví na rozdíl od Amerlingova pokusu "našlo ohlasu ve zdravé mysli národa" a stalo se všeobecně akceptovaným. Amerling se na sklonku života (kdy působil jako "ředitel v ústavě idiotů v Praze") zabýval rozsáhlými studii filosofickými (označoval se jako "poustevník hradčanský") neurčenými k veřejnému publikování. K uctění jeho památky byl v roce 1935 učitelskému ústavu v Praze, jehož byl Amerling prvním a dlouholetým ředitelem, propůjčen čestný název Amerlingův státní mužský ústav učitelský.

V současnosti, ač se nám to líbí nebo ne, vývoj jazyka zřejmě směřuje obráceným směrem než je ten, který prosazovali národní buditelé – tedy k jakémusi předbabylónskému uspořádání. Vědecké disciplíny tvoří předvoj této tendence. V oborech, které se v současné době rozvíjejí nejbouřlivěji (např. informační technologie) se nové pojmy do národních jazyků přenášejí z angličtiny často prakticky beze změn, nebo pouze s fonetickou úpravou. Podobné trendy jsou patrné i v chemii. Jedním z úkolů odborných národních časopisů pak patrně bude funkce mostu přes úval mezi jazykem světovým a jazykem národním, úval, který bude v čase mělčí a mělčí...

Poznámka: V úvodníku použité původní citace mají svůj zdroj v sérii článků J. V. Jahna věnovaných památce Karla Slavoje Amerlinga, které vycházely v *Časopisu pro průmysl chemický*, ročník 1892.

Pavel Chuchvalec

## BIOLOGICKÉ SLOŽKY BIOSENZORŮ PRO STANOVENÍ TĚŽKÝCH KOVŮ

PAVEL VOPÁLENSKÝ, TOMÁŠ RUML  
a PAVEL KOTRBA

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-  
technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6  
pavel.kotrba@vscht.cz

Došlo 4.1.07, přijato 25.1.07.

---

Klíčová slova: proteinový biosenzor, imunochemický biosenzor, aptazym, buněčný biosenzor, transkripční regulátor, reportérový gen

---

### Obsah

1. Úvod
2. Proteinové biosenzory
  - 2.1. Biosenzory založené na inaktivaci enzymů
  - 2.2. Biosenzory založené na aktivaci enzymů
  - 2.3. Biosenzory založené na neenzymových proteinech
  - 2.4. Imunochemické biosenzory
3. Biosenzory využívající aptazymy (a aptamery)
4. Buněčné biosenzory
  - 4.1. Reportérové geny a proteiny
  - 4.2. Nespecifické buněčné biosenzory
  - 4.3. Specifické buněčné biosenzory
5. Závěr

### 1. Úvod

Biosenzory jsou definovány jako zařízení využívající specifické biochemické reakce zprostředkované izolovanými enzymy, imunosystémy, tkáněmi, organelami nebo celými buňkami k detekci chemické látky, nejčastěji měřením elektrického, tepelného nebo optického signálu<sup>1</sup>, které se provádí pomocí vhodného fyzikálně-chemického snímače. Mezi vyjmenované biologické elementy je nutno zařadit i neenzymové proteiny a nukleové kyseliny, které jsou dnes pro konstrukci biosenzorů neméně významné. Zatímco biologická složka interaguje s analytem a tak přímo určuje specifitu biosenzoru, je citlivost biosenzoru vedle vlastností biologického prvku dána především druhou komponentou biosenzoru, snímačem, a závisí na způsobu převodu signálu a jeho detekce. Používání principy a instrumentacemi snímačů a technikami imobilizace biologického prvku se zabývá několik aktuálních přehledných článků<sup>2–7</sup>. V ideálním případě je biosenzor vysoce specifický k určitému analytu, někdy ke skupině analytů stejné

povahy, a umožňuje tak stanovení i v komplexních maticích, jako jsou klinické vzorky, (odpadní) vody, půda nebo sedimenty. Dalšími výhodami jsou nízké detekční limity, rychlá odezva, opakovatelnost a reprodukovatelnost. Určitými nevýhodami, které přináší využití biologického elementu, jsou omezené podmínky při stanovení (pH, teplota) a v případě proteinů nutnost jejich izolace a někdy i nízká stabilita.

Následující přehled je zaměřen na biologické prvky biosenzorů pro detekci těžkých kovů. Klasické instrumentální metody používané pro stanovení polutantů v životním prostředí, ač velmi propracované a poskytující přesné výsledky, jsou většinou finančně a časově náročné, vyžadují vysoce kvalifikovanou práci a jsou vesměs vázány na laboratorní prostředí. Těmito metodami je navíc určena celková koncentrace látek ve vzorku (např. i nerozpustných forem těžkých kovů), která však nemusí vypovídat o jejich reálném dopadu na životní prostředí a potenciálním nebezpečí pro ekosystém daném především biodostupností kovu. S ohledem na celosvětové zpříšňování legislativy v oblasti životního prostředí je stále větší důraz kladen na použití levných, snadno proveditelných, dostatečně spolehlivých a rychlých metod stanovení s možností sledovat změny koncentrace analytu v reálném čase a *in situ*. Metody genového inženýrství a miniaturizace umožňují vývoj přenosných biosenzorů, které poskytují rychlé, spolehlivé a vysoce specifické stanovení látek srovnatelné s konvenčními metodami. Velkou výhodou, zejména tzv. (celo)buněčných biosenzorů, je možnost postihnout skutečný účinek iontu kovu nebo jiné látky v prostředí na organismy. Některé buněčné biosenzory dále umožňují sledovat celkový vliv daného prostředí – vliv všech přítomných látek na organismus, jejichž synergický účinek se může značně lišit od vlivu každé jednotlivé látky.

### 2. Proteinové biosenzory

#### 2.1. Biosenzory založené na inaktivaci enzymů

V úvodu této kapitoly je třeba předeslat, že ačkoliv byl inhibiční účinek těžkých kovů, založený především na jejich interakci s thiolovými a methylthiolovými skupinami enzymů<sup>8</sup>, využit pro konstrukci řady biosenzorů, jejich praktické použití je omezeno nepřilíživou vysokou specifičností<sup>9</sup>. Důležité charakteristiky vybraných biosenzorů této skupiny uvádí tabulka I. Mezi prvními enzymy použitými pro přípravu biosenzorů pro těžké kovy byly oxidasy a dehydrogenasy, jejichž aktivitu lze přímo, nebo s využitím spážených reakcí, monitorovat amperometricky měřením úbytku kyslíku z reakční směsi. Biosenzory založené na inhibici L-glycerolfosfát oxidasy, pyruvát oxidasy a nebo

Tabulka I  
Enzymové biosenzory

Enzym	Analyt	Detekce	Dynamický rozsah/ detekční limit (DL)/ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> [μmol l <sup>-1</sup> ]	Lit.
Alkalická fosfatasa <sup>b</sup>	Zn <sup>2+</sup>	amperometrická	2–200	20
	Co <sup>2+</sup>		50–1000	
Askorbát oxidasa <sup>b</sup>	Zn <sup>2+</sup>	kalorimetrická	10–1000	22
	Cu <sup>2+</sup>	amperometrická	2–100	21
Galaktosa oxidasa <sup>b</sup>	Cu <sup>2+</sup>		50–1000	20
	Cu <sup>2+</sup>	amperometrická	10–1000	19
Glycerolfosfát oxidasa <sup>c</sup>	Hg <sup>2+</sup>	amperometrická	IC <sub>50</sub> = 20	10
Křenová peroxidasa <sup>c</sup>	Hg <sup>2+</sup>	kolorimetrická	5·10 <sup>-6</sup> –0,005	17
	CH <sub>3</sub> -Hg <sup>+</sup>		0,02–1000	18
L-Laktát dehydrogenasa <sup>c</sup> spřažená s L-laktát oxidasou	Ag <sup>+</sup>	amperometrická	IC <sub>50</sub> = 0,1	10
	Cd <sup>2+</sup>		IC <sub>50</sub> = 10	
	Cu <sup>2+</sup>		IC <sub>50</sub> = 250	
	Hg <sup>2+</sup>		IC <sub>50</sub> = 1	
	Pb <sup>2+</sup>		IC <sub>50</sub> = 50	
	Zn <sup>2+</sup>		IC <sub>50</sub> = 10	
	Ag <sup>+</sup>	amperometrická	DL = 0,02	11
	Cu <sup>2+</sup>		DL = 0,5	
	Hg <sup>2+</sup>		DL = 0,002	
	Pb <sup>2+</sup>		DL = 0,2	
Pyruvát oxidasa <sup>c</sup>	Zn <sup>2+</sup>		DL = 5	
	Hg <sup>2+</sup>	amperometrická	IC <sub>50</sub> = 50	10
Ureasa <sup>c</sup>	Ag <sup>+</sup>	potenciometrická	0,1–100	12
	Cu <sup>2+</sup>		0,1–100	
	Ag <sup>+</sup>	spektrofotometrická	DL = 0,20	15
	Cu <sup>2+</sup>		DL = 4,0	
	Hg <sup>2+</sup>		DL = 0,35	
	Hg <sup>2+</sup>	potenciometrická	0,09–2,0	13
Ureasa <sup>c</sup> spřažená s glutamát dehydrogenasou	Hg <sup>2+</sup>	potenciometrická	0,05–1,0	8
	Cd <sup>2+</sup>	amperometrická	9–270	14
	Cu <sup>2+</sup>		0,15–1,5–	
	Hg <sup>2+</sup>		0,05–0,5	
	Zn <sup>2+</sup>		15–450	

<sup>a</sup> Koncentrace kovu inhibující aktivitu enzymu z 50 %, <sup>b</sup> aktivace analytem, <sup>c</sup> inhibice analytem

L-laktát dehydrogenasy ionty těžkých kovů v reakcích s přirozenými substráty byly konstruovány pokrytím povrchu kyslíkového článku polysulfonovou membránou s imobilizovanými enzymy<sup>10,11</sup>. Pro spřažení redukce pyruvátu na L-laktát s reakcí spotřebovávající kyslík byla

spolu s laktát dehydrogenasou na membráně imobilizována L-laktát oxidasa, která těžkými kovy inhibována není, a která zpětně oxiduje laktát na pyruvát. Uvedené enzymové elektrody v kombinaci s vhodnými reakčními pufrými umožňují s jistou mírou selektivity detekci Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>,

Tabulka II  
 Neenzymové proteinové a DNA biosenzory

Biologická komponenta	Analyt	Detekce	Dynamický rozsah/detekční limit (DL)/ [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	Lit.
Protein DsRed	$\text{Cu}^{2+}$	fluorimetrie	0,1–2,5	34
	$\text{Cu}^+$		0,09–2,3	
Protein BFPms1	$\text{Zn}^{2+}$	fluorimetrie	neuvedeno	33
	$\text{Cu}^{2+}$		neuvedeno	
Protein MerR	$\text{Hg}^{2+}$	kapacitance	$10^{-9}$ – $10^3$	28
	$\text{Cd}^{2+}$		$10^{-9}$ – $10^3$	
	$\text{Cu}^{2+}$		$10^{-9}$ – $10^3$	
Metalothionein SmtA	$\text{Cd}^{2+}$	kapacitance	$10^{-9}$ – $10^3$	28
	$\text{Cu}^{2+}$		$10^{-9}$ – $10^3$	
	$\text{Hg}^{2+}$		$10^{-9}$ – $10^3$	
	$\text{Zn}^{2+}$		$10^{-9}$ – $10^3$	
Fytochelatin „EC20“	$\text{Cd}^{2+}$	kapacitance	$10^{-7}$ – $10^4$	29
	$\text{Cu}^{2+}$		$10^{-7}$ – $10^4$	
	$\text{Hg}^{2+}$		$10^{-7}$ – $10^4$	
	$\text{Pb}^{2+}$		$10^{-7}$ – $10^4$	
	$\text{Zn}^{2+}$		$10^{-7}$ – $10^4$	
Savčí metalothionein	$\text{Cd}^{2+}$	rezonance povrchového plasmonu (SRP)	2–1000	30
	$\text{Ni}^{2+}$		20–100	
	$\text{Zn}^{2+}$		20–100	
Protilátka 2A81G5	$\text{Cd}^{2+}$	ELISA/spektrofotometrie	DL= $2,5 \cdot 10^{-4}$	37
	$\text{Hg}^{2+}$		DL= 0,01	36
Protilátka 15B4	$\text{Co}^{2+}$	ELISA/spektrofotometrie	DL= 0,01	37
	$\text{Ni}^{2+}$		DL= 0,8	36
Protilátka 2C12	$\text{Pb}^{2+}$	ELISA/spektrofotometrie	DL= 0,006	37
protein CueR/operátor	$\text{Ag}^+$	fluorimetrie	DL= 0,2 <sup>a</sup>	32
	$\text{Au}^+$		DL= 0,2 <sup>a</sup>	
	$\text{Cu}^{2+}$		DL= 0,2 <sup>a</sup>	
Protein MerR/operátor	$\text{Hg}^{2+}$	fluorimetrie	DL= 0,5 <sup>a</sup>	32
DNA aptazym „8–17“	$\text{Pb}^{2+}$	fluorimetrie	0,01–4,0	42

<sup>a</sup> Aplikace tohoto biologického prvku byla demonstrována pouze při uvedené koncentraci a skutečný DL nebyl evaluován

$\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Pb}^{2+}$  a elektrody lze po regeneraci opakovaně použít.

Nejčastěji studovaným enzymem pro stanovení  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  je ureasa katalyzující hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak, jehož vznik lze snadno detegovat potenciometricky pomocí pH elektrody<sup>12,13</sup>. Nevýhody spojené s měřením pH v reálných vzorcích, které mohou mít různou pufrovací kapacitu, byly eliminovány sprážením ureasové reakce s reakcí katalyzovanou

glutamátdehydrogenasou, v níž z amoniaku a  $\alpha$ -keto-glutarátu za spoluúčasti NADH jako donoru vodíkového ekvivalentu vzniká L-glutamát. Oxidace NADH pak byla monitorována amperometricky<sup>14</sup>. Jednoduchý biosenzor „na jedno použití“ pro stanovení  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  založený na inhibici ureasové reakce byl připraven potažením stěn polystyrenové kyvety membránou obsahující ionofory selektivní pro amonné ionty, amoniak nebo protony<sup>15</sup>. Koncentrace amoniaku vznikajícího při reakci v kyvetě

pak byla stanovována na základě změn barvy, fluorescence nebo refrakce světla na iontově selektivní membráně. Nam a spol.<sup>16</sup> ukázali, že selektivitu biosenzoru založeného na urease (autoři použili instrumentaci s iontově selektivní elektrodou) lze zajistit přidávkem NaI pro potlačení inhibice  $\text{Ag}^+$  a EDTA pro eliminaci  $\text{Cu}^{2+}$ .

Dalším enzymem využitelným pro inhibiční stanovení  $\text{Hg}^{2+}$  a organortuťnatých sloučenin je křenová peroxidasa<sup>17,18</sup>. Tento enzym byl imobilizován na chitosan, polystyren nebo chromatografický papír a jeho aktivita byla stanovována spektrofotometricky jako rychlost oxidace chromogenních substrátů  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 2.2. Biosenzory založené na aktivaci enzymů

Skutečností, že některé těžké kovy jsou nepostradatelnou součástí aktivního místa enzymů a že tyto enzymy jsou pro daný kov často vysoce specifické, využívají biosenzory založené na aktivaci metaloenzymů (tab. II). Pro stanovení  $\text{Cu}^{2+}$  byl popsán biosenzor využívající apofornu galaktosaoxidasy<sup>19</sup> katalyzující oxidaci D-galaktosy kyslíkem na D-galaktohexodialdosu za produkce  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aktivita tohoto enzymu v závislosti na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  byla stanovována amperometricky. Další biosenzor s amperometrickou instrumentací, který umožňuje stanovení  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$ , byl konstruován imobilizací alkalické fosfatasy (kofaktor  $\text{Zn}^{2+}$ ) a askorbát oxidasy (kofaktor  $\text{Cu}^{2+}$ ) na polyakrylonitrolové membráně na povrchu kyslíkového článku<sup>20,21</sup>. Enzymy katalyzují spážené reakce, v nichž alkalická fosfatasa defosforyluje L-askorbát-2-fosfát a vzniklý L-askorbát je oxidován kyslíkem za katalýzy askorbát oxidasou na dehydroaskorbát. Přidáním L-askorbát-2-fosfátu,  $\text{Cu}^{2+}$  a analytu k apoenzymům je tak možno stanovit množství  $\text{Zn}^{2+}$  a přidáním L-askorbátu lze v analytu stanovit množství  $\text{Cu}^{2+}$ . Ke stanovení  $\text{Zn}^{2+}$  prostřednictvím aktivace alkalické fosfatasy byla popsána též kalorimetrická instrumentace<sup>22</sup>, neboť katalyzovaná reakce má exotermické tepelné zabarvení. Sensory založené na aktivaci alkalické fosfatasy je teoreticky možno použít i pro stanovení  $\text{Co}^{2+}$ , který v porovnání se  $\text{Zn}^{2+}$  aktivuje alkalickou fosfatasu v 3–5× menší míře<sup>20,22</sup>.

Jistou nevýhodou pro posuzování praktické využitelnosti tohoto typu enzymových biosenzorů pro stanovení těžkých kovů je skutečnost, že autoři nepopisují vliv jiných kovů, často přítomných v reálných vzorcích (např.  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  nebo  $\text{Hg}^{2+}$ ). Ty mohou svými případnými inhibičními účinky zkreslovat výsledky stanovení cílových analytů. Skutečností zůstává, že širší aplikace se dočkaly pouze enzymové biosenzory pro stanovení organických analytů – přirozených substrátů enzymů<sup>2</sup>.

## 2.3. Biosenzory založené na neenzymových proteinech

S ohledem na vysokou afinitu a případně i selektivitu k iontům těžkých kovů našly některé peptidy a proteiny produkované organismy v odezvě na intoxikaci těžkými

kovy uplatnění i v oblasti konstrukce biosenzorů. Metalothioneiny (MT) jsou skupinou 6 kDa intracelulárních peptidů s vysokým obsahem cysteinových zbytků, které imobilizují ionty těžkých kovů s vysokou afinitou ve formě tetrathiolátových komplexů a eliminují tak jejich cytotoxický účinek<sup>23,24</sup>. Podobnou funkci plní v rostlinách a některých kvasinkách fytochelatiny (PC), enzymově syntetizované peptidy obsahující 2–11 tandemových opakování dipeptidu, v němž je Glu spojena s Cys peptidovou vazbou prostřednictvím svého  $\gamma$ -karboxylu<sup>24,25</sup>. Rezistence řady prokaryot k těžkým kovům je založena na enzymech a iontových pumpách umožňujících účinnou detoxikaci nebo exkreci kovů<sup>26,27</sup>. Expresi odpovídajících genů kontrolují transkripční regulátory, jejichž aktivita je závislá na poměrně specifické vazbě daného iontu kovu. Vybrané vlastnosti biosenzorů využívajících neenzymové proteiny jsou shrnuty v tabulce II.

Imobilizací produktu rekombinantní fúze metalothioneinu SmtA ze sinice *Synechococcus* PCC 7942 s glutathion-S-transferasou a nebo regulátoru operonu rtuťové rezistence – proteinu MerR na povrchu zlaté elektrody byly připraveny biosenzory umožňující stanovení  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  s velice nízkým detekčním limitem na femtomolární úrovni a neobvykle širokým dynamickým rozsahem do  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>28</sup>). Vlastní stanovení je založeno na měření změn kapacitance na povrchu elektrody vyvolaných konformační změnou imobilizovaných peptidů po navázání iontu kovu. Stejně uspořádání bylo použito i pro přípravu biosenzoru využívajícího analogu PC s 20 opakováními Glu-Cys spojených  $\alpha$ -peptidovou vazbou<sup>29</sup>. Tento biosenzor se vyznačoval také velmi dobrou citlivostí a širokým dynamickým rozsahem pro stanovení  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  ( $100 \text{ fmol l}^{-1}$  až  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ). Popsán byl i biosenzor testovaný pro stanovení  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Ni}^{2+}$ , jehož biologickým elementem byl králičí MT imobilizovaný na zlaté nanovrstvě<sup>30</sup>, kde pro detekci konformačních změn spojených s vazbou kovu byla využita optická metoda rezonance povrchového plasmonu (SRP, z angl. „Surface Plasmon Resonance“). Ačkoliv v případě použití proteinu MerR bylo dosaženo vyšší selektivity vůči  $\text{Hg}^{2+}$ , nevýhodou výše popsáných biosenzorů zůstává jejich nízká specifita k jednotlivým iontům kovů.

S ohledem na specifitu se jako zajímavý přístup jeví konstrukce biosenzorů založených na interakci transkripčního regulátoru aktivovaného ionty kovů s jeho operátorem v oblasti *in vitro*. Transkripční regulátory rodiny MerR proteinů se ve formě dimeru v nepřítomnosti kovu váží na příslušnou regulační oblast DNA a po navázání kovu prochází konformační změnou, rozplétají dvojšroubovici a ruší vodíkové vazby mezi dvěma páry bází v centrální oblasti operátoru<sup>31</sup>. Náhradou jedné z těchto bází fluoreskujícím analogem cytosinu, pyrrolo-C, v operátorové oblasti rozpoznávané transkripčním proteinovým regulátorem CueR nebo MerR připravili Chen a He<sup>32</sup> biosenzor s poměrně výraznou selektivitou vůči  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Au}^+$  nebo  $\text{Hg}^{2+}$ . Zatímco v nepřítomnosti těchto iontů je v komplexu regulátor-DNA fluorescence pyrrolo-C zhasena tvorbou vodíkových můstků a vlivem patrových interakcí se sou-

sedními bazemi, dochází po rozrušení dvojšroubovice působením regulátoru s navázaným analytem k uvolnění fluorochromu a k zesílení fluorescenčního signálu. V případě senzoru založeného na využití regulátoru CueR byla fluorescenční odezva 200× vyšší s  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Au}^+$  než s  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ . Při stanovení pomocí MerR senzoru nejvýznamněji interferovala přítomnost  $\text{Cd}^{2+}$ , který však indukovanou fluorescenční odezvu se 100× nižší účinností než  $\text{Hg}^{2+}$ .

V poslední době se jako slibné biologické prvky pro konstrukci biosenzorů ukazují proteiny přirozeně vykazující fluorescenci. Ty mohou být využity pro velmi jednoduché metody stanovení v případě, že při interakci s analytem dochází ke změně fluorescenčních vlastností. Mutacemi zeleného fluoreskujícího proteinu (GFP) původně izolovaného z medúzy *Aequorea victoria* byl získán protein BFPms1, jehož fluorescence byla v přítomnosti  $\text{Zn}^{2+}$  zesílena a přítomnost  $\text{Cu}^{2+}$  způsobovala zhášení a posun fluorescenčního spektra<sup>33</sup>. Nedávno byl z tropického korálu *Discosoma* izolován červený fluoreskující protein (DsRed), jehož fluorescence je selektivně zhášena  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  ionty<sup>34</sup>.

#### 2.4. Imunochemické biosenzory

Metody využívající protilátek jako biologického prvku jsou rychlé, nenákladné, jednoduché a často umožňují konstrukci přenosných zařízení. Při kontrole kvality životního prostředí byly úspěšně použity imunochemické metody pro stanovení pesticidů a halogenovaných aromátů a teoreticky se dají využít vždy, je-li možno připravit protilátku proti danému analytu. Popsány byly protilátky proti komplexu  $\text{Hg}^{2+}$  iontů s glutathionem<sup>35</sup>. Výhodnější přístup je použití protilátek proti kovu vázanému organickými chelatačními činidly používanými k extrakci kovu z matrice vzorku. Takové protilátky by neměly vázat volné chelatační činidlo, které je používáno pro extrakci kovu ve velkém nadbytku, a jejich afinita ke komplexu jiného kovu by měla být alespoň 10× menší než k analyzovanému kovu. Těmito parametry do značné míry odpovídají monoklonální protilátky připravené Blakovou a spol. pro stanovení komplexů EDTA, diethylenetriaminpentaocetové kyseliny (DTPA) a jejich derivátů s  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Co}^{2+}$  metodou kompetitivní ELISA (cit.<sup>36,37</sup>).

### 3. Biosenzory využívající aptazymy (a aptamery)

Aptamery (z lat. „aptare“ – přizpůsobovat) jsou molekuly DNA nebo RNA schopné, podobně jako protilátky, velmi specificky vázat určitý ligand<sup>38</sup>. Aptazymy navíc vykazují v přítomnosti daného ligandu, který často plní funkci kofaktoru, enzymovou (fosfoesterasovou) aktivitu<sup>39</sup> a doplňují tak skupinu dosud popsaných biokatalytických molekul – enzymů a ribozymů<sup>40</sup>. Přirozený výskyt molekul DNA s enzymovou aktivitou však dosud nebyl zazna-

menán.

DNA aptazymy (a podobně i RNA aptazymy) jsou připravovány uměle procesem tzv. *in vitro* selekce, která je založena na postupném nabohacení souboru molekul jednořetězcových DNA zástupci s vhodnými vlastnostmi<sup>41,42</sup>. Vychází se z knihovny (přibližně  $10^{15}$  molekul) syntetických oligonukleotidů, obsahujících na 5' a 3' konci definované úseky, mezi které je vložena nahodilá sekvence 30 až 50 nukleotidů. Definované úseky jsou shodné pro všechny molekuly a umožňují pomnožení molekul s požadovanými vlastnostmi pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro selekci DNA aptazymu s fosfoesterasovou aktivitou je knihovna nejprve pomnožena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Jeden z oligonukleotidů sloužících jako primery v PCR obsahuje ve své sekvenci ribonukleotid a je na 5' konci modifikován kovalentně navázaným biotinem (obr. 1a). Fosfodiesterová vazba mezi deoxyribonukleotidem a ribonukleotidem je díky 2' hydroxylu ribosy nejnáchylnější ke štěpení<sup>41</sup>. Biotin umožňuje nekovalentní zachycení produktů PCR (dvojřetězcová DNA) na koloně s navázaným streptavidinem. Po odstranění nebiotinylovaného komplementárního vlákna (přerušením vodíkových vazeb mezi bazemi v alkalickém prostředí) zaujme navázané vlákno konformaci určenou převážně náhodnou sekvencí variabilního 30 až 50ti nukleotidového úseku a vznikajícími vodíkovými vazbami mezi bazemi. Následně je na kolonu aplikován roztok ligandu (kofaktoru) a zástupci knihovny katalyzující štěpení fosfodiesterové vazby mezi ribonukleotidem a deoxyribonukleotidem pouze za účasti tohoto ligandu (kofaktoru) jsou z kolony eluovány. Takto získané molekuly jsou amplifikovány pomocí PCR (znovu je tak připojen biotinylovaný primer s ribonukleotidem) a postup se opakuje se sníženou koncentrací kofaktoru. Po 6–8 cyklech jsou získány molekuly štěpící fosfoesterovou vazbu i v přítomnosti stopové koncentrace kofaktoru. Účinnost selekce aptazymu specifického k jedinému kofaktoru lze zvýšit negativní selekcí, kdy před elucí pomocí cílového ligandu je na kolonu aplikován roztok příbuzných látek a dojde tak k odštěpení aptazymů vykazujících skupinovou selektivitu.

Aplikaci spojující vysokou selektivitu aptazymu s vysokou senzitivitou fluorescenčního stanovení u biosenzoru pro stanovení  $\text{Pb}^{2+}$  popsali Lu a spol.<sup>42</sup>. Na základě analýzy sekundární struktury katalytického centra aptazymu získaného výše uvedeným způsobem autoři rozdělili jeho nukleotidovou sekvenci na substrátové vlákno s fluorochromem 6-karboxytetramethylrhodaminem (TAMRA) na 5' konci a na katalytické vlákno modifikované na 3' konci zhášečem fluorescence 4-(4'-dimethylamino-fenylazo)benzoovou kyselinou (Dabcyl). V nepřítomnosti  $\text{Pb}^{2+}$  jsou díky hybridizaci obou vláken molekuly TAMRA a Dabcyl v těsné blízkosti a fluorescence je účinně zhášena (obr. 1b). Po navázání  $\text{Pb}^{2+}$  v katalytickém centru je v substrátovém vláknu štěpena fosfodiesterová vazba mezi deoxyribo- a ribonukleotidem, dojde k disociaci odštěpené části s TAMRA a zvýšení intenzity fluorescence. Díky zařazení kroku negativní selekce při izolaci aptazymu ten-

to biosenzor neposkytoval signál v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ .

Aptamery jsou podobně jako aptazymy získávány *in vitro* selekcí z knihovny oligonukleotidů založené především na zachycení aptazymu na nosiči s imobilizovaným ligandem. Doposud byly popsány aptamery selektivně vážící různé skupiny látek jako organická barviva, aminokyseliny, antibiotika, peptidy a proteiny<sup>43</sup>, nicméně principiálně je možno izolovat i aptamery specifické vůči iontu kovu nebo jeho komplexu s chelatačním činidlem. Aptamery, jejichž řetězce jsou značeny fluorochromem, umožňují konstrukci biosenzorů využívajících skutečnosti, že po interakci s ligandem prochází aptamer konformační změnou, která se projeví změnou chemického prostředí molekuly fluorochromu. Tu je možno zaznamenat jako změnu v intenzitě, vlnové délce nebo anisotropii fluorescence<sup>44</sup>.

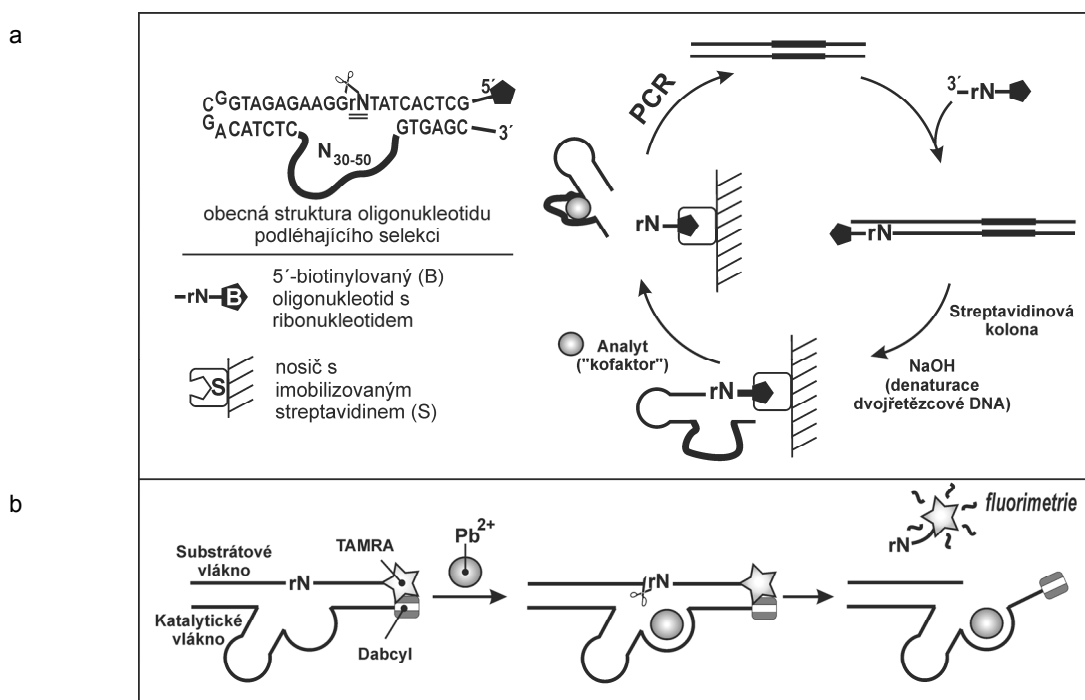
#### 4. Buněčné biosenzory

V porovnání s proteinovými biosenzory a aptazymy umožňují buněčné biosenzory odlišný analytický přístup. Díky použití celých buněk jsou postihnutele komplexní parametry jako biologická dostupnost, toxicita a genotoxicita, které mají v oblasti sledování kvality životního prostředí zásadní význam<sup>45</sup>. Další výhody buněčných biosenzorů v porovnání s proteinovými spočívají v jejich nižší

ekonomické náročnosti, neboť nejsou nutné složité izolační a purifikační kroky sensorových biomolekul a kofaktory jsou enzymům dodávány samotnou buňkou<sup>46</sup>. Fyziologické prostředí uvnitř buňky dále zajišťuje optimální reakční podmínky a do jisté míry pufruje změny vnějšího prostředí, což přispívá k vyšší stabilitě biosenzoru<sup>47</sup>. Díky přítomnosti mnoha metabolických drah mohou v živé buňce probíhat víceokrové přeměny nezbytné pro stanovení některých analytů<sup>2</sup>. Použití živých buněk dále poskytuje možnost „pomnožení“ a částečné regenerace biosenzoru kultivací ve vhodném médiu<sup>47</sup>. Jisté nevýhody buněčných biosenzorů spočívají v delší době odezvy, která je nejvíce limitována transportem analytu do cytoplasmy<sup>48</sup>.

Při konstrukci buněčných biosenzorů pro sledování kvality životního prostředí jsou nejčastěji používány jednobuněčné mikroorganismy, zejména bakterie. Hlavními důvody jsou jejich rychlý růst, vysoký stupeň poznání buněčných mechanismů a pokročilé techniky genových manipulací, které umožňují cílenou konstrukci buněk citlivých k požadovanému analytu<sup>45</sup>. Při výběru bakteriálního kmene pro aplikaci v oblasti biosenzorů je třeba zohlednit jejich přirozené prostředí. Nejvyužívanější laboratorní kmeny *Escherichia coli* nejsou přirozené organismy vnějšího životního prostředí a vhodnější alternativou pro environmentální aplikace jsou proto např. bakterie rodu *Pseudomonas*<sup>49</sup> nebo *Ralstonia*<sup>50</sup>.

Metody stanovení těžkých kovů pomocí buněčných



Obr. 1. Schematické znázornění selekce DNA aptazymu (1a) a aptazym pro stanovení  $\text{Pb}^{2+}$  nazvaný „8-17“ (1b); postup při selekci aptazymu a princip využití aptazymu „8-17“ jsou detailně popsány v textu.  $\text{N}_{30-50}$  - nahodilá sekvence deoxyribonukleotidů podléhající selekci, rN - ribonukleotid, TAMRA - fluorochrom, Dabcyl - zhášec fluorescence

biosenzorů vycházejí ze dvou základních přístupů. První je založen na toxickém účinku těžkých kovů na organismy, kdy je detegována snížená biologická aktivita organismů, nebo jejich odpověď na stres. Druhý přístup využívá interakci těžkého kovu se specifickým rozpoznávacím prvkem, nejčastěji regulačním proteinem, který v závislosti na přítomnosti analytu působí jako aktivátor nebo represor exprese tzv. reportérových genů.

#### 4.1. Reportérové geny a proteiny

Reportérový gen může být definován jako gen, jehož exprese vytváří měřitelný signál snadno odlišitelný od pozadí<sup>49,51–53</sup>. Produkt reportérového genu (reportérový protein) má buď vlastnosti, které jsou detegovatelné přímo (např. fluoreskující proteiny), nebo katalyzuje biochemickou reakci produkující signál. Povaha produktu reportérového genu, metody jeho stanovení a použité detekční zařízení určují senzitivitu systému<sup>51</sup>. Při výběru reportérového genu pro konstrukci biosenzorů je zapotřebí splnit následující požadavky: *i*) projev reportérového genu musí být snadno odlišitelný od projevů ostatních buněčných proteinů, *ii*) detekce produktu reportérového genu by měla být dostatečně rychlá a citlivá a *iii*) produkovaný signál by neměl být rušen maticí měřeného vzorku. V následujícím textu jsou představeny reportérové proteiny použité při konstrukci biosenzorů pro těžké kovy. Obsáhlý přehled reportérových genů pro různé aplikace uvádí Dauert a spol.<sup>54</sup>.

##### $\beta$ -Galaktosidasa

Plní-li  $\beta$ -galaktosidasa kódovaná genem *lacZ* (cit.<sup>55</sup>) funkci reportérového proteinu, používají se k jejímu stanovení deriváty  $\beta$ -galaktosidů, které umožňují spektrofotometrické (např. *o*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid, ONPG), fluorimetrické (fluorescein di- $\beta$ -D-galaktopyranosid, FDG)<sup>56</sup> nebo bioluminescenční (3-{4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-tricyklo-(3.3.1.1.<sup>3,7</sup>)]dekan-4-yl}fenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid, AMPGD)<sup>47</sup> stanovení produktů hydrolyzy. Tato stanovení vyžadují permeabilizaci nebo lyzi buněk. Pro stanovení  $\beta$ -galaktosidasové aktivity v neporušených buňkách byl vyvinut alternativní substrát (*p*-aminofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid) umožňující amperometrické stanovení uvolněného *p*-aminofenolu jeho oxidací na iminochinon<sup>57</sup>.

##### Zelený fluoreskující protein (GFP)

GFP kodovaný genem *gfp* tvoří monomer vykazující po ozáření světlem o vlnové délce 395 nm fluorescenci s maximem při 508 nm. Fluorescence je způsobena přítomností vnitřního fluoroforu, který vzniká posttranslační cyklizací a oxidací tří aminokyselinových zbytků<sup>58</sup>. Veliké výhody GFP jako reportérového proteinu spočívají v jeho vysoké stabilitě a schopnosti autofluorescence, díky níž nevyžaduje stanovení přísadek vnějšího substrátu<sup>59</sup>. Fluoreskující proteiny s pozměněnými spektrálními vlastnostmi byly získány pomocí řízené mutagenese genu *gfp* nebo

izolací proteinů z dalších organismů<sup>60</sup>. Detekce a kvantifikace fluoreskujících proteinů se provádí pomocí fluorimetru, fotonásobiče nebo zařízení s vázaným nábojem (CCD z angl. „Charge-Coupled Device“)<sup>61</sup>.

##### Luciferasa

Luciferasy (z lat. „lux“ – světlo, „ferrare“ – nosit) jsou bakteriální nebo eukaryotní enzymy, jejichž katalytickou činností vzniká viditelné světlo. Luciferasy poskytují rychlejší odezvu a vyšší senzitivitu<sup>58</sup> než fluoreskující proteiny, neboť je měřena enzymová aktivita, nikoliv pouze množství proteinu. Geny pro bakteriální FMNH<sub>2</sub>-dependentní luciferasu byly nalezeny v několika rodech bakterií (např. *Vibrio*, *Photobacterium*)<sup>62</sup>. Enzym se skládá ze dvou podjednotek kódovaných geny *luxAB* a katalyzuje oxidaci alifatického (C<sub>10–15</sub>) aldehydu (bakteriální luciferin) na příslušnou mastnou kyselinu za současného uvolnění světla<sup>63</sup>. Při stanovení aktivity samotné bakteriální luciferasy je nutné dodávat luciferin exogenně, proto se častěji jako reportéru využívá celá kazeta obsahující geny *luxC-DABE*, kde geny *luxCDE* kódují enzymový komplex zodpovědný za syntézu a recyklaci substrátu uvnitř buňky, přičemž další substráty – kyslík a kofaktor – jsou za aerobních podmínek v bakteriích přítomny v dostatečném množství<sup>64</sup>.

Nejčastěji používané eukaryotní luciferasy jsou kódovány genem *lucFF* (izolován z *Photinus pyralis*) nebo *lucGR* (izolován z *Pyrophorus plagiophthalmus*). Aktivní forma enzymu se skládá z jedné podjednotky a v přítomnosti kyslíku, Mg<sup>2+</sup> a ATP katalyzuje oxidaci benzothiazolového luciferinu za vzniku světla<sup>65,66</sup>. Ve srovnání s bakteriální luciferasou poskytuje eukaryotická luciferasa díky vysokému kvantovému výtěžku vyšší citlivost stanovení<sup>67</sup>.

Aktivita luciferasy se stanovuje v buněčném lysátu nebo v celých buňkách po přidavku substrátů. Při použití kazety *luxCDABE* lze sledovat v neporušených buňkách změny luciferasové aktivity v čase. Detekci lze provádět pomocí fotografického filmu, scintilačního počítáče, nebo luminometru, novější metody využívají i optická vlákna nebo CCD prvky<sup>67</sup>. Jistou nevýhodou obou typů luciferasy je jejich nízká tepelná stabilita<sup>64,68</sup>.

#### 4.2. Nespecifické buněčné biosenzory

Pro kontrolu kvality životního prostředí často není důležité, které konkrétní toxické látky jsou ve vzorku přítomny, nýbrž jaká je jeho toxicita celková<sup>45</sup>. Popsané buněčné biosenzory pro stanovení celkové toxicity lze rozdělit do dvou skupin:

##### Přirozené buněčné biosenzory

U tohoto typu biosenzorů způsobuje celková toxicita vzorku inhibici buněčného růstu nebo pokles metabolické aktivity. Některé mikroorganismy přirozeného původu mohou obsahovat konstitutivně exprimovaný reportérový gen, jehož měřitelný signál se vlivem toxického účinku



sníží. Tento princip je základem komerčního testu Microtox® (AZUR Environmental), v němž je sledován pokles přirozené bioluminiscence mořské bakterie *Photobacterium phosphoreum*<sup>69</sup>. Bez účasti reportérového genu lze toxicitu stanovit pouhým sledováním inhibice buněčného růstu. Vedle klasických plotnových nebo turbidimetrických metod bylo na případu sledování inhibičního účinku  $\text{Cu}^{2+}$  demonstrováno použití zařízení, ve kterém byl růst halotolerantních bakterií čeledi *Mikrobacteriaceae* sledován s akustickou detekcí pomocí piezoelektrického krystalu, jehož frekvence kmitání byla závislá na hustotě kultury<sup>70</sup>.

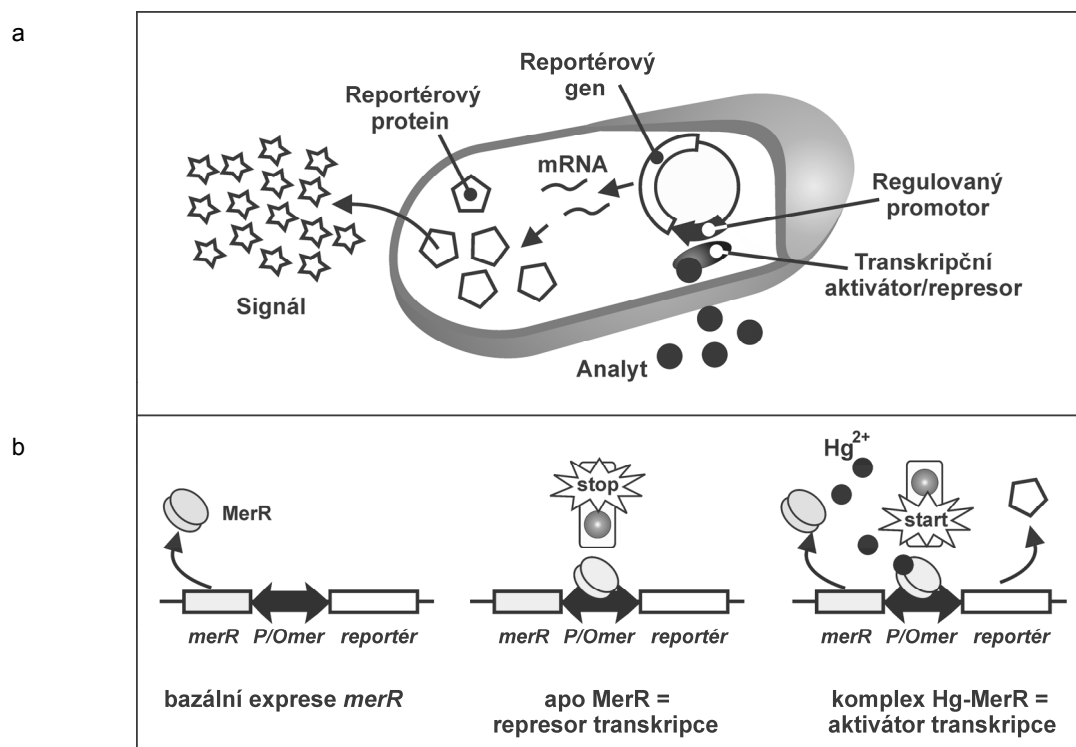
#### Buněčné biosenzory odpovídající na stres

Bližší informaci o typu přítomných toxických látek poskytují buněčné biosenzory obecného stresu. Senzorové buňky obsahují reportérový gen ve fúzi s promotorem zahrnutým v regulační kaskádě zprostředkující buněčnou odpověď na stresové podmínky. Pro detekci látek způsobujících buněčný stres byla takto vyvinuta souprava obsahující buňky *E. coli* nesoucí *luxCDABE* pod kontrolou promotorů genů *grpE*, *recA*, *katG*, *micF* a *fabA* (cit. <sup>72</sup>). K aktivaci transkripce *lux* genů pak dochází během stresové odpovědi na obecné poškození proteinů („heat shock“;

promotor *grpE*), poškození DNA (promotor *recA*), oxidační stres způsobený peroxidy (promotor *katG*), stres způsobený superoxidy (promotor *micF*) a inhibicí syntézy mastných kyselin (promotor *fabA*). Na rozdíl od přirozených biosenzorů, kdy je sledován pokles luminiscence, je v tomto uspořádání monitorován její nárůst, což umožňuje stanovení toxicity v širším rozmezí koncentrací xenobiotik.

#### 4.3. Specifické buněčné biosenzory

První buněčný biosenzor specifický k určité látce – naftalenu – popsali v roce 1990 King a spol.<sup>73</sup>. Senzorové buňky *Pseudomonas fluorescens* byly transformovány plasmidem, v němž byla kazeta *luxCDABE* vložena mezi strukturální geny operonu zodpovědného za degradaci naftalenu. Expresí strukturálních genů tohoto operonu je řízena regulačním proteinem NahR, který aktivuje transkripci po vazbě meziproductu odbourávání naftalenu. Systém založený na spojení reportérového genu s promotorem, jehož aktivita je řízena proteinem reagujícím na přítomnosti analytu (obr. 2a), se stal základem všech specifických buněčných biosenzorů. Aplikace regulačních elementů odpovídajících na přítomnost těžkých kovů při konstrukci spe-



Obr. 2. Obecný princip specifických buněčných biosenzorů (a) a regulace *mer* promotoru (b); vazba analytu na regulační protein spouští expresi reportérového proteinu (2a), který produkuje (v některých případech až po přidání substrátu) signál úměrný množství přítomného analytu. V konkrétním případě buněčného senzoru pro stanovení  $\text{Hg}^{2+}$  (2b) jsou buňky transformovány hybridní DNA obsahující kazetu tvořenou genem *merR* kódujícím transkripční aktivátor/represor MerR, promotor-operátovou oblastí *mer* operonu (*P/Omer*) a reportérovým genem

Tabulka III  
Buněčné biosenzory

Regulátor (gen)	Analyt	Reportér	Hostitelský organismus	Dynamický rozsah/ detekční limit (DL)/ [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	Lit.
<i>arsA</i>	$\text{AsO}_2^-$	<i>gfp</i>	<i>E. coli</i>	$10^{-3}$ –1	87
		<i>lucFF</i>	<i>B. subtilis</i>	DL= 3,3	88
	$\text{AsO}_4^{3-}$	<i>lucFF</i>	<i>B. subtilis</i>	DL= 330	88
		<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	DL= $10^{-9}$	90
<i>cadC</i>	$\text{Cd}^{2+}$	<i>lucFF</i>	<i>S. aureus</i>	0,01–1	93
		<i>gfp</i>	<i>E. coli</i>	$10^{-4}$ –750	92 <sup>b</sup>
	$\text{Pb}^{2+}$	<i>lucFF</i>	<i>S. aureus</i>	0,033–1	93
		<i>gfp</i>	<i>E. coli</i>	0,01–10	92 <sup>b</sup>
<i>chrB</i>	$\text{SbO}_2^-$	<i>lucFF</i>	<i>S. aureus</i>	1–330	93
		<i>gfp</i>	<i>E. coli</i>	$10^{-4}$ –10	92 <sup>b</sup>
	$\text{CrO}_4^{2-}/\text{Cr}^{3+}$	<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	1–40	84
		<i>lucFF</i>	<i>R. metallidurans</i>	DL= 0,03 <sup>c</sup>	83
<i>cnrYXH</i>	$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}/\text{CrO}_4^{2-}$	<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	DL= 0,05	83 <sup>b</sup>
		<i>lucFF</i>	<i>R. metallidurans</i>	DL= 0,05	83 <sup>b</sup>
<i>copSR</i>	$\text{Co}^{2+}$	<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	9–400	96 <sup>b</sup>
		<i>lucFF</i>	<i>R. metallidurans</i>	0,1–60	96 <sup>b</sup>
<i>merR</i>	$\text{Cu}^{2+}$	<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	1–200	84
		<i>lucFF</i>	<i>E. coli</i> <sup>a</sup>	DL= $5 \cdot 10^{-4}$	76 <sup>c</sup>
<i>merR</i>	$\text{Hg}^{2+}$	<i>lucFF</i>	<i>E. coli</i>	DL= $10^{-12}$	79
		<i>luxAB</i>	<i>E. coli</i> <sup>a</sup>	$2 \cdot 10^{-6}$ – $2,5 \cdot 10^{-4}$	78
		<i>luxCDABE</i>	<i>P. fluorescens</i>	$5 \cdot 10^{-4}$ –0,012	77 <sup>b</sup>
		<i>lacZ</i>	<i>P. fluorescens</i>	0,001–0,05	77 <sup>b</sup>
<i>pbrR</i>	$\text{Pb}^{2+}$	<i>gfp</i>	<i>P. fluorescens</i>	0,12–12	77 <sup>b</sup>
		<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	0,5–8	84
<i>zntR</i>	$\text{Zn}^{2+}$	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	DL= 0,1	56
		<i>lucFF</i>	<i>R. metallidurans</i>	DL= 40	83 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Biosenzorový kmen exprimoval i gen *merT*, <sup>b</sup>použit pro stanovení biodostupných kovů v půdě, <sup>c</sup>použit pro stanovení biodostupných kovů v říční vodě

cifických buněčných biosenzorů jsou uvedeny v následujícím textu a tabulka III shrnuje jejich důležité charakteristiky.

Buněčné biosenzory pro detekci  $\text{Hg}^{2+}$  využívají promotor/operátorovou oblast *mer* operonu (*P/O<sub>mer</sub>*) a gen *merR* kódující regulační protein. Přirozený *mer* operon, který byl spolu s dalšími geny pro rezistence k různým látkám nalezen na některých transpozomech a plasmidech, je zodpovědný za rezistenci bakterií ke sloučeninám rtuťi<sup>26,31</sup>. V gramnegativních bakteriích je gen *merR* transkribován divergentně od strukturních genů *merTPCABD*, které jsou zodpovědné za přenos  $\text{Hg}^{2+}$  a organortuťných sloučenin do buněk a jejich detoxikaci redukcí na elementární rtuť, která volně vstupuje z buňky do okolního

prostředí. Jak bylo naznačeno výše, funkční protein MerR se sestává ze dvou identických podjednotek, které vytvářejí dvě místa pro vazbu  $\text{Hg}^{2+}$ . Ta jsou tvořena dvěma Cys jedné podjednotky a jedním Cys podjednotky druhé<sup>31</sup>. Nejsou-li v buňce přítomny  $\text{Hg}^{2+}$  ionty, probíhá bazální exprese genu *merR* a protein MerR po vazbě na promotor/operátorovou oblast *P/O<sub>mer</sub>* vytváří neaktivní komplex s RNA-polymerasou. Vazba  $\text{Hg}^{2+}$  na MerR způsobuje konformační změnu proteinu a DNA, čímž dochází k přechodu na aktivní transkripční komplex<sup>31,74</sup> (obr. 2b). Homologní proteiny regulující transkripci v přítomnosti určitého kovu na základě stejného principu jsou řazeny do tzv. MerR rodiny transkripčních regulátorů.

Biosenzory využívající regulační element *merR-P/*

*O<sub>mer</sub>* ve fúzi s reportérovými geny *luxCDABE* (cit.<sup>75–77</sup>), *luxAB* (cit.<sup>78</sup>) *lacZ* (cit.<sup>77</sup>), *gfp* (cit.<sup>77</sup>), *lucFF* (cit.<sup>79</sup>) a *lucGR* (cit.<sup>80</sup>) vykazují velmi dobrou senzitivitu pro Hg<sup>2+</sup>. Indukční účinek mají i Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Au<sup>+</sup> a Au<sup>3+</sup> ionty, avšak v koncentracích o dva až tři řády vyšších<sup>79,81</sup>. Senzitivita a rychlost odezvy byla dále zvýšena expresí genu *merT* (cit.<sup>76,78</sup>), který kóduje translokasu transportující Hg<sup>2+</sup> do buňky.

Dalším zástupcem rodiny MerR je protein ZntR, regulující transkripci genu *zntA*, který kóduje ATPasu pro transport Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> a Cd<sup>2+</sup> z buněk *E. coli*. ZntR indukuje transkripci zejména v přítomnosti Zn<sup>2+</sup> a Cd<sup>2+</sup>, ačkoliv mírný indukční účinek vyvolávají i Hg<sup>2+</sup> a Pb<sup>2+</sup> ionty<sup>82</sup>. Pro biosenzory byl použit gen kódující ZntR a *P/O<sub>zntA</sub>* ve fúzi s reportérovými geny *lacZ* (cit.<sup>56</sup>) a *lucFF* (cit.<sup>83</sup>).

Transkripční regulátor PbrR (MerR rodina) vykazující vysokou míru selektivity k Pb<sup>2+</sup> iontům byl nalezen na megaplasmidu bakterie *Ralstonia metallidurans*<sup>27</sup>. Tento protein kontroluje expresi genů zodpovědných za transport Pb<sup>2+</sup> iontů z buňky a spolu s odpovídajícím promotorem ve fúzi s *luxCDABE* stal základem poměrně citlivého biosenzoru<sup>84</sup>.

Druhou velkou skupinou transkripčních regulátorů citlivých na přítomnost kovů je tzv. rodina ArsR proteinů. Na rozdíl od regulátorů MerR rodiny je funkce proteinů typu ArsR založena pouze na represi transkripcie. Bez přítomnosti kovu tvoří regulační protein komplex s DNA a brání tak nasednutí RNA-polymerasy. Vazba kovu na represor způsobí jeho uvolnění z promotor-operátorové sekvence a umožní tak zahájení transkripcie<sup>85</sup>. Regulační protein ArsR citlivý na AsO<sub>2</sub><sup>-</sup> a SbO<sub>2</sub><sup>-</sup> reprimuje bez jejich přítomnosti expresi genů *arsABC*, které kódují proteiny zajišťující redukci AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> na AsO<sub>2</sub><sup>-</sup> a transport těchto oxoaniontů z buňky<sup>86</sup>. Při konstrukci buněčných biosenzorů byl použit regulační element *arsR-P/O<sub>ars</sub>* kontrolující expresi *gfp* (cit.<sup>87</sup>), *lucFF* (cit.<sup>88,89</sup>) a *lacZ* (cit.<sup>90</sup>).

Do ArsR rodiny patří i regulační protein CadC, který řídí v *cad* operonu expresi genu *cadA*, který kóduje ATPasu zodpovědnou za export Cd<sup>2+</sup> z buňky<sup>91</sup>. Regulační oblast *cadC-P<sub>cad</sub>* byla při konstrukci biosenzorů pro Cd<sup>2+</sup> a Pb<sup>2+</sup> využita ve spojení s reportérovými geny *gfp* (cit.<sup>92</sup>) a *lucFF* (cit.<sup>93</sup>). Nedávno objevený transkripční regulátor CadR, který je řazen do MerR rodiny<sup>94</sup>, vykazuje vyšší specifitu k Cd<sup>2+</sup>, dosud však nebyl při konstrukci buněčných biosenzorů využit.

Buněčný biosenzor specifický k Cu<sup>2+</sup> využívá kontrolu *luxCDABE* promotorem *P<sub>cop</sub>* a produkty genů *copSR* z *Ralstonia metallidurans*<sup>84</sup>. Produkty *copSR* přirozeně aktivují expresi *cop* genů zodpovědných za export Cu<sup>2+</sup>, regulační mechanismus však dosud není plně objasněn.

Rezistence rodu *Ralstonia* k Co<sup>2+</sup> a Ni<sup>2+</sup> je řízena geny *cnrYXH*. Protein CnrH, který reguluje expresi genů zodpovědných za export Co<sup>2+</sup> a Ni<sup>2+</sup> z buňky, je  $\sigma$ -faktor, jehož aktivita je pravděpodobně řízena membránovými proteiny CnrX a CnrY (cit.<sup>95</sup>). Buněčný biosenzor citlivý k Co<sup>2+</sup> a Ni<sup>2+</sup> byl získán spojením genů *cnrYXH* s kazetou *luxCDABE* (cit.<sup>96</sup>). Dalšími geny nalezenými na megaplasmidu *Ralstonia metallidurans* jsou geny *chr*, jejichž pro-

dukty zajišťují rezistenci ke sloučeninám chromu<sup>25</sup>. Při konstrukci biosenzorů byla použita regulační jednotka *chrB-P<sub>chrA</sub>* ve fúzi s kazetou *lucFF* (cit.<sup>83</sup>) a *luxCDABE* (cit.<sup>84</sup>).

Některé z buněčných biosenzorů byly úspěšně použity ke stanovení biologicky dostupné složky kovů v reálných vzorcích (tab. III). Obtížně definovatelné složky značně komplexních reálných vzorků mohou zkreslovat signál produkovaný reportérovým proteinem, proto je většinou k produkci referenčního signálu používán kmen exprimující reportérový gen konstitutivně. Metoda tzv. duálního značení, která využívá dvojice reportérových genů (např. luciferas produkujících světlo o různých vlnových délkách nebo variant GFP s odlišným emisním spektrem), z nichž jeden je produkovan konstitutivně a druhý v závislosti na přítomnosti analytu, umožňuje produkci obou signálů v jedné buňce<sup>45</sup>. Ačkoliv jsou stanovení kovů pomocí buněčných biosenzorů většinou prováděna v suspenzi buněk, pro konstrukci přenosných zařízení, která by umožňovala detekci analytů *in situ*, je výhodnější buňky imobilizovat. Dobrý přehled imobilizačních technik využívaných při konstrukci buněčných biosenzorů uvádí D'Sousa<sup>7</sup>. Imobilizace buněk je též předpokladem pro konstrukci čipů, na kterých jsou naneseny sensorové buňky obsahující fúze různých regulačních elementů s reportérovými geny<sup>56</sup>. Tyto čipy ve spojení s optickými vlákny nebo CCD prvky povedou pravděpodobně ke vzniku nové generace buněčných biosenzorů.

## 5. Závěr

V této práci jsme se pokusili popsat kategorie biologických složek biosenzorů a jejich významné zástupce využitě v konstrukcích biosenzorů pro těžké kovy. Neuvádíme zcela vyčerpávající výčet všech popsaných biosenzorů pro těžké kovy a popis dalších, především proteinových biosenzorů, lze nalézt v referátech jiných autorů<sup>2,97</sup>. Biosenzory založené na interakci kovů s izolovaným proteinem sice poskytují rychlé odezvy a lze je většinou po regeneraci vícenásobně použít, ale biosenzory využívající inhibice enzymů, metalothioneiny (MT) a fytochelatinu (PC) postrádají užší specifitu. V porovnání s biosenzory založenými na MT nebo PC navíc enzymové biosenzory vykazují vyšší detekční limity a užší dynamický rozsah. Vyšší specifitu a dostatečnou citlivost poskytují imunochemické senzory, jejichž využití je díky popularitě immunochemických metod v běžné praxi spíše reálné. Jako slibné se jeví využití transkripčních regulátorů jak v podmínkách *in vitro*, tak především *in vivo*, jako součásti buněčných biosenzorů. Souprava specifických buněčných biosenzorů založená na bakterii *R. metallidurans*, obsahující specifické regulační elementy kontrolující expresi kazety reportérových genů *luxCDABE* (tab. III) v závislosti na přítomnosti iontu kovu, je již komerčně dostupná pod označením BIOMET (cit.<sup>50,98</sup>).

*Tato práce vznikala za finanční podpory GA ČR (grant č. 203/03/P095) a MŠMT ČR (granty č. IM6837805002 a MSM6046137305).*

## LITERATURA

- IUPAC Compendium of Chemical Terminology 64, 148 (1992).
- Castillo J., Gaspár S., Leth S., Niculescu M., Mortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneau S. A., Ryabov A. D., Csöregi E.: Sens. Actuators *B102*, 179 (2004).
- Choi M. M. F.: Microchim. Acta *148*, 107 (2004).
- Vo-Dinh T., Kasili P.: Anal. Biol. Chem. *381*, 141 (2005).
- Lei Y., Chen W., Muchandani A.: Anal. Chim. Acta *568*, 200 (2006).
- Kotlín R., Dyr J. E.: Chem. Listy *100*, 178 (2006).
- D'Souza S. F.: Biosens. Bioelectron. *16*, 337 (2001).
- Krawczyk T. K., Moszcynska M., Trojanowicz M.: Biosens. Bioelectron. *15*, 681 (2000).
- Castro M. D. L., Herrera M. C.: Biosens. Bioelectron. *18*, 279 (2003).
- Gayet J., Haouz A., Geloso-Meyer A., Burstein C.: Biosens. Bioelectron. *8*, 177 (1993).
- Fennouh S., Casmiri V., Geloso-Meyer A., Burstein C.: Biosens. Bioelectron. *13*, 903 (1998).
- Ogonczyk D., Tymecki L., Wyzkiewicz I., Koncki R., Glab S.: Sens. Actuators, *B106*, 450 (2005).
- Yang Y., Wang Z., Yang M., Guo M., Wu Z., Shen G.: Sens. Actuators *B114*, 1 (2006).
- Rodriguez B. B., Bolbot J. A., Tothill I. E.: Biosens. Bioelectron. *19*, 1157 (2004).
- Preininger C., Wolfbeis O. S.: Biosens. Bioelectron. *11*, 981 (1996).
- Nam Y. J., Kim N., Volotovskiy V.: Sens. Actuators, *B42* 233 (1997).
- Veselova I. A., Shekhovtsova T. N.: Anal. Chim. Acta *392*, 151 (1999).
- Shekhovtsova T. N., Muginova S. V., Bagirova N. A.: Anal. Chim. Acta *344*, 145 (1997).
- Satoh I., Kasahara T., Goi N.: Sens. Actuators *B1*, 499 (1990).
- Satoh I., Iijima Y.: Sens. Actuators *B24-25*, 103 (1995).
- Satoh I.: Sens. Actuators *B13-14*, 162 (1993).
- Satoh I.: Biosens. Bioelectron. *6*, 375 (1991).
- Coyle P., Phicox J. C., Carey L. C., Rofe A.-M.: Cell. Mol. Life Sci. *59*, 627 (2002).
- Kotrba P., Ruml T.: Collect. Czech Chem. Commun. *65*, 1205 (2000).
- Cobbett C., Goldsbrough P.: Annu. Rev. Plant Biol. *53*, 159 (2002).
- Silver S.: Gene *179*, 9 (1996).
- Nies D. H.: FEMS Microbiol. Rev. *27*, 313 (2003).
- Bontidean I., Lloyd J. R., Hobman J. L., Wilson J. R., Csöregi E., Mattiasson B., Brown N.: J. Inorg. Biochem. *79*, 225 (2000).
- Bontidean I., Ahlqvist J., Mulchandani A., Chen W., Bae W., Mehra R. K., Mortari A., Csöregi E.: Biosens. Bioelectron. *18*, 547 (2003).
- Wu Ch., Lin L.: Biosens. Bioelectron. *20*, 864 (2004).
- Barkay T., Miller S. M., Summers A. O.: Microbiol. Rev. *27*, 355 (2003).
- Chen P., He Ch.: J. Am. Chem. Soc. *126*, 728 (2003).
- Barondeau D. P., Kassmann C. J., Tainer J. A., Getzoff E. D.: J. Am. Chem. Soc. *124*, 3522 (2002).
- Summer J., Westerberg N. M., Stoddard A. K., Hurst T. K., Cramer M., Thompson R. B., Fierke C. A., Kopelman R.: Biosens. Bioelectron. *21*, 1302 (2006).
- Wylie D. E., Lu D., Carlson L. D., Carlson R., Babacan K. F., Schuster S. M., Wagner F. W.: Immunology *89*, 4104 (1992).
- Blake D. A., Blake R. C., Khosraviyani M., Pavlov A. R.: Anal. Chim. Acta *376*, 13 (1998).
- Blake D. A., Jones R. M., Blake II R. C., Pavlov A. R., Darwish I. A., Yu H.: Biosens. Bioelectron. *16*, 799 (2001).
- Ellington A. D., Szostak J. W.: Nature *346*, 818 (1990).
- Breaker R. R., Joyce G. F.: Chem. Biol. *2*, 655 (1995).
- Fedor M. J., Williamson J. R.: Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. *6*, 399 (2005).
- Breaker R. R., Joyce G. F.: Chem. Biol. *1*, 223 (1994).
- Lu Y., Liu J., Li J., Brusehoff P. J., Pavot C. M.-B., Brown A.K.: Biosens. Bioelectron. *18*, 529 (2003).
- Tombelli S., Minunni M., Mascini M.: Biosens. Bioelectron. *20*, 2424 (2005).
- Hesselberth J., Robertson M. P., Jhaveri S., Ellington A. D.: Rev. Mol. Biotech. *74*, 15 (2000).
- Belkin S.: Curr. Opin. Microbiol. *6*, 206 (2003).
- Riedel K.: Bioelectroch. Bioener. *25*, 19 (1991).
- Ramanathan S., Ensor M., Daunert S.: Trends Biotechnol. *15*, 500 (1997).
- Rainina E. I., Efremenco E. N., Varfolomeyev S. D., Simonian A. L., Wild J. R.: Biosens. Bioelectron. *11*, 991 (1996).
- Purohit H. J.: J. Clean. Prod. *11*, 293 (2003).
- Corbisier P., Mergeay M., Diels L. (Flemish Institute for Technological Research): US 5786162 (435/7.32).
- Lewis J. C., Feltus A., Ensor C. M., Ramanathan S., Daunert S.: Anal. Chem. *70*, 579A, (1998).
- Naylor L. H.: Biochem. Pharmacol. *58*, 749 (1999).
- Rensing Ch., Maier R.: Ecotoxicol. Environ. Saf. *56*, 140 (2003).
- Daunert S., Barrett G., Feliciano J. S., Shetty R. S., Shrestha S., Smith-Spencer W.: Chem. Rev. *100*, 2705 (2000).
- Silhavy T. J., Beckwith J. R.: Microbiol. Rev. *49*, 398 (1985).
- Biran I., Rissin D. M., Ron E. Z., Walt D. R.: Anal. Biochem. *315*, 106 (2003).
- Biran I., Klimentiy L., Hengge-Aronis R., Ron E. Z., Rishpon J.: Microbiology *145*, 2129 (1999).
- Hakilla K., Maksimow M., Karp M., Virta M.: Anal. Biochem. *301*, 235 (2002).

59. Kendall J. M., Badminton M.: *Trends Biotechnol.* 16, 216 (1998).
60. Wachter R. M., Elsliger M., Kallio K., Hanson G. T., Remington S. J.: *Structure* 6, 1267 (1998).
61. Bongaerts R. J. M., Hautefort I., Sidebotham J. M., Hinton J. C. D.: *Methods Enzymol.* 358, 43 (2002).
62. Meighen E. A.: *Microbiol. Rev.* 55, 123 (1991).
63. Baldwin T. O., Christopher J. A., Raushel F. M., Sinclair J. F., Ziegler M. M., Fisher A. J., Rayment I.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 798 (1995).
64. Winson M. K., Swift S., Hill P. J., Sims C. M., Griensmayr G., Bycroft B. W., Williams P., Stewart G. S. A. B.: *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 193 (1998).
65. Hastings J. W.: *Gene* 173, 5 (1996).
66. Brau F., Bernengo J., Min K., Steghens J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 247 (2000).
67. Billard P., Dubow M. S.: *Clin. Biochem.* 31, 1 (1998).
68. Harrison E. M., Garden O. J., Ross J. A., Wigmore S. J.: *J. Immunol. Methods* 310, 182 (2006).
69. <http://www.azurenv.com/mtox.htm>, staženo .
70. Abbondanzi F., Cachada A., Campisi T., Guerra R., Raccagni M., Iacondini A.: *Chemosphere* 53, 889 (2003).
71. Yamasaki A., Cunha M. A. S. D. A., Oliviera J. A. B. P., Duarte A. C., Gomes M. T. S. R.: *Biosens. Bioelectron.* 19, 1203 (2004).
72. Belkin S., Smulski D. R., Dadon S. A., Vollmer A. C., Van Dyk T. K., Larossa R. A.: *Wat. Res.* 31, 3009 (1997).
73. King J. M. H., DiGrazia P. M., Applegate B., Burlage R., Sanseverino J., Dunbar P., Larimer F., Sayler G. S.: *Science* 249, 778 (1990).
74. Ansari A. Z., Brander J. E., O'Halloran T. V.: *Nature* 374, 370 (2002).
75. Rasmussen L. D., Sorensen S. J., Turner R. R., Barkay T.: *Soil Biol. Biochem.* 32, 639 (2000).
76. Selifonova O., Burlage R., Barkay T.: *Appl. Environ. Microb.* 59, 3083 (1993).
77. Hansen L. H., Sorensen S. J.: *FEMS Microbiol. Lett.* 193, 123 (2000).
78. Omura T., Kiyono M., Pan-Hou H.: *J. Health Sci.* 50, 379 (2004).
79. Virta M., Lampinen J., Karp M.: *Anal. Chem.* 67, 667 (1995).
80. Petanen T., Romantschuk M.: *Anal. Chim. Acta* 456, 55 (2002).
81. Ralston D. M., O'Halloran T. V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3846 (1990).
82. Khan S., Brocklehurst K. R., Jones G. W., Morby A. P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 438 (2002).
83. Ivask A., Virta M., Kahru A.: *Soil Biol. Biochem.* 34, 1439 (2002).
84. Corbisier P., van der Lelie D., Borremans B., Provoost A., de Lorenzo V., Brown N. L., Lloyd J. R., Hobman J. L., Csöregi E., Johansson G., Mattiasson B.: *Anal. Chim. Acta* 387, 235 (1999).
85. Busenlehner L. S., Pennella M. A., Giedroc D. P.: *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 131 (2003).
86. Ji G., Silver S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9474 (1992).
87. Roberto F. F., Barnes J. M., Bruhn D. F.: *Talanta* 58, 181 (2002).
88. Tauriainen S., Karp M., Chang W., Virta M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4456 (1997).
89. Flynn H. C., Mc Mahon V., Chong Diaz G., Demergasso C. S., Corbisier P., Meharg A. A., Paton G. I.: *Sci. Total Environ.* 286, 51 (2002).
90. Ramanathan S., Shi W., Rosen B. P., Daunert S.: *Anal. Chim. Acta* 369, 189 (1998).
91. Endo G., Silver S.: *J. Bacteriol.* 177, 4437 (1995).
92. Liao V. H., Chien M., Tseng Y., Ou K.: *Environ. Pollut.* 142, 17 (2005).
93. Tauriainen S., Karp M., Chang W., Virta M.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 931 (1998).
94. Brocklehurst K. R., Megit S. J., Morby A. P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 234 (2003).
95. Grass G., Grobe C., Nies D. H.: *J. Bacteriol.* 182, 1390 (2000).
96. Tibazarwa C., Corbisier P., Mench M., Bossis A., Solda P., Mergeay M., Wyns L., van der Lelie D.: *Environ. Pollut.* 113, 19 (2001).
97. Verma N., Singh M.: *BioMetals* 18, 121 (2005).
98. <http://www.vito.be/english/environment/environmentaltech2d.htm>, staženo 20.12.2006.

**P. Vopálenský, T. Ruml, and P. Kotrba**  
*(Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague):* **Biological Components of Heavy Metal Biosensors**

Biosensor is an analytical device that couples a biological element, such as a biopolymer or microorganism capable of sensing the target analyte, with a physicochemical signal transducer to enable rapid, accurate and sensitive detection. The biological element determines the specificity of the biosensor and significantly contributes to its sensitivity. In this paper we review heavy metal biosensors with emphasis on their biological components – enzymes activated or inhibited by heavy metal ions, metal-sequestering peptides, non-enzymatic proteins, DNAs possessing metal-dependent enzymatic activity, antibodies against metal chelates, metal-dependent transcription activators/repressors combined with their target DNA sequence as well as whole bacterial cells, both natural and genetically engineered by introducing the metal-responsive transcription regulation elements controlling the expression of a reporter gene.

## APLIKÁCIA OXIDU CHLORIČITÉHO AKO DEZINFEKČNÉHO ČINIDLA NA ÚPRAVU VODY

ĽUBOSLAV GAJDOŠ<sup>a</sup>, KAROL MUNKA<sup>a</sup>,  
MONIKA KARÁCSONYOVÁ<sup>a</sup> a JÁN DERCO<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábr. arm. gen. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava 1, <sup>b</sup> Ústav chemického a environmentálneho inžinierstva, FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava 1  
gajdos@vuvh.sk, munka@vuvh.sk,  
karacsonyova@vuvh.sk, jan.derco@stuba.sk

Došlo 10.4.06, prepracované 17.7.06, prijaté 31.8.06.

Kľúčové slová: oxid chloričitý, zdravotné zabezpečenie vody, dezinfekcia, DBPs, rýchlostné konštanty

### Obsah

1. Úvod
2. Mechanizmus a produkty dezinfekcie oxidu chloričitého
  - 2.1. Vedľajšie produkty oxidácie oxidom chloričitým
3. Technologické aspekty
  - 3.1. Oxid chloričitý a pitná voda
  - 3.2. Zdravotné zabezpečenie vody
  - 3.3. Dávkovanie oxidu chloričitého a limitné koncentrácie
4. Kinetika reakcií oxidu chloričitého – rýchlostné konštanty
  - 4.1. Porovnanie rýchlostných konštánt pre rozličné substráty
5. Záver

### 1. Úvod

Oxid chloričitý objavil v roku 1811 Davy<sup>1</sup>. Pripravil sa reakciou chlorečnanu draselného s kyselinou chlorovodíkovou. Prvý komerčný proces na jeho prípravu vyvinula v roku 1930 firma Mathieson Alkali Works z chlorečnanu sodného. Chloritan sodný sa zaviedol ako komerčný produkt na vyvíjanie oxidu chloričitého v roku 1939 a rýchle sa rozšíril v priemyselnom používaní. V roku 1944 sa oxid chloričitý prvýkrát aplikoval na reguláciu chuti pri úprave pitných vôd a zápachu na čistiarni odpadových vôd v Niagara Falls, NY. V posledných desaťročiach sa oxid chloričitý stal vo svete významným dezinfekčným činidlom v procese zdravotného zabezpečenia vody. Jeho postupné zavádzanie si vynútilo venovať sa tejto zlúčenine a prešetriť výhody a nevýhody spojené s nahradením doteraz používaného spôsobu dezinfekcie vody chlórrom, res-

pektíve chlórnanom sodným.

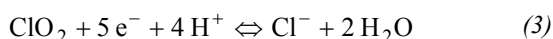
Základným predpokladom zavedenia oxidu chloričitého pri úprave vody je dokonalá znalosť fyzikálno-chemických vlastností a tiež znalosť technologických vlastností – chemickej stability v distribučnom systéme. Hľadanie progresívnych postupov dezinfekcie vody bolo podmienené zistením nebezpečenstva pri použití chlóru, kedy dochádzalo k tvorbe nežiadúcich vedľajších produktov dezinfekcie ako sú THM (trihalogénmetány). Doteraz bol sledovaný vplyv 2221 organických zlúčenín pôsobiacich nepriaznivo na ľudské zdravie. Vo vodách sa vyskytuje 765 látok, z toho 20 látok je karcinogénnych a 117 je mutagénnych. Tieto zlúčeniny môžu zapríčiniť nielen karcinogénne, ale taktiež aj hepatotoxické, neurotoxické a metabolické poruchy<sup>2</sup>.

### 2. Mechanizmus a produkty dezinfekcie oxidu chloričitého

Chemické vlastnosti rozličných zlúčenín chlóru sú závislé na hodnote pH. Oxid chloričitý je často prezentovaný ako silnejšie oxidačné činidlo ako chlór. Za neutrálnych podmienok je chlór a oxid chloričitý redukovaný na chloridový a chloritanový ión.



Ak sa pH zníži asi o 2 jednotky, prebiehajú nasledujúce reakcie:



V závislosti od hodnoty pH a oxidačno-redukčného potenciálu prichádzajú pri chlorácii vody do úvahy nasledujúce formy výskytu:  $\text{Cl}_2(\text{aq})$ ,  $\text{HClO}$ ,  $\text{ClO}^-$  a  $\text{Cl}^-$ . Pri chlorácii prírodných vôd prevládajú dve formy výskytu,  $\text{HClO}$  a  $\text{ClO}^-$ . Elementárny chlór prichádza do úvahy iba v silne kyslom prostredí ( $\text{pH} < 2$ )<sup>3</sup>.

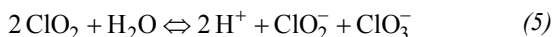
#### 2.1. Vedľajšie produkty oxidácie oxidom chloričitým

Oxid chloričitý je považovaný za takmer ideálny dezinfektant, ktorý poskytuje dobré výsledky a nevytvára škodlivé vedľajšie produkty<sup>4,5</sup>. Jeho anti-mikrobiálna akti-

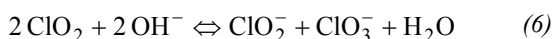
vita je vyššia ako u chlóru a nezávisí od pH. Oxidáciou prírodných organických látok (NOM) oxidom chloričitým nedochádza k tvorbe halogénových vedľajších produktov dezinfekcie (DBPs)<sup>6</sup>. Prírodné organické látky pri reakcii s oxidom chloričitým vytvárajú karboxylové zlúčeniny<sup>7,8</sup>. Oxid chloričitý nereaguje s amónnymi iónmi a amino-zlúčeninami<sup>9</sup> a neprebíha haloformová reakcia, ktorá je hlavnou cestou k tvorbe organických halogénových vedľajších produktov<sup>10</sup>. Oxid chloričitý môže byť použitý na oxidáciu železa a mangánu<sup>11</sup> a oxiduje zlúčeniny zodpovedné za chuť a zápach<sup>12</sup>. Na oxidáciu 1,0 mg l<sup>-1</sup> železa je potrebné 1,2 mg l<sup>-1</sup> oxidu chloričitého a na oxidáciu 1,0 mg l<sup>-1</sup> mangánu 2,5 mg l<sup>-1</sup> oxidu chloričitého. Napriek početným výhodám, oxid chloričitý predstavuje potenciálny zdroj rizika pre ľudské zdravie spôsobený anorganickými vedľajšími produktmi ako chloritany (ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>) a chlorečnany (ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Toxicologický účinok z expozície ClO<sub>2</sub><sup>-</sup> bol spočiatku spojený s hemolytickým systémom. V nízkych dávkach, chloritany môžu viesť k hemolytickej anémii, poškodeniu bunkových membrán červených krviniek, vyššie dávky môžu viesť k zvýšeniu methemoglobínu. Ďalšie štúdie poukazujú, že chloritany môžu pôsobiť na nervový systém dočiat a detí. Pretože ClO<sub>2</sub> a ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> sa môžu rýchlo v ľudskom tele konvertovať na ClO<sub>2</sub><sup>-</sup> ako výsledok nitrátovo reduktázovo-katalyzovanej konverzie, niektoré aspekty ich toxicity sú podobné<sup>13</sup>.

Chlorečnany a chloritany sú anorganické zlúčeniny vznikajúce pri hydrolyze oxidu chloričitého pri vyšších hodnotách pH:

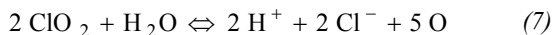


alebo

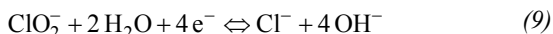


Pretože produkty hydrolyzy oxidu chloričitého sú menej oxidačne účinné ako oxid chloričitý, je hydrolyza nežiadúca.

Po pridaní roztoku oxidu chloričitého do vody prebiehajú chemické reakcie, pri ktorých sa oxid chloričitý redukuje až na chlorid<sup>14</sup>:



Reakciu môžeme rozdeliť na čiastkové reakcie:



Počas oxidácie oxidom chloričitým sa vytvára značné množstvo chloritanov (60 % z dávky oxidu chloričitého) a ich produkcia nie je ovplyvnená výskytom prekursorov vo vode. Preto limit pre chloritany 0,2 mg l<sup>-1</sup> môže byť splnený pri dávkach oxidu chloričitého nižších ako 0,3–0,4

mg l<sup>-1</sup>, inak by mala byť aplikovaná špecifická úprava na odstraňovanie chloritanov<sup>15</sup>.

Okrem chloritanov a chlorečnanov, oxid chloričitý vytvára biologicky ľahko rozložiteľné karboxylové zlúčeniny a karboxylové kyseliny s krátkym reťazcom počas dezinfekcie vody<sup>4,5</sup>. Existuje pomerne málo odkazov, kde sa hovorí o vzťahu medzi tvorbou BDOC (biologicky rozložiteľného organického uhlíka) a oxidáciou NOM (prírodných organických látok) oxidom chloričitým. Cieľom štúdie Raczky a spol.<sup>16</sup> bolo vyhodnotenie vplyvu oxidácie prírodných organických látok oxidom chloričitým. V jeho experimentoch voda po pieskovej filtrácii a ozonizácii/biofiltrácii bola vystavená pôsobeniu ClO<sub>2</sub>. Porovnávané bolo množstvo BDOC vytvoreného po oxidácii ClO<sub>2</sub> pre takto upravené vody. Výsledky ukázali značné rozdiely v tvorbe vedľajších produktov oxidácie oxidom chloričitým medzi neozonizovanou a ozonizovanou/biofiltrovanou vodou. Dezinfekciou ozonizovanej/biofiltrovanej vody oxidom chloričitým sa vytvára porovnateľné množstvo aldehydov a oveľa vyššie množstvo karboxylových kyselín pri porovnaní s oxidáciou vody po filtrácii pieskom.

### 3. Technologické aspekty

Záujem rastie o možné použitie oxidu chloričitého ako alternatívneho alebo prídavného dezinfekčného činidla. Na dezinfekciu vody sa používa v distribučných systémoch napríklad v Taliansku, Francúzsku, Nemecku ako aj v Českej republike a na Slovensku. Pretože ClO<sub>2</sub> nevytvára vedľajšie produkty pri reakcii ako chlór s rovnakými prekursorami, je možné vodu dezinfikovať oxidom chloričitým bez ďalšej potreby dezinfekcie vody napríklad ozónom.

Skúsenosti z praxe ukazujú, že k aplikácii oxidu chloričitého často dochádza bez predchádzajúcej analýzy dopadov tohto kroku na kvalitu dodávanej vody a celkové prostredie vodovodného systému. Pre zodpovedné zavádzanie nového spôsobu dezinfekcie sa ako nutnosť javí potreba preskúmať správanie sa oxidu chloričitého vo vode, poznať kinetiku jeho rozkladu, vplyv na chemickú stabilitu a agresívne vlastnosti vody a definovať podmienky na obmedzenie tvorby vedľajších produktov dezinfekcie.

Na Slovensku koncom 90. rokov minulého storočia prišlo v niektorých distribučných systémoch k zmene zdravotného zabezpečenia vody z chlóru na oxid chloričitý. Nie všetky tieto zmeny priniesli jednoznačné pozitívne výsledky najmä, čo sa týka senzorických vlastností vody a výskytu zvýšených koncentrácií chloritanov. Problémy sa vyskytli predovšetkým vo vodovodných sieťach, v ktorých bola dodávaná nekvalitná voda, najmä so zvýšeným obsahom železa a mangánu. Oxid chloričitý svojimi silnými oxidačnými účinkami pôsobil na vytvorené inkrusty, dochádzalo k ich uvoľňovaniu do vody a následne k zhoršovaniu senzorických vlastností vody (zvýšené hodnoty farby, zákalu a koncentrácií železa).

### 3.1. Oxid chloričitý a pitná voda

Oxid chloričitý môže byť použitý ako dezinfektant, alebo ako oxidant pri úprave pitnej vody. Ako dezinfekčné činidlo sa môže použiť v stupni pred-oxidácie ako aj po-oxidáčnom stupni. Pridaním oxidu chloričitého v pred-oxidáčnom stupni úpravy povrchovej vody môžeme znížiť rast baktérií a rias v nasledujúcej fáze úpravy vody. Oxid chloričitý tiež pôsobí ako oxidant, pomáha pri procese koagulácie a je účinný pri znižovaní zákalu. V dezinfekčnom stupni úpravy pôsobí oxid chloričitý ako silný bakteriocid a virocid, a jeho vedľajší produkt – chlórity ( $\text{ClO}_2^-$ ) majú slabý bakteriocidny alebo bakteriostatický účinok. Pridávanie oxidu chloričitého v tejto fáze zabezpečuje zamedzenie bakteriálneho rastu v distribučnom systéme pitnej vody. Vplyv  $\text{ClO}_2$  na jednotlivé zložky v pitnej vode je uvedený v tabuľke I.

Chemická inaktivácia mikrobiálnych kontaminantov vyskytujúcich sa v surovej vode je iba jedným z mnohých krokov, kde sa eliminujú alebo prinajmenšom redukovujú potenciálne patogénne mikroorganizmy nachádzajúce sa vo vode. Tieto kroky, nazvané „stupňami procesu“, zahŕňajú pre-oxidáciu, koaguláciu, usadzovanie, filtračný stupeň a dezinfekciu. Každý tento stupeň hrá jedinečnú úlohu a každý z týchto stupňov má dôležité postavenie pri úprave vody surovej na vodu pitnú.

Účinná koagulácia a následné usadzovanie zhlukov agregovaných vločiek obsahujúcich prírodné organické látky je jedným z najdôležitejších procesov pri úprave povrchovej vody. Usadzovanie vločiek pozdĺž širokej nádrže s pomalým prietokom má za následok odstránenie značného množstva prírodného znečistenia, vrátane mikrobiálnych kontaminantov.

Pre pre-oxidáciu a redukcii organických látok požadované dávky oxidu chloričitého sú medzi 0,5 a 2,0  $\text{mg l}^{-1}$  s dobou kontaktu nižšou ako 15–30 min, v závislosti od zloženia vody. V prípade po-oxidácie sa používa dávka 0,2–0,4  $\text{mg l}^{-1}$   $\text{ClO}_2$ . Pri týchto dávkach zvyšková koncentrácia chlóritanov nepredstavuje zdravotné riziko<sup>19</sup>.

Tabuľka I  
Vplyv  $\text{ClO}_2$  pri úprave pitnej vody

Zložka	Odozva
Vybrané prírodné a syntetické organické látky	môžu reagovať a vytvárať chlórity
Železo a mangán	oxiduje <sup>17</sup>
Farba	odstraňuje <sup>17</sup>
THM	znižuje <sup>17</sup>
Organické látky	oxiduje <sup>6,17</sup>
Fenoly	reaguje za vzniku chlórifenolov a chinónov <sup>18</sup>

### 3.2. Zdravotné zabezpečenie vody

Pri zdravotnom zabezpečení vody sa musí dodržať rovnováha medzi znižovaním rizika mikrobiologickej kontaminácie pitnej vody a potenciálneho rizika, ktoré vychádza z chemickej kontaminácie pri použití dezinfekčného činidla. Jednou z možností ako redukovat' chemické nebezpečenstvo je znížiť obsah halogénových vedľajších produktov dezinfekcie prostredníctvom prídavku  $\text{ClO}_2$ . Mikrobiologické riziko kontaminácie sa nezvyšuje, pokiaľ sa dodrží primeraná dávka dezinfekčného činidla.

Nižšie koncentrácie  $\text{ClO}_2$  môžu byť použité na dosiahnutie efektívnej inaktivácie mikroorganizmov. Oxid chloričitý je účinný proti patogénom, ktoré sú rezistentné voči chlóru a tradičným chemickým dezinfekčným činidlám používaných pri úprave vody.

Oxidačné a dezinfekčné vlastnosti sú konštantné v širokom rozpätí pH od 4 do 10. Tu je podstatný rozdiel, nakoľko použitie chlóru je silne závislé na hodnote pH. Biocidny účinok, stabilita a vplyv pH na účinnosť dezinfekcie je uvedený v tabuľke II.

Existujú veľké množstvá mikroorganizmov nachádzajúcich sa v surovej vode, rovnako ako aj v pitnej vode po úprave. Mikroorganizmy, ktorým sa venuje pozornosť, sú samozrejme tie, ktoré zapríčínujú ochorenia (patogénne organizmy).

Vírusy môžeme nájsť oddelene alebo vo vločkách po koagulácii a ich eliminácia je možná pomocou sedimentácie a filtrácie, chemická dezinfekcia poväčšine zaručuje ich eliminovanie. Podzemná voda musí byť taktiež dezinfikovaná, ak vírusy alebo iná skupina mikrobiálnych indikátorov sa nachádzajú vo vode.

Cysty (protozoa) je najťažšie inaktivovať. Ak sú požiadavky pre inaktiváciu cýst splnené, bakteriálna a virálna inaktivácia je dostatočná. Monitoruje sa tzv. „C<sub>x</sub>T“ hodnota. Táto hodnota berie do úvahy čas  $T$  potrebný pre danú koncentráciu zvyškového dezinfektantu  $C$  na inaktiváciu mikroorganizmov za špecifických prevádzkových podmienok. A tak, najlepší dezinfekčný prostriedok môže dosiahnuť najvyššiu účinnosť dezinfekcie pri najnižšej hodnote  $C_xT$ .

Tabuľka II  
Biocidny účinok, stabilita a vplyv pH na účinnosť dezinfekcie pre niektoré dezinfekčné činidlá<sup>19</sup>

Dezinfektant	Biocidny účinok <sup>a</sup>	Stabilita <sup>a</sup>	Vplyv pH na účinnosť (pH 6–9)
Ozón	1	4	malý vplyv
Oxid chloričitý	2	2	účinnosť sa nepatrne zvyšuje so zvyšovaním pH
Chlór	3	3	účinnosť podstatne klesá so stúpajúcou hodnotou pH
Chlóramíny	4	1	malý vplyv

<sup>a</sup> Indikovaná charakteristika sa znižuje od 1 (maximum) do 4 (minimum)



Tabuľka III

Zoznam hodnôt pre súčin CxT na inaktiváciu rozličných mikroorganizmov použitím dezinfekčného činidla<sup>20</sup>

Mikroorganizmus	Chlór (pH 6–7)	Chlóramin (pH 8–9)	Oxid chloričitý (pH 6–7)	Ozón (pH 6–7)
E. Coli	0,034–0,05	95–180	0,4–0,75	0,02
Polio 1	1,1–2,5	768–3740	0,2–6,7	0,1–0,2
Rotavirus	0,01–0,05	3806–6476	0,2–2,1	0,006–0,06
Cysts of G. lamblia	47–150	2200 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	0,5–0,6
Cysts of G. muris	30–630	1400	7,2–18,5	1,8–2,0

<sup>a</sup>99,99% inaktivácia pri pH 6–9; 90% inaktivácia pri pH 7 a 25 °C

### 3.3. Dávkovanie oxidu chloričitého a limitné koncentrácie

Dávkovanie oxidu chloričitého závisí od kvality surovej vody, od veľkosti vodovodnej distribučnej siete a od požadovanej koncentrácie zvyškového oxidu chloričitého vo vode. Dávky ClO<sub>2</sub> na zdravotné zabezpečenie vody sa spravidla pohybujú v rozmedzí 0,15–0,30 mg l<sup>-1</sup>. Obsah zvyškového oxidu chloričitého v distribučnej sieti by sa mal pohybovať v rozmedzí 0,05–0,20 mg l<sup>-1</sup>. Stanovené limity pre oxid chloričitý a chloritany v pitnej vode nie sú v jednotlivých krajinách jednotné<sup>22</sup> (tabuľka IV).

## 4. Kinetika reakcií oxidu chloričitého – rýchlostné konštanty

Štúdiom kinetiky oxidu chloričitého s anorganickými a organickými látkami, vrátane fenolov sa zaoberal podrobne Hoigné<sup>23</sup>. Namerané rýchlostné konštanty boli vysoké pre dusitany, peroxid vodíka, ozón, jód, železo (II) a v prípadoch, kedy hodnota pH nebola veľmi nízka, pre fenolové zlúčeniny, terciárne amíny a tioly. Bromidy, amoniak, štruktúry obsahujúce nenasýtenú väzbu, aromatické uhľovodíky, primárne a sekundárne amíny, aldehydy, ketóny a uhľovodíky boli nereaktívne za podmienok úpravy vôd.

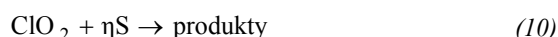
Limitujúcim faktorom pri dávkovaní oxidu chloričitého je to, že sa redukuje na chloritany, ktoré sa považujú za veľmi nebezpečné zo zdravotného hľadiska<sup>24</sup>. So zreteľom na dodržanie tohto obmedzenia sa dávky pri úprave vody pohybujú v rozmedzí 0,04–0,4 mg l<sup>-1</sup>. Pri takto nízkych koncentráciách je stabilita oxidu chloričitého vo vodnom roztoku vysoko závislá na kvalite vody<sup>25</sup>. Preto na úpravu vody sa vo všeobecnosti aplikuje vtedy, keď sa vyznačuje dostatočnou stabilitou pri jeho aplikácii.

Vzhľadom k nízkym dávkam a tým aj nízkym zvyškovým koncentráciám oxidu chloričitého sú dôležité dobré znalosti kinetiky jeho reakcií s polutantmi. V roku 1984, Rav-Acha<sup>26</sup> publikoval rozsiahly prehľad známych reakcií oxidu chloričitého, dôležitých pri úprave vody a dezinfekcii. Okrem toho Neta a spol.<sup>27</sup> zostavil obsiahlu zostavu rýchlostných konštant. Väčšina týchto rýchlost-

ných konštant bola meraná screeningovým programom v laboratórnych podmienkach a boli publikované už skôr. Rav-Acha a spol.<sup>28,29</sup> publikoval ďalšie rýchlostné konštanty pre relatívne pomalé reakcie oxidu chloričitého s rôznymi nenasýtenými uhľovodíkmi, vrátane polycyklických zlúčenín, substituovaných styrenov a indénu. Na doplnenie týchto štúdií sa Hoigné<sup>25</sup> zaoberal meraním rýchlostných konštant reakcií oxidu chloričitého so zlúčeninami, ktoré prichádzali do úvahy pri úprave pitných vôd, vrátane série zlúčenín, ktoré môžu priamo ovplyvňovať kinetiku týchto oxidačných procesov. Ďalej sa zaoberal vývojom a testovaním viac účinných experimentálnych techník na meranie rýchlostných konštant pre reakcie s oxidom chloričitým, ktoré sú aplikovateľné v laboratóriách pitných vôd<sup>23</sup>.

### 4.1. Porovnanie rýchlostných konštant pre rozličné substráty

Pre všeobecnú reakciu oxidu chloričitého so substrátom S:



kde  $\eta$  je stechiometrický faktor určený na základe pomeru:

$$\eta = \Delta[\text{S}]/\Delta[\text{ClO}_2] \quad (11)$$

môžeme zapísať kinetickú rovnicu v tvare:

$$-\frac{d[\text{ClO}_2]}{dt} = k[\text{ClO}_2]^n[\text{S}]^m \quad (12)$$

*Peroxid vodíka* reaguje s oxidom chloričitým prevažne s jeho disociovanou formou HO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Rýchlostná konštant pre reakciu druhého poriadku<sup>23</sup> na vyčerpanie oxidu chloričitého HO<sub>2</sub><sup>-</sup> je 1,3·10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

*Bromidy* sa neoxidujú oxidom chloričitým. Preto úprava vody oxidom chloričitým nepremieňa bromidy na brómnaný a takto nedochádza k tvorbe bromoformu a bromičnanov. Toto je podstatný rozdiel, keď ako oxidant sa použije chlór alebo ozón<sup>30</sup>.

Tabuľka IV  
Limity pre oxid chloričitý a chloritany v pitnej vode

Krajina	Koncentrácia [mg l <sup>-1</sup> ]	
Spojené štáty americké	1,0	- chloritany (najvyššia prípustná hodnota)
	0,8	- chloritany (cieľová, žiadúca hodnota)
	0,8	- oxid chloričitý (zvyškový)
Japonsko	0,6	- chloritany
Veľká Británia	0,5	- suma chloritany, oxid chloričitý, chlorečnany
Nemecko	0,2	- chloritany
	0,4	- oxid chloričitý
Rakúsko	0,2	- chloritany
	0,2	- oxid chloričitý
Česká republika	0,2	- chloritany
	–	- oxid chloričitý
Slovensko	0,2	- chloritany
	0,2	- oxid chloričitý

Jód na rozdiel od bromidov je ľahko oxidovateľný oxidom chloričitým. Rýchlostná konštanta nameraná screeningovým experimentom bola 1400 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

Dusitany sú ľahko oxidovateľné oxidom chloričitým. Dusitany sa môžu vyskytovať vo vode ako metabolický produkt mikrobiologickej kontaminácie a ďalších procesov vyskytujúcich sa počas úpravy vody alebo distribúcie. Prítomnosť dusitanov o koncentráciách 2 μM, môže spotrebovať dávku oxidu chloričitého počas niekoľkých minút. Dôležité je mať na pamäti, že vytvárajúce sa chloritany sú považované za porovnateľne toxické ako dusitany.

Železnaté a mangánaté ióny, tak ako sú prítomné v podzemných vodách a hypolimniu jazier a rezervoárov, taktiež podliehajú oxidácii oxidom chloričitým. Kinetické hodnoty namerané pre Fe(II) pri nízkych hodnotách pH nemohli byť extrapolované do hodnoty pH 8, oxidácia Fe (II) vedie k tvorbe hydroxidu železitého, ktorý mohol rušiť oxidáciu vodnej fázy. V prípade Mn(II) van Benschoten<sup>31</sup> dokázal rozlíšiť rozličné reakčné cesty a určil rýchlostnú konštantu 50 000 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> pre oxidačnú reakciu pri pH 8. Táto konštanta podstatne vzrástla v závislosti od pH, keď bola meraná medzi pH 6–8. Za týchto podmienok sa predpokladá, že MnOH<sup>+</sup> riadi celkovú rýchlosť reakcie skôr ako Mn<sup>2+</sup>.

Ozón ľahko oxiduje chloritany a oxid chloričitý na chlorečnany. Výsledky súhlasia s meraniami podľa Klaning a spol.<sup>32</sup> pre roztoky obsahujúce vysoký prebytok ClO<sub>2</sub>. Pretože chlorečnany sa považujú za toxické, ozonizácia nemôže byť použitá na elimináciu prebytku chloritanov alebo oxidu chloričitého.

Fenolové zlúčeniny reagujú rýchlo s oxidom chloričitým, keď sú prítomné ako fenolátové anióny. Pretože táto disociovaná forma často reaguje miliónkrát rýchlejšie ako

nedisociovaná forma, ich frakcia riadi celkovú rýchlostnú konštantu reakcie. V celom rozpätí pH, celková rýchlostná konštanta reakcie vzrastá pri väčšine fenolových zlúčenín faktorom 10 pri zvýšení pH o jednotku. Vplyvy substituentov na reakčné rýchlostné konštanty fenolov sú rozsiahle. Viac sofistikované analýzy rýchlostných údajov, ako uvádza Tratnyek a Hoigné<sup>33</sup>, dovoľujú interpretovať a zovšeobecňovať výsledky a porovnávať s hodnotami uvádzanými v literatúre.

Organické dusíkaté a sírne zlúčeniny boli testované Hoigné<sup>23</sup> pre lepšie pochopenie, ako interpretovať pre úpravu vody údaje uvádzané v literatúre. Výsledky poukazujú, že nedisociované, mono- a dialkylamíny majú nízke rýchlostné konštanty. Trimetylamin má pri pH 8, celkovú rýchlostnú konštantu 100 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Rýchlostné konštanty sa výrazne zvýšia, keď aminoskupina je nahradená alkylovou skupinou s dlhším reťazcom<sup>27,34</sup>. Na rozdiel od aminoskupín, tiolové skupiny sú ľahšie oxidovateľné oxidom chloričitým<sup>35</sup>.

Rôzne organické nenasýtené a aromatické uhľovodíky, aldehydy, ketóny a karboxylové kyseliny. Metyl, vinyl a alyl substituované zlúčeniny, alebo naftalény majú reakčné rýchlostné konštanty pod 10<sup>-3</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a substituované styrény<sup>36</sup> pod 1 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Karboxylové substituenty nevýznamne zväčšujú reaktivitu alifatických zlúčenín. Preto tieto reakcie s oxidom chloričitým nemajú význam pri úprave vôd. Naopak, polycyklické aromatické uhľovodíky<sup>29</sup>, ako pyrén, majú rýchlostné konštanty niekoľko M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

Huminové kyseliny, zmenou pH o jednotku, reakčné rýchlosti vzrastali faktorom tri (oblasť pH 4–8). Tieto rýchlosti záviseli od koncentrácie oxidu chloričitého a preoxidácie. Z tohto dôvodu nemôžu byť vyjadrené reakčnou rýchlostnou konštantou II. poriadku<sup>23</sup>.

## 5. Záver

Príspevok aktualizuje teoretické poznatky a praktické skúsenosti z hľadiska možností a obmedzení využitia oxidu chloričitého na úpravu vôd. Dosiaľ nie je veľa publikácií zameraných na štúdium oxidu chloričitého ako dezinfekčného činidla, ktorý sa používa pri zdravotnom zabezpečení vody a jeho vplyvu na materiál potrubia.

Dezinfekcia vody oxidom chloričitým je spojená s tvorbou anorganických chloritanov a chlorečnanov, ktorých zdravotné účinky nie sú v súčasnosti ešte úplne poznané. Pri aplikácii oxidu chloričitého v našich podmienkach sa vyskytli ďalšie problémy, ako napr. uvoľňovanie inkrustov a iných usadenín z potrubia spojené so zhoršením senzorických vlastností dodávanej vody, so zvýšením koncentrácií železa a iných kovov vo vode.

K aplikácii oxidu chloričitého často dochádza bez predchádzajúcej analýzy dopadov tohto kroku na kvalitu dodávanej vody a celkové prostredie vodovodného systému. Pri praktických aplikáciách nového spôsobu dezinfekcie sa ako nutnosť javí preskúmať správanie sa oxidu chlo-

ričitého vo vode, poznať kinetiku jeho rozkladu a vplyv na chemickú stabilitu, agresívne vlastnosti vody a definovať podmienky na obmedzenie tvorby vedľajších produktov dezinfekcie. Získanie a doplnenie poznatkov a skúseností pre praktickú aplikáciu oxidu chlórčitého pri úprave vody je nevyhnutné. Cieľom je poukázať na potrebu zaujímať sa o zlučeninu oxidu chlórčitého a získať výsledky umožňujúce objektívne posúdenie jeho aplikovateľnosti v procese úpravy vody.

## LITERATÚRA

- Pontius W. F. (ed.): *Water Quality and Treatment*. American Water Works Association, 4. vyd. McGraw-Hill Inc., New York 1990.
- Cao R., Gu G. W., Huang Z. M., Ye H.: *The Generation, Oxidation and Disinfection of Chlorine Dioxide*, <http://www.clo2.net/en/thesis/generation.phtml>, staženo 14. prosince 2005.
- Pitter P.: *Hydrochemie*. Vydavateľství VŠCHT, Praha 1999.
- Masschelein W. J.: *Unit Processes in Drinking Water Treatment*. Marcel Dekker Inc., New York 1992.
- Richardson S. D.: *Drinking Water Disinfection by-Products*. Meyers RA, New York 1998.
- Richardson S. D., Thruston Jr. A. D., Collette T. W., Schenck-Patterson K., Lykins Jr. B. W., Majetich G., Zhang Y.: *Environ. Sci. Technol.* 28, 592 (1994).
- Dabrowska A., Swietlik J., Nawrocki J.: *Water Res.* 37, 1161 (2003).
- Ivancev-Tumbas I., Dalmacija B.: *Water Res.* 35, 3950 (2001).
- Veshetti E., Cittadini B., Maresca D., Citti G., Ottaviani M.: *Microchem. J.* 79, 165 (2005).
- Long B. W., Husley R. A., Hoehn R. C.: *Ozone Sci. Eng.* 21, 465 (1999).
- Narkis N., Kott Y.: *Water Sci. Technol.* 26, 1483 (1992).
- Lafrance P., Duchesne D., Arcouette N., Prlevost M.: *Chlorine Dioxide: Drinking Water Issues, Proceeding of the second International Symposium, Houston, TX, 1993*. American Water Works Association, Houston, TX, 147, 1993.
- Condie L. W.: *J. Am. Wat. Works Assoc.* 6, 73 (1986).
- Žáček L.: *Chemické a technologické procesy úpravy vody*. NOEL 2000, Brno 1999.
- Sorlini S., Collivignarelli C., Belluati M.: *Conference Proceedings, 2<sup>nd</sup> WEKNOW Conference, June 2005, Bratislava, Slovak Republic*, 144 (2005).
- Raczyk-Stanislawiak U., Swietlik J., Dabrowska A., Nawrocki J.: *Water Res.* 38, 1044 (2004).
- Stevens A.: *Reactions Products of Chlorine Dioxide*. *EHP* 46, 101 (1982).
- Ben Amor H., De Laat J., Dore M.: *Water Res.* 18, 1545 (1984).
- Musquere P.: *Eau Ind.* 58, 37 (1981).
- Hoff J. C., Geldreich E. E.: *Comparison of the Biocidal Efficiency of Alternative Disinfectants, AWWA seminar, Atlanta, Georgia, June 15, 1980*.
- Hoff J. C.: U.S. EPA 600/286/067, U.S. Environmental Protection Agency, 1986.
- Hlaváč J.: *Vodárenství*. Elektronická učebnica, Brno 2003.
- Hoigné J., Bader H.: *Water Res.* 28, 45 (1994).
- Condie L. W.: *Environ. Impact Health Effects* 6, 955 (1990).
- Hoigné J., Bader H.: *Von Wass.* 59, 253 (1982).
- Rav-Acha C.: *Water Res.* 18 (1984).
- Neta P., Huie R. E., Ross A. B.: *J. Phys. Chem.* 17, 1213 (1988).
- Rav-Acha Ch., Bilts R., Grafstein O.: *Environ. Impact Health Effects* 6, 849 (1990).
- Rav-Acha Ch., Chosen E.: *Environ. Sci. Technol.* 21, 1069 (1987).
- Gunten U., Hoigné J.: *Aqua* 41, 299 (1992).
- Benschosten J., Wei L., Knocke W. R.: *Environ. Sci. Technol.* 26, 1327 (1992).
- Klaning U. K., Sehested K., Holcman K.: *J. Phys. Chem.* 89, 760 (1995).
- Tratnyek P. G., Hoigné J.: *Water Res.* 28, 57 (1994).
- Davis G. T., Demek M., Rosenblatt D. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 3321 (1972).
- Noss Ch. I., Hauchman F., Olivieri V.: *Water Res.* 20, 351 (1986).
- Chosen E., Elits R., Rav-Acha Ch.: *Tetrahedron Lett.* 27, 5989 (1986).

**E. Gajdoš<sup>a</sup>, K. Munka<sup>a</sup>, M. Karácsonyová<sup>a</sup>, and J. Dercó<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>Research Institute of Water Management, <sup>b</sup>Department of Chemical and Environmental Engineering, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava): **Application of the Chlorine Dioxide as Disinfection Agent for Potable Water Treatment**

Chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) has been successfully used for taste and odor control, color reduction, and oxidation of inorganics like iron, manganese or sulfur compounds. More recently, the interest has been growing in its use in a variety of applications as an alternative to or supplement of conventional chlorine disinfection. It has been used in conventional water treatment and as a disinfectant in water supply systems. An advantage of using chlorine dioxide is that it does not form halogenated by-products as it is the case with chlorine. Thus it is possible to produce safe, chemically disinfected water without using chlorine or expensive ozone.

## METABOLITY ENDOFYTICKÝCH MIKROORGANIZMOV AKO BIOLOGICKY ÚČINNÉ LÁTKY

MARTINA VALACHOVÁ<sup>a,d</sup>, MARTA MÚČKOVÁ<sup>b</sup> a MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava, <sup>b</sup> VULM, Horná 36, 900 01 Modra, <sup>c</sup> Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, <sup>d</sup> Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava  
martinava@orangemail.sk

Došlo 19.5.06, prepracované 7.12.06, prijaté 17.1.07.

Kľúčové slová: endofytické mikroorganizmy, metabolity, *Taxus* sp., rakovina, antimikrobiálna aktivita

### Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika endofytických mikroorganizmov
3. Aktivita a perspektívy izolovaných metabolitov endofytických mikroorganizmov
  - 3.1. Metabolity endofytov s protinádorovou aktivitou
  - 3.2. Endofytické huby produkujúce metabolity s antimikrobiálnou aktivitou
  - 3.3. Endofytické baktérie produkujúce metabolity s antimikrobiálnou aktivitou
    - 3.3.1. Endofytické streptomycéty produkujúce metabolity s antimikrobiálnou aktivitou
  - 3.4. Metabolity s antivírusovou aktivitou
  - 3.5. Metabolity s imunomodulačným a antioxidačným účinkom
  - 3.6. Metabolity s inou biologickou aktivitou
4. Záver

### 1. Úvod

Prírodné produkty ako materiál pre liečenie chorôb sa využívali už od dávnych čias. Mnohé farmaceuticky významné látky boli izolované z rastlín, živočíchov, húb, morských organizmov a mikroorganizmov. V dôsledku širokého spektra nežiadúcich účinkov liečiv, ďalej nešpecifického mechanizmu účinku a v neposlednom rade aj rezistencie, či už nádorového tkaniva na cytostatikum alebo baktérií na antibiotikum, je neustála potreba vývoja nových,

biologicky účinných látok. Napriek tomu, že chemickou cestou je možné syntetizovať mnoho bioaktívnych látok, výskum zameraný na hľadanie nových, účinných zlúčenín sa orientuje stále viac na prírodné zdroje, ako sú rastliny a mikroorganizmy, ktoré sú bohatým zdrojom substancií rôznych chemických štruktúr a biologických aktivít. Príkladom takýchto biologicky aktívnych látok sú sekundárne metabolity, ktoré sú produkované mikroorganizmami, prípadne vyššími rastlinami. Pre vývoj a život producentov nie sú, na rozdiel od primárnych metabolitov, nevyhnutné. Mnohé sekundárne metabolity boli izolované ako dôležité biologicky účinné látky, ktoré našli svoje uplatnenie pri liečení rôznych chorôb, ako napr. bakteriálne a mykologické infekcie, kardiovaskulárne, nádorové ochorenia<sup>1</sup>.

Nový a zaujímavý zdroj takýchto látok predstavujú endofytické mikroorganizmy, ktoré žijú v pletivách zdravých rastlín. Z približne 300 000 druhov vyšších rastlín, ktoré rastú na Zemi, každá jedna rastlina, z miliardy existujúcich, je hostiteľom jedného alebo viacerých endofytických mikroorganizmov<sup>2</sup>. Táto skupina mikroorganizmov je pomerne ešte málo preskúmaná a predstavuje potenciálny zdroj nových prírodných látok s využitím v medicíne, priemysle a poľnohospodárstve.

### 2. Charakteristika endofytických mikroorganizmov

Endofyty sú mikroorganizmy asociované s vyššími rastlinami. Vyskytujú sa vo všetkých rastlinách – stromoch, bylinách, kvitnúcich rastlinách. Tieto mikroorganizmy zahŕňajú baktérie, najmä aktinomycéty a huby, ktoré žijú pod epidermálnou bunkovou vrstvou v pletivách zdravých rastlín<sup>2,3</sup>.

V minulosti sa predpokladalo, že vnútro zdravých listov rastlín je sterilné, avšak mnohé súčasné výskumy potvrdili, že listy rastlín sa prejavujú ako virtuálne mikrobiálne ekosystémy v rovnakej miere ako napr. rastlinné koreňové systémy<sup>4</sup>. Jednoduchá izolácia mikroorganizmov z rastlinných pletív a ich následná kultivácia na živných pôdach odhaľuje obrovskú rozmanitosť druhov mikroorganizmov žijúcich na povrchu alebo vo vnútri pletív mnohých druhov zdravých rastlín<sup>5</sup>.

Endofytické mikroorganizmy môžu infikovať všetky rastliny. Infekcia rastliny endofytom nastáva na vonkajších pletivách prostredníctvom spór. Endofyty sú prenášané z generácie na generáciu prostredníctvom pletív semien hostiteľskej rastliny alebo časťami rastliny pri jej vegetatívnom rozmnožovaní<sup>5</sup>.

Mnohé endofytické huby patria medzi rody *Ascomycetes* a *Fungi imperfecti*. Adaptácia endofytov k hostiteľskej rastline nastáva na viacerých úrovniach.

Existuje určitá špecifičnosť pre typ pletiva hostiteľskej rastliny a taktiež špecifičnosť pre príslušný druh hostiteľskej rastliny v zmiešanom rastlinnom spoločenstve. Popri mnohých endofytoch, ktoré sú izolované z danej hostiteľskej rastliny, iba málo z nich je typicky dominantných<sup>4</sup>. Veľmi zriedkavá u endofytov je striktná špecifita na hostiteľskú rastlinu. Napríklad *Rhodocline parkeri* je charakteristickým endofytom iba pre jeden druh borovice a nevyskytuje sa v iných druhoch<sup>6</sup>.

Asymptomatický rast endofytických húb v hostiteľovi naznačuje, že endofyty nie sú nebezpečnými parazitmi pre hosťujúcu rastlinu<sup>7</sup>. Ich vzťah k rastlinám môže byť premenlivý, od symbiôzy po parazitizmus<sup>8</sup>. Nepovažujú sa za saprofyty, aj keď sú asociované so žijúcimi pletivami, pretože môžu pozitívne pôsobiť na hostiteľskú rastlinu produkciou značného množstva metabolitov, vrátane hormónov, ako sú auxíny a cytokiníny, ktoré majú vplyv na rast rastlín. Môže ísť o antibakteriálne, antifungálne látky a toxíny, ktoré chránia rastlinu pred škodcami a patogénmi<sup>4,9</sup>. Rastliny poskytujú endofytom živiny potrebné pre ich život a rast, navyše posledné výskumy ukázali, že endofytické huby iniciujú u hostiteľskej rastliny biologickú degradáciu odumretých častí rastlín, prípadne celej rastliny, čím prispievajú ku kolobehu živín v prírode<sup>8</sup>.

Z biotechnologického hľadiska sú endofyty zaujímavé pre ich schopnosť slúžiť ako genetické vektory, prostriedky biologickej kontroly a ako zdroje sekundárnych metabolitov s biologickou aktivitou<sup>10</sup>. Ak mikroorganizmy z rastlín majú potenciál prostredníctvom koevolúcie alebo genetického transferu s ich hostiteľom produkovať fytohormóny, môžu byť tiež schopné tvoriť ďalšie produkty doposiaľ známe ako látky, ktoré syntetizuje hostiteľská rastlina. To poukazuje na reálnu možnosť riešiť produkciu niektorých biologicky aktívnych sekundárnych metabolitov rastlín biotechnologickými metódami<sup>11</sup>.

### 3. Aktivita a perspektívy izolovaných metabolitov endofytických mikroorganizmov

Literárny prieskum endofytických mikroorganizmov potvrdzuje existenciu štruktúrne pestrých produktov týchto mikroorganizmov s rôznou biologickou aktivitou využiteľných v terapii nádorových (tabuľka I), infekčných (tabuľka II) a iných ochorení.

#### 3.1. Metabolity endofytov s protinádorovou aktivitou

Endofytickým mikroorganizmom, ako potenciálnemu zdroju prírodných látok, sa začala venovať intenzívnejšia pozornosť po tom, ako bola u niektorých húb izolovaných z pacifického tisu zistená schopnosť produkovať taxol.

Pôvodne sa predpokladalo, že primárnym zdrojom taxánov je ihličie a vodivé pletivo floém v podkôre stromov *Taxus* sp. Neskôr bola zistená produkcia taxánov aj u iných rastlín ako napr. cyprus *Taxodium distichum*, lie-

ska *Corylus avellana*<sup>8</sup>. Prvým dôkazom, že aj iné organizmy ako rastlinné bunky dokážu produkovať taxány, bolo objavenie mikroorganizmu *Taxomyces andreanae* z triedy *Hyphomycetes*. Endofytická huba bola izolovaná z *Taxus brevifolia* a je schopná produkovať taxoidné metabolity kultiváciou v semisyntetickom kvapalnom médiu, výt'ažky boli však veľmi nízke, 50 ng l<sup>-1</sup> (cit.<sup>11</sup>). Produkcia taxolu bola zaznamenaná okrem endofytu *Taxomyces andreanae* aj u *Periconia* sp., endofytu *Torreya grandifolia*<sup>12</sup> a *Seimatoantlerium nepalense*, endofytu z Himalájskeho tisu *Taxus wallichiana*<sup>13</sup>. Baktérie rodu *Erwinia*, izolované z *Taxus canadensis*, taktiež produkujú taxol a príbuzné taxány kultiváciou na jednoduchom semisyntetickom alebo syntetickom médiu<sup>14</sup>. Navyše, v nedávnych výskumoch zameraných na hľadanie endofytov produkujúcich taxol bol izolovaný mikroorganizmus *Tubercularia* sp., endofyt čínskeho tisu *Taxus mairei*<sup>15</sup> a ďalšie dva endofyty produkujúce taxol *Sporormia minima* a *Trichothecium* sp., oba izolované z *Taxus wallichiana*<sup>16</sup>. Producentom taxolu je aj *Pestalotiopsis guepinii*, endofytická huba izolovaná z borovice *Wollemia nobilis*. Pozoruhodné je, že borovica nie je producentom taxolu. Mikroorganizmus získal schopnosť produkovať taxol pravdepodobne prostredníctvom prenášania spór, ktoré majú tendenciu interagovať s hydrofóbnymi povrchmi, napr. s perím vtákov<sup>17</sup>.

Huby obyčajne častejšie produkujú taxol ako vyššie rastliny a rozšírenie týchto húb produkujúcich taxol nie je obmedzené iba na tis, ale aj na iné druhy rastlín. Z toho možno usúdiť, že ak existuje laterálny transfer génov a taxol má svoj mikrobiálny pôvod, mohol nastať prenos génov zodpovedných za produkciu taxolu práve z mikroorganizmov na vyššie rastliny<sup>3</sup>.

Taxol, začlenený medzi taxány, po chemickej stránke diterpenoid, je účinný proti ľudským nádorovým bunkovým líniam prsníka a vaječníkov a používa sa v klinickej chemoterapii. Mechanizmus účinku taxolu spočíva v antimitotickom pôsobení t.j. napomáha ireverzibilnému zhlukovaniu tubulínu, čo je súčasť mikrotubulov<sup>18</sup>.

Okrem cytotoxickej aktivity bola preukázaná u taxolu aj antifungálna aktivita. Taxol je účinný proti oomycétam, mikroorganizmom spôsobujúcim choroby rastlín. K tejto skupine húb patria rastlinné patogény ako *Phytophthora*, *Pythium* a *Aphanomyces*. Každá z týchto patogénnych húb je mimoriadne citlivá na taxol. Mechanizmus antifungálneho účinku taxolu na rastlinné patogény je identický ako cytotoxický účinok na ľudské nádorové bunky. Zdá sa, že taxol chráni rastliny *Taxus* sp. pred patogénmi, predovšetkým pred oomycétami. V skutočnosti je nemožné nájsť tis, ktorý by bol infikovaný týmito patogénmi<sup>19</sup>.

V súčasnosti najvýznamnejším producentom taxánov je kmeň *Pestalotiopsis microspora* izolovaný z *Taxus wallichiana*. Produkcia taxánov je 1000× väčšia ako u endofytu *Taxomyces andreanae*. *Pestalotiopsis microspora* patrí do pododdelenia *Ascomycotina*, do čeľade *Amphisphaeriaceae*<sup>20</sup>. Predstavitelia rodu *Pestalotiopsis* sp. patria medzi najčastejšie izolované endofytické huby tropických rastlín. Jednou zo zaujímavých vlastností *Pestalotiopsis microspora* a iných druhov tohto rodu je ich

Tabuľka I  
Cytotoxické metabolity endofytických mikroorganizmov

Metabolit	Produkčný mikroorganizmus	Hostiteľský organizmus
Taxol	<i>Taxomyces andreanae</i> <i>Periconia</i> sp. <i>Seimatoantlerium nepalense</i> <i>Tubercularia</i> sp. <i>Sporormia minima</i> <i>Trichothecium</i> sp. <i>Pestalotiopsis microspora</i> <i>Pestalotiopsis guelpinii</i>	<i>Taxus brevifolia</i> <i>Torreya grandifolia</i> <i>Taxus wallichiana</i> <i>Taxus mairei</i> <i>Taxus wallichiana</i> <i>Taxus wallichiana</i> <i>Taxus wallichiana</i> <i>Wollemia nobilis</i>
Kyselina torreyánová	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Torreya taxifolia</i>
Pestalotiopsín A a B	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus brevifolia</i>
Sfingofungín E a F	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> , <i>Torreya grandis</i>
Kurasoín A a B	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> , <i>Torreya grandis</i>
Ergosterol peroxid	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> , <i>Torreya grandis</i>
Saintopin	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> , <i>Torreya grandis</i>
UCE1022	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> , <i>Torreya grandis</i>
(+)-Epiepoxydon	<i>Apiospora montagnei</i>	<i>Polysiphonia violacea</i>
Patulín a cytochalazín E	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Torreya grandis</i>
Brefeldín A	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Torreya grandis</i>
Kyselina oregánová	<i>Nebol identifikovaný</i>	<i>Berberis oregana</i>
Cytoskyrín A	<i>Cytospora</i> sp. CR200	<i>Conocarpus erecta</i>
Hormonemát	<i>Hormonema dematioides</i>	<i>Wollemia</i> sp.
Rubrofuzarín B	<i>Aspergillus niger</i> IFB-E003	<i>Cynodon dactylon</i>
Aspernigerín	<i>Aspergillus niger</i> IFB-E003	<i>Cynodon dactylon</i>
Sekvojamonascín A-D	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Sequoia sempervirens</i>
22-oxa-[12]-cytochalazíny	<i>Rhinocladiella</i> sp.	<i>Tripterium wilfordii</i>

široká genetická a biologická rozmanitosť. Napríklad, z jedného malého konára cyprusu bolo získaných 21 druhov *P. microspora*, z ktorých iba dva boli identické podľa kultivačných a biologických charakteristik<sup>21</sup>. Obrovská variabilita, ktorá existuje v rode *Pestalotiopsis* je dôsledkom mutácií, križenia alebo výmeny genetického materiálu s hostiteľskou rastlinou<sup>3</sup>.

*P. microspora* predstavuje bohatý zdroj látok s biologickou aktivitou. Okrem produkcie taxolu bola zaznamenaná u tejto endofytickej huby aj produkcia iných cytotoxických látok. Príkladom je cytotoxický chinónový dimér – kyselina torreyánová izolovaná z *P. microspora*, endofytu *Torreya taxifolia*<sup>22</sup>. *Pestalotiopsis microspora* izolovaná z *Taxus brevifolia* je producentom karyofylénových seskviterpénov pestalotiopsínu A a B. U týchto látok bol okrem cytotoxickej aktivity zaznamenaný aj imunosupresívny účinok<sup>23</sup>. Výskyt určitého druhu a množstva látky produkovanej hubou *P. microspora* je závislé od kultivácie mikroorganizmu a taktiež od rastlinného zdroja, z ktorého bol endofyt izolovaný<sup>3</sup>. Kôra, floém a xylém ihličnanu *Taxodium distichum* sú ďalším miestom, kde sa *Pestalotiopsis microspora* nachádza. Izoláty

z jednotlivých pletív rastlín sa navzájom líšia mikroskopickými charakteristikami na bežných médiách, priebehom kultivácie a vzniknutými produktmi<sup>21</sup>.

*Taxus mairei* a *Torreya grandis* sú hostiteľmi endofytickej huby *Paecilomyces* sp. Rod *Paecilomyces* zahŕňa viacero druhov, ktoré sú schopné produkovať veľké množstvo sekundárnych metabolitov s rozličnými chemickými štruktúrami a biologickými aktivitami<sup>24</sup>. Medzi známe metabolity produkované uvedeným endofytom patria sfingofungíny E a F inhibujúce serinpalmitoyltransferázy<sup>25</sup>; kurasoín A a B inhibitory farnesyltransferázy<sup>26</sup>; ergosterol peroxid s cytotoxickou aktivitou<sup>27</sup>; protinádorové antibiotiká saintopin a UCE1022. Metabolit UCE1022 je inhibítorom topoizomerázy I a je cytotoxický na ľudské nádorové bunky krčka maternice HeLa *in vitro*<sup>28</sup>. Saintopin je inhibítorom topoizomerázy II. Cytotoxický účinok bol preukázaný na ľudských nádorových bunkách HeLa *in vitro* a myších leukemických bunkách P388 *in vivo*. Okrem protinádorového účinku vykazuje saintopin aj slabú antimikrobiálnu aktivitu proti grampozitívnym baktériám<sup>29</sup>. Inými cytotoxickými látkami sú paecilochinóny A, B, C, D, E a F izolované z kmeňa *Paecilomyces carneus*. Tieto

Tabuľka II  
Antimikrobiálne metabolity endofytických mikroorganizmov

Metabolit	Produkčný mikroorganizmus	Hostiteľská rastlina
Kryptokandín	<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	<i>Tripterygeum wilfordii</i>
Kryptocín	<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	<i>Tripterygeum wilfordii</i>
Petalosid	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Torreya taxifolia</i>
Pestalopyrón Hydroxypestalopyrón	<i>Pestalotiopsis microspora</i> <i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Torreya taxifolia</i> <i>Torreya taxifolia</i>
Enfumafungín	<i>Hormonema</i> sp.	<i>Juniperus communis</i>
Pentaketid CR377	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Selaginella pallescens</i>
Leucinostatín A	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Taxus baccata</i>
Leucinostatín A, D, H, K	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> , <i>Torreya grandis</i>
Beauvericín	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> , <i>Torreya grandis</i>
Beauvericín A	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> , <i>Torreya grandis</i>
Dihydroizokumarínové deriváty	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Crassocephalum crepidioides</i>
Kyselina koletotriová	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Artemisia mongolica</i>
Dicerandról A, B a C	<i>Phomopsis longicolla</i>	<i>Dicerandra frutescens</i>
Altersolanol A	<i>Phoma</i> sp.	<i>Taxus wallachiana</i>
Kyselina 2-hydroxy-6-metylbenzoová	<i>Phoma</i> sp.	<i>Taxus wallachiana</i>
Fomopsichalazín	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Salix gracilostyla</i> var. <i>melanostachys</i>
Kyselina cytónová A a B	<i>Cytonaema</i> sp.	<i>Quercus</i> sp.
Munumbicín A, B, C, D	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 3052	<i>Kennedia nigricans</i>
Kakadumycín	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30566	<i>Grevillea pteridifolia</i>
Alnumycín	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Alnus glutinosa</i>
Ekomycín	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	rôzne druhy tráv
Pseudomycín	<i>Pseudomonas</i> sp.	rôzne druhy rastlín
Oocydín	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Rhyncholacis pedicillata</i>

antrachinóny sú inhibítormi bunkového receptora s tyrozínkinázovou aktivitou ERF (epidermový rastový faktor), ktorý stimuluje proliferáciu a transformáciu epidermových a viacerých iných druhov buniek<sup>30</sup>.

*Apiospora montagnei*, endofyt morskej riasy *Polysiphonia violacea* produkuje spolu s ďalšími sekundárnymi metabolitmi aj cytotoxický (+)-epiepoxydon účinný proti viacerým ľudským nádorovým bunkovým líniam ako HM02 (ľudský karcinóm žalúdka), HepG2 (ľudský hepatokarcinóm) a MCF7 (ľudský adenokarcinóm prsníka)<sup>31</sup>.

*Aspergillus clavatus* je endofytom *Torreya grandis*. Produkuje mykotoxíny patulín a cytochalazín E. *Aspergillus clavatus* H-037 a *Paecilomyces* sp. H-036 kultiváciou v kvapalnom médiu produkujú 16členné makrolidové antibiotikum brefeldín A, ktoré má antifungálnu, antivirálnu a cytotoxickú aktivitu<sup>24</sup>. Brefeldín A pôsobí na rôzne typy ľudských nádorových buniek. Okrem uvedených endofytov je brefeldín A produkovaný aj ďalšími hubami ako *Alternaria*, *Ascochyta*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Cercospora* a *Phyllosticta*<sup>32</sup>.

Protinádorovou látkou izolovanou z extraktu endofy-

tickej huby z rastliny *Berberis oregana* je kyselina oregánová. Jej cytotoxický účinok spočíva v inhibícii FPT-ázy (farnesyl-proteín transferázy). Huba bola izolovaná z povrchovo sterilizovaných listov *Berberis oregana* v Kalifornii. Mikroorganizmus nebol identifikovaný, pretože v laboratórnych podmienkach nesporuluje<sup>33</sup>.

Cytoskyrín A je bisantrachinón produkovaný endofytickou hubou *Cytospora* sp. CR200, ktorá bola izolovaná z konára stromu *Conocarpus erecta*. Metabolit sa vyznačuje cytotoxickým účinkom, ktorý spočíva v inhibícii syntézy DNA<sup>34</sup> a aktivitou proti patogénom ako *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*<sup>35</sup>.

*Hormonema dematioides* je endofytická huba izolovaná z ihličia borovice. Mikroorganizmus produkuje cytotoxickú látku hormonemát účinný proti rôznym ľudským nádorovým bunkám hrubého čreva COLO-320, DLD-1, HT-29 a proti ľudským nádorovým bunkovým líniam HL-60 (ľudské leukemické bunky), HepG2, MCF-7 a HeLa S3. Tento cytotoxický metabolit indukuje tiež apoptózu (bunkovú smrť) u ľudských nádorových kolorektálnych buniek COLO-320 (cit.<sup>36</sup>).

Cytotoxickou aktivitou sa vyznačuje aj nafto-gamma-pyrón rubrofuzarín B produkovaný kmeňom *Aspergillus niger* IFB-E003, ktorý bol izolovaný z rastliny *Cynodon dactylon*. Rubrofuzarín B preukázal cytotoxický účinok na ľudskú nádorovú bunkovú líniu hrubého čreva SW1116. Navyše, u metabolitu bol zaznamenaný aj antimikrobiálny účinok na niektoré ľudské patogény<sup>37</sup>. Uvedený kmeň je tiež producentom alkaloidu aspernigerínu, ktorý sa vyznačuje cytotoxickým účinkom na ľudské nádorové bunkové línie HeLa a SW1116 (cit.<sup>38</sup>).

Produkcia cytotoxických látok bola zaznamenaná aj u endofytu *Aspergillus parasiticus* izolovaného z kôry stromu *Sequoia sempervirens*. Mikroorganizmus produkuje nové protinádorové metabolity sekvojamonascíny A–D (cit.<sup>39</sup>).

Endofytické huby sú producentmi aj alkaloidov. Rody *Xylaria*, *Phoma*, *Hypoxyton* a *Chalara* produkujú relatívne veľkú skupinu látok známych ako cytochalazíny, ktorých je v súčasnosti známych viac ako 20. Mnohé z týchto látok majú protinádorovú a antibiotickú aktivitu, ale v dôsledku ich bunkovej toxicity sa nepoužívajú ako liečivá. V nedávnej dobe boli objavené tri nové cytochalazíny, produkované *Rhinochadiella* sp., endofytom *Tripterium wilfordii*. Tieto látky s protinádorovou aktivitou boli označené ako 22-oxa-[12]-cytochalazíny<sup>40</sup>. Prehľad metabolitov vyznačujúcich sa protinádorovým účinkom je sumarizovaný v tabuľke I.

### 3.2. Endofytické huby produkujúce metabolity s antimikrobiálnou aktivitou

Biologický význam endofytických mikroorganizmov spočíva aj v produkcii antimykotických látok, ktoré chránia rastlinu pred jej patogénmi. *Cryptosporiopsis quercina* je imperfektným štádiom *Pezizula cinnamomea*, endofytu asociovaného s liečivou rastlinou *Tripterium wilfordii*. *Cryptosporiopsis quercina* preukazuje výraznú antifungálnu aktivitu proti mnohým patogénnym hubám ako sú *Candida albicans* a *Trichophyton* sp.. Endofyt *C. quercina* produkuje antifungálny peptid kryptokandín, príbuzný známym antimykotikám ako sú echinokandíny a pneumokandíny. Kryptokandín je účinný taktiež proti mnohým fungálnym rastlinným patogénom a proti mnohým hubám spôsobujúcim ochorenia ľudí<sup>41</sup>. *Cryptosporiopsis quercina* produkuje aj kyselinu tetrámovú – kryptocín účinný proti *Pyricularia oryzae* a ďalším fungálnym patogénom rastlín<sup>42</sup>.

Inými antifungálnymi látkami izolovanými z endofytov je aromatický  $\beta$ -glukozid – pestalozid a dva pyróny – pestalopyrón a hydroxypestalopyrón. Producentom uvedených metabolitov je endofytická huba *Pestalotia microspora* izolovaná z *Torreya taxifolia*<sup>43</sup>.

Endofyt rodu *Hormonema* sp. izolovaný z listov *Juniperus communis* produkuje antifungálny metabolit enfumafungín. Tento triterpénový glykozid preukázal *in vitro* výrazný účinok proti patogénom ako *Candida* sp. a *Aspergillus* sp.<sup>44</sup>. Metabolit pentaketid CR377 izolovaný

z *Fusarium* sp., endofytickej huby asociovanej s rastlinou *Selaginella pallescens* sa vyznačuje účinkom proti kvasinke *Candida albicans*, ktorá spôsobuje ochorenie kandidózu<sup>45</sup>. Mikromycéta rodu *Paecilomyces* sp., endofyt *Taxus mairei* a *Torreya grandis* je producentom peptidových antibiotík leucinostatínov A, D, H a K, ktoré sú účinné proti grampozitívnym baktériám a hubám<sup>46</sup> a tiež cyklodepsipeptidov beauvericínu a beauvericínu A, ktoré sa vyznačujú antimykobakteriálnou aktivitou a účinkom proti pôvodcovi malárie *Plasmodium* sp.<sup>47</sup>. Producentom leucinostatínov je tiež endofytická huba *Acremonium* sp. izolovaná z európskeho tisu *Taxus baccata*. Leucinostatín A je účinný hlavne proti oomycétam, ktoré sú patogénnymi rastlin<sup>48</sup>.

Antimikrobiálna aktivita bola zistená u troch nových dihydroizokumarínových derivátov izolovaných z *Geotrichum* sp., endofytickej huby *Crassocephalum crepidioides*. Tieto látky sú účinné proti *Candida albicans*, *Plasmodium falciparum* pôvodcovi malárie a proti *Mycobacterium tuberculosis*<sup>49</sup>.

*Muscodor albus* je endofytická huba izolovaná z malých konárov škoricovníka *Cinnamomum zeylanicum*. Uvedený endofyt produkuje zmes prchavých látok, ktoré efektívne pôsobia proti iným hubám a baktériám. Väčšina z týchto látok bola identifikovaná plynovou chromatografiou / hmotnostnou spektrometriou a napokon bola testovaná ich biologická aktivita. U každej z piatich skupín prchavých látok produkovaných *M. albus* (alkoholy, estery, ketóny, kyseliny a lipidy) bola stanovená inhibičná aktivita proti rastu testovaných húb a baktérií, ale u žiadnej nebol zaznamenaný letálny účinok. Avšak spolupôsobením týchto látok došlo k usmrteniu širokého spektra rastlinných a ľudských patogénnych húb a baktérií. Najviac efektívnu skupinu z týchto látok predstavujú estery, z ktorých izoamyl acetát je najúčinnjší<sup>50</sup>.

Antimikrobiálna aktivita bola zaznamenaná aj u kyseliny koletotriovej, ktorá je produkovaná endofytickou hubou *Colletotrichum gloeosporioides* asociovanou s rastlinou *Artemisia mongolica*. Táto látka je účinná proti baktériám *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* a patogénnej hube *Helminthosporium sativum*<sup>51</sup>.

Dicerandróly A, B a C izolované z huby *Phomopsis longicolla*, ktorá je endofytom *Dicerandra frutescens*, sú antibakteriálne metabolity účinné proti *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*<sup>52</sup>.

*Phoma* sp. je endofytická huba asociovaná s Nepálskym tisom *Taxus wallachiana*. Produkuje dve antibiotiká altersolanol A a kyselinu 2-hydroxy-6-metylbenzoovú. Altersolanol A má širšie spektrum účinnosti, pôsobí proti grampozitívnym i gramnegatívnym baktériám ako sú *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus* sp.<sup>9</sup>.

Antibakteriálnu aktivitu preukazuje aj fomopsichalazín, metabolit endofytu *Phomopsis* sp., ktorý bol izolovaný z konára *Salix gracilostyla* var. *melanostachys*. Uvedený metabolit je účinný proti *Bacillus subtilis*, *Salmonella gallinarum* a *Staphylococcus aureus*. Fomopsichalazín sa vyznačuje strednou aktivitou proti kvasinke *Candida tropicalis*<sup>53</sup>.



### 3.3. Endofytické baktérie produkujúce metabolity s antimikrobiálnou aktivitou

Nielen endofytické huby sa vyznačujú produkciou antimikrobiálnych látok, ale taktiež u endofytických baktérií sa zaznamenala produkcia antimikrobiálnych metabolitov. Príkladom sú ekomycíny produkované mikroorganizmami *Pseudomonas viridiflava* zo skupiny fluoreskujúcich baktérií asociovaných s rastlinami. Osídľujú listy mnohých druhov tráv a žijú na povrchu alebo vo vnútri pletív. Ekomycíny predstavujú skupinu nových lipopeptidov, ktoré obsahujú vo svojich štruktúrach okrem obvyklých aminokyselín ako alanín, serín, treonín a glycín i nezvyčajné aminokyseliny ako homoserín a kyselinu  $\beta$ -hydroxyasparagóvu. Ekomycíny sú účinné proti patogénom *Cryptococcus neoformans* a *Candida albicans*<sup>54</sup>.

Pseudomycíny, metabolity produkované pseudomonádami asociovanými s rastlinami, predstavujú skupinu antifungálnych peptidov. Vyznačujú sa účinkom proti rastlinným patogénom *Ceratocystis ulmi*, *Mycosphaerella fijiensis* a ľudským patogénom ako *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*. Tieto metabolity sú cyklické depsipeptidy vznikajúce acyláciou OH skupiny *N*-koncového serínu s koncovou karboxylovou skupinou L-chlorotreonínu. Pseudomycíny obsahujú viaceré netradičné aminokyseliny ako L-chlorotreonín, kyselinu L-hydroxyasparagóvu a obe kyseliny D- a L-diamino-*n*-butánové<sup>55</sup>.

Pôvodne ako antimykotická látka bol izolovaný oocydín zo *Serratia marcescens*, endofytu vodnej rastliny *Rhynholacis pedicillata*. Oocydín je chlórovaný makrocyclický laktón účinný proti rastlinným patogénnym oomycétam *Pythium ultimum*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora cinnamomi* a *Phytophthora citrophora*<sup>56</sup>.

#### 3.3.1. Endofytické streptomycéty produkujúce metabolity s antimikrobiálnou aktivitou

Rod *Streptomyces* sp. je známym producentom sekundárnych metabolitov rozmanitých chemických štruktúr. Podobne ako u húb aj u týchto vláknitých baktérií bola zaznamenaná asociácia s vyššími rastlinami.

Príkladom je kmeň *Streptomyces* sp. NRRL 3052, ktorý je endofytom liečivej rastliny *Kennedia nigriscans* vyskytujúca sa v severnej Austrálii. Kmeň produkuje peptidové antibiotiká munumbicíny A, B, C a D so širokým spektrom účinku proti mnohým ľudským ale aj rastlinným patogénnym hubám a baktériám. Vo všeobecnosti munumbicíny sú účinné proti grampozitívnym baktériám ako *Bacillus anthracis* a *Mycobacterium tuberculosis*. Jednotlivé munumbicíny majú rozličnú biologickú aktivitu na patogénne mikroorganizmy. Munumbicín B je účinný proti *Staphylococcus aureus*, kým munumbicín A nie je aktívny proti tomuto patogénu. Najúčinnější je munumbicín D, aktívny proti *Plasmodium falciparum*, parazitu spôsobujúceho maláriu<sup>57</sup>.

Iný endofyt *Streptomyces* sp. NRRL 30566, izolovaný z *Grevillea pteridifolia*, produkuje antibiotiká kakadumycíny príbuzné echinomycínom. Kakadumycín A má po-

dobné spektrum účinnosti ako munumbicín D, predovšetkým proti grampozitívnym baktériám. Mechanizmus účinku antibiotika spočíva v inhibícii RNA syntézy<sup>58</sup>.

Alnumycín je antimikrobiálny metabolit produkovaný endofytickým mikroorganizmom *Streptomyces* sp. izolovaným z rastliny *Alnus glutinosa*. Nové naftochinónové antibiotikum je účinné proti grampozitívnym baktériám *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus* sp. a *Arthrobacter crystallopoites*. Okrem antibakteriálnej aktivity bol u alnumycínu zaznamenaný aj cytotoxický účinok na ľudské leukemické bunky K562 (cit.<sup>59</sup>). Antimikrobiálne metabolity produkované endofytickými mikroorganizmami sú sumarizované v tabuľke II.

#### 3.4. Metabolity s antivírusovou aktivitou

Iné možné využitie sekundárnych metabolitov endofytických mikroorganizmov vyplýva z ich schopnosti inhibovať vírusy. Takýmito metabolitmi sú kyselina cytónová A a B produkované endofytickou hubou *Cytospora* sp., ktorá bola izolovaná z rastliny *Quercus* sp. Látky po chemickej stránke možno označiť ako *p*-tridepsidy a vyznačujú sa inhibičným účinkom na ľudský cytomegalovírus (hCMV, cit.<sup>60</sup>).

#### 3.5. Metabolity s imunomodulačným a antioxidičným účinkom

Sekundárne metabolity endofytických mikroorganizmov sa okrem protinádorovej a antibiotickej aktivity vyznačujú aj schopnosťou ovplyvňovať reakcie imunitného systému. Imunosupresívne látky sa využívajú pri transplantáciách orgánov, kde je potrebné znížiť imunitu pacienta a tiež pri liečbe autoimúnnych ochorení, ako je napríklad reumatická artritída, pri ktorých funguje obranná schopnosť abnormálne. Takýmto účinkom sa vyznačujú etylacetátové extrakty z endofytických húb *Pestalotiopsis leucothes*, *Mucor* sp., *Verticillium* sp. a *Pestalotiopsis disseminata* izolované z čínskej liečivej rastliny *Tripterium wilfordii*. Uvedené extrakty preukázali výraznú antiproliferačnú aktivitu na ľudské periférne krvné mononukleárne bunky PBMC (cit.<sup>61</sup>). Výrazný imunosupresívny účinok z uvedených producentov preukázal endofyt *Pestalotiopsis leucothes*, konkrétne jeho metabolit označený ako BS, ktorý inhibuje produkciu cytokínov ako interleukín (IL)-1beta, IL-2, interferón (IFN)-gamma a tumor nekrotizujúci faktor (TNF)-alfa. Uvedená látka sa vyznačuje miernou inhibíciou imunoglobulínu (Ig) G a M (cit.<sup>62</sup>). Schopnosť potláčať imunitnú reakciu organizmu majú tiež metabolity subglutínol A a B, produkované endofytickou hubou *Fusarium subglutinans*, ktorá bola izolovaná z rovnakého druhu čínskej liečivej rastliny *Tripterium wilfordii*. V dôsledku toho, že subglutínoly nie sú toxické, môžu nájsť uplatnenie v medicínskej praxi<sup>63</sup>.

V prevencii rôznych ochorení zohrávajú významnú úlohu látky, ktoré aktivujú mechanizmy imunitného systému alebo sa podieľajú na eliminovaní škodlivých látok

v organizme. Podobný účinok majú antioxidanty, ktoré neutralizujú škodlivé voľné radikály vznikajúce v organizme ako vedľajší produkt premeny látok v bunkách. Antioxidačná aktivita bola stanovená u pestacínu a izopestacínu izolovaných z *Pestalotiopsis microspora*, endofyту rastliny *Terminalia morobensis*<sup>64</sup>.

Aurasperón A, produkovaný endofytickou hubou *Aspergillus niger* IFB-E003 asociovanou s rastlinou *Cynodon dactylon*, vykazuje taktiež antioxidačnú aktivitu. Metabolit sa vyznačuje výrazným inhibičným účinkom na xantinoxidázu, ktorá zabráňuje tvorbe voľných radikálov<sup>37</sup>.

### 3.6. Metabolity s inou biologickou aktivitou

L-783, 281 je chinón produkovaný endofytickou hubou *Pseudomassaria* sp., ktorá bola izolovaná z rastliny rastúcej v africkom dažďovom pralesi v blízkosti Kinshasa. Táto látka pôsobí podobne ako polypeptidový hormón inzulín, znižuje hladinu glukózy v krvi u diabetických myši. Na rozdiel od inzulínu, metabolit L-783, 281 nie je rozkladaný v zažívacom trakte a z toho dôvodu môže byť podávaný perorálne<sup>65</sup>.

Producentom metabolitu lipohexín je endofytická huba rodu *Paecilomyces* sp., ktorej niektoré zaujímavé bioaktívne sekundárne metabolity boli opísané vyššie. Lipohexín sa vyznačuje inhibičným účinkom na enzým prolylendopeptidázu, ktorý sa podieľa na patológii Alzheimerovej choroby. Funkcia prolylendopeptidázy spočíva v degradácii hormónov nachádzajúcich sa v mozgu a ovplyvňujúcich pamäť a schopnosť učiť sa<sup>66</sup>.

## 4. Záver

Endofytické mikroorganizmy patria do málo preskúmanej skupiny biosystémov. Najväčší problém v hľadaní nových druhov endofytických mikroorganizmov pre štúdium ich vzťahu k hostiteľskej rastline ako aj pre izoláciu nových látok spočíva v správnom výbere hostiteľskej rastliny spomedzi tisícok druhov rastlín na Zemi. Doteraz uskutočnené štúdie o endofytických mikroorganizmoch naznačujú, že endofyty sú bohatým a zaujímavým zdrojom bioaktívnych a chemicky rôznorodých látok s potenciálom pre využitie v medicíne, poľnohospodárstve a priemysle. Výskum zameraný na hľadanie nových druhov endofytov sa orientuje na rastliny, u ktorých je známa produkcia bioaktívnych látok, nakoľko endofytické mikroorganizmy majú podobné biochemické procesy ako príslušná hostiteľská rastlina a produkujú rovnaké, prípadne biologicky účinnejšie metabolity ako hostiteľ. Táto skutočnosť je overená taxolom, ktorý je produkovaný nielen tisom, ale aj radom endofytických mikroorganizmov izolovaných z tisu a iných rastlín. To poukazuje na možnosť riešiť produkciu bioaktívnych látok rastlín mikroorganizmami, nakoľko kultivácia mikroorganizmov je jednoduchšia v porovnaní s pestovaním vyšších rastlín. Zaujímavý zdroj endofytov predstavujú i endemické rastliny rastúce vo

vlhkých, teplých podnebiach, rastliny dažďových pralesov, ktoré môžu byť zdrojom nových, doposiaľ neznámych biologicky účinných látok.

Je nevyhnutné, aby výskum pokračoval ďalšími štúdiami v oblasti endofytov, ich asociácií k určitým druhom rastlín, nakoľko zistené výsledky môžu pomôcť pri hľadaní, výbere hostiteľskej rastliny a taktiež využití produktov týchto mikroorganizmov tak v medicíne ako aj iných odvetviach.

## LITERATÚRA

1. Gragg G. M., Boyd M. R., Khanna R., Kneller R., Mays T. D., Mazan K. D., Newman D. J., Sausville E. A.: *Pure Appl. Chem.* 71, 1619 (1999).
2. Strobel G. A., Daisy B., Castillo U., Harper J.: *J. Nat. Prod.* 67, 257 (2004).
3. Strobel G. A.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 22, 315 (2002).
4. Clay K.: *Nat. Toxins* 1, 147 (1992).
5. Carroll G.: *Ecology* 1, 2 (1988).
6. Larran S., Rollan C., Angeles H. B., Alippi H. E., Urrutia M. I.: *Invest. Arg. Prod. Prot. Veg.* 17, 173 (2002).
7. Clay K.: *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 275 (1990).
8. Strobel G. A.: *Can. J. Plant Pathol.* 24, 14 (2002).
9. Yang X., Strobel G. A., Stierle A., Hess W. M., Lee J., Clardy J.: *Plant Sci.* 102, 1 (1994).
10. Strobel G. A.: *Pharmacol. News* 3, 7 (1996).
11. Stierle A., Strobel G. A., Stierle D.: *Science* 260, 214 (1993).
12. Li J. Y., Sidhu R. S., Ford E., Hess W. M., Strobel G. A.: *J. Ind. Microbiol.* 20, 259 (1998).
13. Bashyal B., Li J. Y., Strobel G. A., Hess W. M.: *Mycotaxon* 72, 33 (1999).
14. Page M., Landry N.: US Patent 5561055 (1996).
15. Wang J., Li G., Lu H., Zheng Z., Huang Y., Su W.: *FEMS Microbiol. Lett.* 193, 249 (2000).
16. Shrestha K., Strobel G. A., Prakash S., Gewali M.: *Planta Med.* 67, 374 (2001).
17. Li J. Y., Ford E., Sears J., Sidhu R. S., Summereli B.: *Aust. J. Bot.* 45, 1075 (1998).
18. Schiff P. B., Horowitz S. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1561 (1980).
19. Young D. H., Michelotti E. J., Sivendell C. S., Krauss N. E.: *Experientia* 48, 882 (1992).
20. Strobel G. A., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhur R. S., Hess W. M.: *Microbiology* 142, 435 (1996).
21. Li J. Y., Strobel G. A., Sidhu R., Hess W. M., Ford E.: *Microbiology* 142, 2223 (1996).
22. Lee J. C., Strobel G. A., Lobkovsky E., Clardy J. C.: *J. Org. Chem.* 61, 3232 (1996).
23. Pulici M., Sugawara F., Koshino H., Uzawa J., Yoshida S., Lobkovsky E., Clardy J.: *J. Org. Chem.* 61, 2122 (1996).
24. Wang J., Huang Y., Fang M., Zhang Y., Zheng Z., Zhao Y., Su W.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34, 51 (2002).
25. Horn W. S., Smith J. L., Bills G. F., Raghoobar S. L.,

- Helms G. L., Kurtz M. B., Marrinan J. A., Frommer B. R., Thornton R. A., Mandala S. M.: *J. Antibiot.* **45**, 1692 (1992).
26. Uchida R., Shiomi K., Inokoshi J., Masuma R., Kawakubo T., Tanaka H., Iwai Y., Omura S.: *J. Antibiot.* **49**, 932 (1996).
27. Nam K. S., Jo Y. S., Kim Y. H., Hyun J. W., Kim H. W.: *Life Sci.* **69**, 229 (2001).
28. Fujii N., Yamashita Y., Ando K., Agatsuma T., Saitoh Y., Gomi K., Nishiie Y., Nakano H.: *J. Antibiot.* **47**, 949 (1994).
29. Yamashita Y., Saith Y., Ando K., Takahashi K., Ohno H., Nakano H.: *J. Antibiot.* **43**, 1344 (1990).
30. Petersen F., Fredenhagen A., Mett H., Lydon N. B., Delmendo R., Jenny H. B., Peter H. H.: *J. Antibiot.* **48**, 191 (1995).
31. Klemke CH., Kehraus S., Wright A. D., Konig G. M.: *J. Nat. Prod.* **67**, 1058 (2004).
32. Vurro M., Evidente A., Andolfi A., Zonno M. C., Giordano F., Motta A.: *Plant Sci.* **138**, 67 (1998).
33. Jayasuriya H., Bills G. F., Cascales C., Zink D. L., Goetz M. A., Jenkins R. G., Silverman K. C., Lingham R. B., Singh S. B.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 2081 (1996).
34. Brady S. F., Singh M. P., Janso J. E., Clardy J.: *Org. Lett.* **25**, 1047 (2000).
35. Jadulco R., Brauers G., Edrada R. A., Ebel R., Wray V., Sudarsono S., Proksch P.: *J. Nat. Prod.* **65**, 730 (2002).
36. Filip P., Weber R. W., Sterner O., Anke T.: *Z. Naturforsch.* **58**, 547 (2003).
37. Song Y. C., Li H., Ye Y. H., Shan C. Y., Yang Y. M., Tan R. X.: *FEMS Microbiol. Lett.* **241**, 67 (2004).
38. Shen L., Ye Y. H., Wang X. T., Zhu H. L., Xu C., Song Y. C., Li H., Tan R. X.: *Chemistry* **12**, 4393 (2006).
39. Stierle D. B., Stierle A. A., Bugni T.: *J. Org. Chem.* **12**, 4966 (2003).
40. Wagenaar M., Corwin J., Strobel G. A., Clardy J.: *J. Nat. Prod.* **63**, 1692 (2000).
41. Strobel G. A., Miller R. V., Miller C., Condrón M., Teplow D. B., Hess W. M.: *Microbiology* **145**, 1919 (1999).
42. Li J., Strobel G. A., Harper J., Lobkovsky E., Clardy J.: *Org. Chem.* **2**, 767 (2000).
43. Lee J. C., Yang X., Schwartz M., Strobel G. A., Clardy J.: *J. Chem. Biol.* **2**, 721 (1995).
44. Pelaez F., Cabello A., Platas G., Diez M. T., Gonzalez del Val A., Basilio A., Martan I., Vicente F., Bills G. E., Giacobbe R. A., Schwartz R. E., Onish J. C., Meinz M. S., Abruzzo G. K., Flattery A. M., Kong L., Kurtz M. B.: *Syst. Appl. Microbiol.* **23**, 333 (2000).
45. Brady S. F., Clardy J.: *J. Nat. Prod.* **63**, 1447 (2000).
46. Mori Y., Tsuboi M., Suzuki M., Fukushima K., Arai T.: *J. Antibiot.* **35**, 543 (1982).
47. Nilanonta C., Palittapongarnpim P., Kamchonwongpaisan S., Isaka M., Pittayakhajonwut D., Kittakoop P., Tanticharoen M.: *Planta Med.* **66**, 756 (2000).
48. Strobel G. A., Torczynski R., Bollon A.: *Plant Sci.* **128**, 97 (1997).
49. Kongsaree P., Prabpai S., Sriubolmas N., Vongvein C., Wiyakrutta S.: *J. Nat. Prod.* **5**, 709 (2003).
50. Strobel G. A., Dirksie E., Sears J., Markworth C.: *Microbiology* **147**, 2943 (2001).
51. Zou W. X., Meng J. C., Lu H., Chen G. X., Shi G. X., Zhang T. Y., Tan R. X.: *J. Nat. Prod.* **63**, 1529 (2000).
52. Wagenaar M., Clardy J.: *J. Nat. Prod.* **64**, 1006 (2001).
53. Horn W. S., Simmonds M. S. J., Schwartz R. E., Blaney W. M.: *Tetrahedron* **14**, 3969 (1995).
54. Miller R. V., Miller C. V., Garton-Kinney D., Redgrave B., Sears J., Condrón M., Teplow D., Strobel G. A.: *J. Appl. Microbiol.* **84**, 937 (1998).
55. Ballio A., Bossa F., DiGioglio P., Ferranti P., Paci M., Pucci P., Scaloni A., Segre A., Strobel G. A.: *FEBS Lett.* **355**, 96 (1994).
56. Strobel G. A., Li J. Y., Sugawara F., Koshino H., Harper J., Hess W. M.: *Microbiology* **145**, 3557 (1999).
57. Castillo U. F., Strobel G. A., Ford E. J., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Albert H., Robison R., Condrón A. M., Teplow D. B., Stevens D., Yaver D.: *Microbiology* **148**, 2675 (2002).
58. Castillo U., Harper J. K., Strobel G. A., Sears J., Alesi K., Ford E., Lin J., Hunter M., Maranta M., Ge H., Yaver D., Jensen J. B., Porter H., Robison R., Millar D., Hess W. M., Condrón M., Teplow D.: *FEMS Microbiol. Lett.* **224**, 183 (2003).
59. Bieber B., Nuske J., Ritzau M., Grafe U.: *J. Antibiot.* **51**, 381 (1998).
60. Guo B., Dai J., Ng S., Huang Y., Leong C., Ong W., Carte B. K.: *J. Nat. Prod.* **63**, 602 (2000).
61. Siva Sundara Kumar D., Cheung H. Y., Lau C. S., Chen F., Hyde K. D.: *J. Ethnopharmacol.* **94**, 295 (2004).
62. Kumar D. S., Lau C. S., Wan J. M., Yang D., Hyde K. D.: *Life Sci.* **78**, 147 (2005).
63. Lee J. C., Lobkovsky E., Pliam N. B., Strobel G. A., Clardy J.: *J. Org. Chem.* **60**, 7076 (1995).
64. Strobel G. A., Ford E., Worapong J., Harper J. K., Arif A. M., Grant D., Fung P. C. W., Chan K.: *Phytochemistry* **60**, 179 (2002).
65. Zhang B., Salituro G., Szalkowski D., Li Y., Royo I., Vilella D., Diez M. T., Pelaez F., Ruby C., Kendall R. L., Mao X., Griffin P., Calaycay J., Zierath J. R., Heck J. V., Smith R. G., Moller D. E.: *Science* **284**, 974 (1999).
66. Heinse S., Ritzau M., Ihnwulsmann H., Schlegel B., Dornberger K., Fleck W. F., Zerlin M., Christner C., Grafe U., Kullertz G., Fischer G.: *J. Antibiot.* **50**, 379 (1997).

**M. Valachová<sup>a,d</sup>, M. Múčková<sup>b</sup>, and M. Šturdíková<sup>c</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Biotechnology, Faculty of Natural Sciences, University of Saint Cyril and Method, Trnava*, <sup>b</sup> *Drug Research Institute, VULM Co., Modra*, <sup>c</sup> *Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava*, <sup>d</sup> *Food Research Institute, Bratislava*): **Metabolites of Endophytic Microorganisms as Bioactive Compounds**

Higher plants are hosts of one or more endophytic microorganisms. The relationship that they establish with the plant varies from symbiotic to parasitic. The microorganisms (mostly fungi and bacteria) live in the intercellular space of plant tissue. Some endophytes produce various useful bioactive products, which may be potentially used in medicine, agriculture, and industry. Novel antibiotics, antimycotics, immunosuppressants, and anticancer compounds given in this review are examples of bioactive compounds produced by these microorganisms.

---

---

### VŠCHT Praha přijme výzkumného pracovníka/pracovnici pro Ústav biochemie a mikrobiologie.

**Hlavní náplň práce:**

- experimentální práce v imunochemické laboratoři,
- podíl na zajištění chodu biochemických laboratoří dle pokynů vedoucího ústavu,
- konzultace semestrálních a diplomových prací studentů.

**Požadavky:**

- vysokoškolské vzdělání chemického směru biochemického či analytického zaměření.

**Nabízíme:**

- zajímavou práci na moderně vybaveném pracovišti,
- příležitost k profesnímu rozvoji,
- pracoviště v blízkosti metra,
- zaměstnanecké výhody (pružnou pracovní dobu, příspěvek na stravování, rekreaci, penzijní připojištění, návštěvu kulturních zařízení).

**Nástup:** 13. 8. – 17. 9. 2007

**Kontakt:** ladislav.fukal@vscht.cz, tel. 220 445 137, 220 443 076

---

---

---

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

---

### STANOVENÍ CHEMICKÝCH FOREM RTUTI KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFIÍ S DETEKČÍ ATOMOVOU FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIÍ TECHNIKOU GENERACE STUDENÝCH PAR

PAVLÍNA HOUSEROVÁ<sup>a</sup>, DAVID MATĚJÍČEK<sup>a</sup>, VLASTIMIL KUBÁŇ<sup>a</sup>, JANA PAVLÍČKOVÁ<sup>a</sup> a JOSEF KOMÁREK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno,

<sup>b</sup> Katedra analytické chemie, Masarykova Univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
kuban@mendelu.cz

Došlo 10.8.05, přepracováno 21.3.06, přijato 22.8.06.

---

**Klíčová slova:** rtuť, methylrtuť, chemické formy rtuti, extrakce, separace, stanovení, kapalinová chromatografie, atomová fluorescenční spektrometrie

---

### Úvod

Speciační analýza je definována jako stanovení jednotlivých fyzikálně chemických forem prvku, přičemž součet jejich koncentrací tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku. Pro rozlišení jednotlivých forem prvku se využívají rozdíly v chemických i fyzikálních vlastnostech těchto forem.

Dříve se ke stanovení chemických forem rtuti používalo selektivní jednostupňové extrakce, selektivní redukce chemických forem rtuti roztokem NaBH<sub>4</sub> o různé koncentraci<sup>1</sup>, nebo dvoustupňové redukce roztoky SnCl<sub>2</sub> a NaBH<sub>4</sub> (cit.<sup>2</sup>) ve spojení s atomovou absorpční (CV-AAS) nebo atomovou fluorescenční spektrometrií (CV-AFS).

V současné době se prvková speciační analýza provádí převážně kombinovanými (tandemovými) technikami, které spojují separační metody (plynovou chromatografií – GC, vysoce účinnou kapalinovou chromatografií – HPLC a kapilární zónovou elektroforézou – CZE) se selektivní detekcí prvků, v některých případech i isotopů. Tyto techniky tak umožňují selektivně a většinou i velmi citlivě stanovit všechny přítomné fyzikálně chemické formy prvku (specie)<sup>3</sup>. Nejčastěji se k rozdělení chemických forem rtuti používá plynové nebo kapalinové chromatografie,

přičemž prozatím nedoceněny zůstávají možnosti separace elektromigračními technikami (kapilární zónovou elektroforézou – CZE). Podrobný přehled vlastností, výskytu a biotransformací jednotlivých forem rtuti ve vodném ekosystému, jakož i přehled metod jejich stanovení je uveden v přehledné práci<sup>4</sup>.

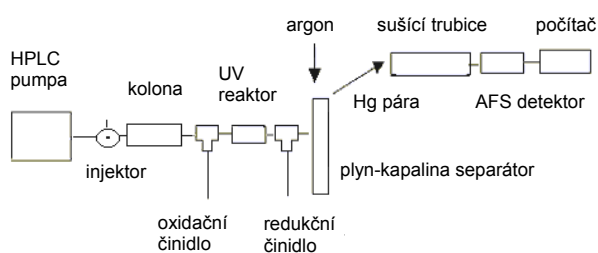
V této práci byly optimalizovány a validovány metody stanovení methylrtuti (methylhydrargyrium-chloridu – MeHgCl), ethylrtuti (ethylhydrargyrium-chloridu – EtHgCl) a fenylnrtuti (fenylnhydrargyrium-chloridu – PhHgCl) vedle anorganických forem rtuti (Hg<sup>2+</sup>) kapalinovou chromatografií s detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií technikou generace studených par (HPLC/CV-AFS). Výsledky byly porovnány s výsledky stanovení methylhydrargyrium-chloridu a anorganických forem rtuti (Hg<sup>2+</sup>) plynovou chromatografií s detektorem se záchytem elektronů (GC/ECD) i s obsahy celkové rtuti (T-Hg) a MeHgCl v certifikovaných referenčních materiálech (CRM) i ve vzorcích ryb.

### Experimentální část

#### Přístroje

Pro stanovení chemických forem rtuti byl použit kapalinový chromatograf LC-200 (tzv. bioverze, Perkin Elmer, Norwalk, USA) vybavený vysokotlakou pumpou Series 200 LC, autosamplerem Series 200 a atomovým fluorescenčním detektorem PSA Millennium Merlin (PS Analytical Ltd., Orpington, UK). Chromatografický systém byl kontrolován chromatografickým softwarem TurboChrom přes 600 Series a 900 Series propojení (PE Nelson, Norwalk, USA). Isokratická eluce chemických forem rtuti byla prováděna na chromatografické koloně s reverzní fází Hypersil BDS C18 (2 × 125 mm, velikost částic 3 μm, Hewlett Packard, Palo Alto, USA) při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,15 ml min<sup>-1</sup>. Mobilní fáze obsahovala acetátový pufr (pH 5), 0,05 % 2-sulfanyl-ethanol a 7 % methanol s jeho skokovou změnou na 100 % MeOH v 15. minutě separace. Před začátkem a na konci měření byl chromatografický systém promyt methanolem po dobu 10 min. Automatickým dávkovačem bylo do toku mobilní fáze dávkováno 100 μl vzorku. Automatický dávkovač byl před každým dalším dávkováním vzorku automaticky promyt směsí H<sub>2</sub>O a methanolu (1:1 v/v).

Eluent z chromatografické kolony přecházel po smísení s oxidačním činidlem (0,2 mol l<sup>-1</sup> KBr + 0,04 mol l<sup>-1</sup> KBrO<sub>3</sub> v 5% HCl) přes UV reaktor (teflonová kapilární trubička 0,5 mm × 10 m, výkon UV lampy 12 W, vlnová délka 253,6 nm), který zajišťoval převedení všech chemických forem rtuti fotooxidací na Hg<sup>2+</sup>. Přebytný Br<sub>2</sub> byl následně odstraňován vodným roztokem hydroxylamin-



Obr. 1. Schématické uspořádání HPLC/CV-AFS systému pro stanovení chemických forem rtuti

hydrochloridu (0,004%). Rtuťnaté ionty byly dále redukovány 2% roztokem  $\text{SnCl}_2$  v 10%  $\text{HCl}$  na elementární rtuť. Z roztoku byla elementární rtuť uvolněna proudem argonu ( $0,25 \text{ l min}^{-1}$ ) a oddělena v separátoru fází g/l. Směs byla vysušena v membránové jednotce PermaPure® a detegována CV-AFS v křemenné cele při vlnové délce 253,6 nm. Výsledná data byla zpracována chromatografickým softwarem Clarity (verze 2.1, Data Apex, Praha, ČR). Schématické uspořádání HPLC/CV-AFS systému pro stanovení chemických forem rtuti je znázorněno na obr. 1.

Pro stanovení celkového obsahu rtuti (T-Hg) byl použit jednoúčelový atomový absorpční spektrofotometr AMA 254 s automatickým dávkovačem tuhých vzorků ASS 254. Celé zařízení bylo řízeno WinAMA softwarem

(vše Altec s.r.o., Praha). Homogenizované tuhé vzorky (20–100 mg,  $\pm 0,1 \text{ mg}$ ) byly navažovány do předčištěných vypálených niklových lodiček, vysušeny při  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  (90 s) a spáleny při  $550 \text{ }^\circ\text{C}$  (180 s) v proudě kyslíku ( $200 \text{ ml min}^{-1}$ ). Páry rtuti byly po fokusaci v amalgamátoru uvolněny tepelným pulzem a transportovány do měřících cel přístroje AMA 254 (poměr 15:1). Absorpce Hg byla měřena při 253,6 nm (doba měření 60 s).

#### Použité chemikálie

Ethylrtuť (ethylhydrargyrium-chlorid –  $\text{EtHgCl}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$ , Supelco, Německo), methylrtuť (methylhydrargyrium-chlorid –  $\text{MeHgCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ) a fenylrtuť (fenylhydrargyrium-chlorid –  $\text{PhHgCl}$  –  $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCl}$ ) a 2-sulfanylethanol (vše Sigma-Aldrich Chem. Comp., USA), octová kyselina, octan amonný,  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{KBr}$ ,  $\text{KBrO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ , L-cystein, tetrabutylamonium-chlorid, tetraethylamonium-bromid, thiomochovina, kyselina sulfosalicylová (vše Pliva-Lachema, Brno, ČR) byly čistoty p.a. Methanol (čistoty pro HPLC) byl od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Pro validaci byly použity standardní referenční materiál DORM-2 (dogfish, Institut pro mezinárodní standardy, Kanada) s deklarovanými obsahy celkové rtuti (T-Hg)  $4,64 \pm 0,26 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $\text{MeHgCl}$  (jako Hg) =  $4,47 \pm 0,32 \text{ mg kg}^{-1}$  a standardní referenční materiál CRM 580 (sediment, dodavatel 2-Theta ASE, Český Těšín, ČR) s deklarovanými obsahy celkové rtuti (T-Hg)  $132 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $\text{MeHgCl}$

Tabulka I

Optimalizované experimentální podmínky HPLC, CV-AFS, CV-AAS a mikrovlnné extrakce

<b>HPLC</b>	
Kolona	Hypersil BDS C18, $2 \times 125 \text{ mm}$ , $3 \mu\text{m}$ (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)
Mobilní fáze	7% (v/v) $\text{CH}_3\text{OH}$ , 0,05% (v/v) 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru pH 5, 100% $\text{MeOH}$ od 15. minuty separace
Průtoková rychlost	$0,15 \text{ ml min}^{-1}$
Injektovaný objem	100 $\mu\text{l}$
<b>Atomová fluorescenční spektrometrie s generací studených par (CV-AFS)</b>	
Oxidační činidlo	$0,2 \text{ mol l}^{-1} \text{ KBr} + 0,04 \text{ mol l}^{-1} \text{ KBrO}_3$ v 5% $\text{HCl}$ + 0,004% hydroxylamin-hydrochlorid, průtoková rychlost $2,5 \text{ ml min}^{-1}$
Redukční činidlo	2% $\text{SnCl}_2$ v 10% $\text{HCl}$ , průtoková rychlost $2,5 \text{ ml min}^{-1}$
<b>Mikrovlnná extrakce</b>	
Doba extrakce	10 min
Teplota	$55 \text{ }^\circ\text{C}$
Výkon	400 W
Extrakční činidlo	10 ml roztoku $6 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl} + 0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$
<b>Atomová absorpční spektrometrie s generací studených par (AMA 254)</b>	
Sušení	90 s při $120 \text{ }^\circ\text{C}$
Rozklad	180 s při $550 \text{ }^\circ\text{C}$
Vlnová délka	253,6 nm

(jako  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) =  $75,5 \pm 3,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Pro kalibraci byl použit základní standard o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1} \text{ Hg}$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (Český metrologický institut, Praha, ČR). Kalibrační roztoky pro stanovení celkové rtuti (T-Hg) byly připraveny v 0,1%  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  a 0,6%  $\text{HNO}_3$ . Standardní roztok  $\text{Hg}^{2+}$  ( $c = 1 \text{ mg l}^{-1}$ ) pro speciální analýzu byl připraven v 2%  $\text{HCl}$ . Standardní roztoky  $\text{MeHgCl}$ ,  $\text{PhHgCl}$  a  $\text{EtHgCl}$  ( $c = 1 \text{ mg l}^{-1}$ ) byly připraveny v methanolu. Všechny pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou (Milli-Q RG, Millipore, Bedford, USA).

### Pracovní postupy

#### Zpracování vzorků

Odebrané vzorky ryb z lokality Skalka u Chebu<sup>4</sup> byly zmrazeny na  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  a následně lyofilizovány při teplotě  $-52 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 48 h v lyofilizátoru Christ Alfa (B. Braun Biotech International, Švýcarsko). Homogenizace vzorků probíhala po dobu 30 s při 10 000 otáčkách/min v mlýnku Grindomix GM 200 (Retch GmbH & Co. KG, Německo).

#### Extrakce

Pro extrakci chemických forem rtuti z biologických materiálů byla používána ultrazvuková lázeň K5 (Kraintex, SR) nebo desetimístný vysokotlaký mikrovlnný extraktor Ethos SEL (Milestone, Itálie). Každá extrakční sada obsahovala 1 referenční materiál, 1 slepý pokus a 8 vzorků. Navážka vzorku (200–1000 mg,  $\pm 0,1 \text{ mg}$ ) byla zvolena podle celkového obsahu rtuti ve vzorku souběžně stanoveného na přístroji AMA 254. Byla optimalizována doba extrakce, teplota a objem extrakčního činidla. Teplota byla kontrolována termočlánekem umístěným v první reakční nádobě. Po extrakci byly vzorky zfiltrány přes filtrační papír (No. 389, průměr 12,5 cm). Supernatant byl ředěn acetátovým pufrem na objem 25 nebo 50 ml podle obsahu rtuti ve vzorku. Optimalizované experimentální podmínky jsou shrnuty v tabulce I.

#### Zpracování výsledků

Kalibrační grafy a naměřené chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí chromatografického softwaru Clarity (verze 2.1, Data Apex, Praha, ČR). Rozlišení separovaných chemických forem rtuti ( $R_S$ ) a kapacitní faktory ( $k$ ) byly vypočítány na základě vztahů  $R_S = 2(t_{R2} - t_{R1})/(w_1 - w_2)$  a  $k = (t_R - t_0)/t_0$ , kde  $t_0$  je mrtvý retenční čas v min,  $t_R$  je retenční čas v min a  $w$  je šířka píku při základně v minutách pro obě komponenty. Dále byla data zpracována pomocí programu Microsoft Excel.

Správnost výsledků, tj. statistická významnost rozdílu průměru od skutečné hodnoty, byla testována za použití směrodatné odchylky průměru Studentovým testem  $t$  (cit.<sup>5</sup>). Shodnost výsledků získaných dvěma různými analytickými metodami, tj. statistická významnost rozdílu středních hodnot ( $\mu_x - \mu_y$ ), byla rovněž testována Studentovým testem  $t$ . Test shody středních hodnot byl prováděn s testovacím kritériem  $T_1$  i  $T_2$ . Byla testována hypotéza  $H_0$

( $\mu_x = \mu_y$ ) proti alternativní hypotéze  $H_A$  ( $\mu_x \neq \mu_y$ ). Při platnosti hypotézy  $H_0$  má tato statistika Studentovo rozdělení s  $v = n_1 + n_2 - 2$  stupni volnosti. Platí-li, že hodnota testovacího kritéria  $T_{1(2)} > t_{1-\alpha/2}(v)$ , je hypotéza  $H_0$  o shodě středních hodnot na hladině významnosti  $\mu$  zamítnuta. Testovací kritérium  $T_1$  není robustní vůči heteroskedasticitě, tj. případu, kdy data jsou ve výběrech měřena s různou přesností. V této situaci je správnější využít testovacího kritéria  $T_2$ , které je vůči heteroskedasticitě robustnější. V případě stejných rozsahů obou výběrů  $n_1 = n_2 \geq 8$ , lze použít testovací kritérium  $T_1$ , i když hodnoty rozptylů nejsou shodné<sup>5</sup>.

$$T_1 = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{(n_1 - 1)s_x^2 + (n_2 - 1)s_y^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \quad (1)$$

$$T_2 = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{\frac{s_x^2}{n_1} + \frac{s_y^2}{n_2}}}$$

Mez detekce (LOD) je definována jako nejmenší koncentrace nebo množství analytu ve vzorku, které vyvolají signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky signálu pozadí (slepého pokusu, tzv. 3.S/N kritérium).

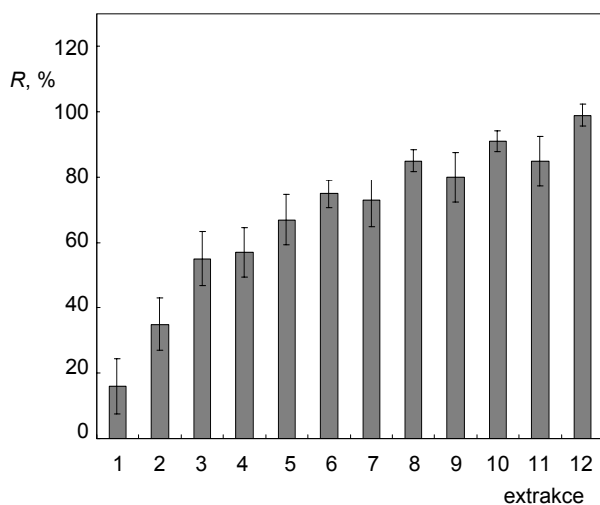
### Výsledky a diskuse

#### Izolace chemických forem rtuti z biologických materiálů

Optimalizace extrakčního postupu se skládala z volby vhodného extrakčního činidla a podmínek extrakce (teplota, doba extrakce, množství extrakčního činidla). Nejvhodnější extrakční činidlo bylo vybráno na základě extrakčních výtěžků, reprodukovatelnosti extrakce a minimální vzájemné transformace jednotlivých chemických forem rtuti. Extrakční výtěžky byly vypočítány jako procentuální rozdíl mezi celkovým obsahem rtuti v tuhém vzorku a ve vzorku po extrakci. Měření bylo prováděno na přístroji AMA 254.

Ultrazvuková i mikrovlnná extrakce chemických forem rtuti byla prováděna v přítomnosti řady extrakčních činidel (kyselina thiooctová – TAA, octová, citronová, chlorovodíková, L-cystein, 2-sulfanylethanol,  $\text{HCl} + \text{NaCl}$  atd.). Extrakční účinnosti jednotlivých extrakčních činidel byly testovány standardním referenčním materiálem DORM-2. Vliv jednotlivých extrakčních činidel na extrakční výtěžky je znázorněn v obr. 2.

Nejvyšší extrakční výtěžky byly získány při použití směsných extrakčních činidel na bázi kyseliny chlorovodíkové –  $6 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl} + 1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$  nebo 5,8%  $\text{HCl} + 5\%$  thiooctová kyselina. Přítomnost kyseliny chlorovodíkové v extrakčním činidle výrazně zlepšuje extrakční výtěžky chemických forem rtuti. Zředěná kyselina chlorovodíková přítomná v extrakčním činidle umožňuje rychlé a dokonalé rozbití vazeb chemických forem rtuti s proteiny



Obr. 2. Vliv jednotlivých extrakčních činidel na extrakční výtěžky *R*; 1 – 0,05% cystein + 0,05% 2-sulfanylethanol – ultrazvuk, 2 – 5% kyselina citronová – ultrazvuk, 3 – 15% kyselina octová – ultrazvuk, 4 – 5% kyselina thiooctová – ultrazvuk, 5 – 15% HCl – ultrazvuk, 6 – 15% HCl – mikrovlny, 7 – 15% HCl + 1,5% cystein – ultrazvuk, 8 – 15% HCl + 1,5% cystein – mikrovlny, 9 – 15% kyselina thiooctová + 5,8% HCl – ultrazvuk, 10 – 5% kyselina thiooctová + 5,8% HCl – mikrovlny, 11 – 6M HCl + 1M NaCl – ultrazvuk, 12 – 6M HCl + 1M NaCl – mikrovlny

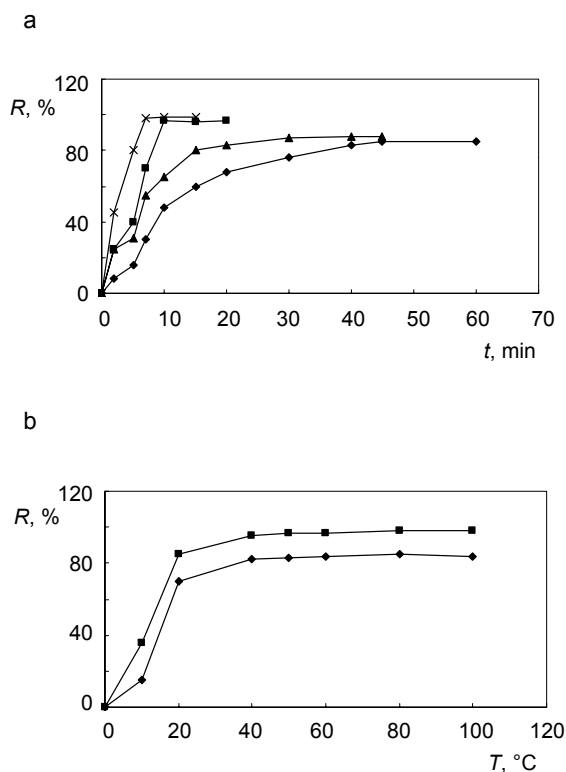
a zároveň při nízkých extrakčních teplotách nezpůsobuje žádné transformace chemických forem rtuti. Kyselina thiooctová negativně ovlivňuje analytický signál atomové fluorescenčního (AFS) detektoru zdvojením píku<sup>6</sup>. Jako nejvhodnější extrakční činidlo byla zvolena směs 6 mol l<sup>-1</sup> HCl a 0,1 mol l<sup>-1</sup> NaCl. Směs obsahující 6 mol l<sup>-1</sup> HCl a 1 mol l<sup>-1</sup> NaCl sice poskytovala asi o 2 % vyšší extrakční výtěžky, ale pro dávkování do chromatografického systému byl preferován menší obsah chloridů.

Stabilita chemických forem rtuti v tomto extrakčním činidle byla ověřena analýzou referenčních materiálů DORM-2 a CRM 580. Při ultrazvukové i mikrovlnné extrakci referenčních materiálů nedocházelo k žádným transformacím chemických forem rtuti.

Při ultrazvukové i mikrovlnné extrakci byl optimalizován extrakční čas, teplota a množství extrakčního činidla. Na základě výsledků (obr. 3a) byl stanoven optimální extrakční čas pro mikrovlnnou extrakci biologického materiálu na 10 min a pro extrakci v ultrazvukové lázni na 45 min. Při extrakci sedimentů byl optimální extrakční čas zkrácen při mikrovlnné extrakci na 7 min a při extrakci v ultrazvukové lázni na 30 min. Zkrácení extrakčního času u sedimentů je způsobeno slabšími vazbami chemických forem rtuti v sedimentech. Extrakční teplota v rozmezí 40 až 100 °C neměla významný vliv na extrakční výtěžky chemických forem rtuti (obr. 3b). Stejný efekt byl zaznamenán i Vázquezem<sup>7</sup>.

Vzhledem ke konstrukci vysokotlakého mikrovlnného extraktoru Ethos SEL nebylo možné extrakci provádět s méně než 10 ml extrakčního činidla. Větší objem extrakčního činidla neovlivňoval extrakční výtěžky rtuti, proto bylo používáno toto minimální množství i v dalších experimentech. Relativní směrodatná odchylka (RSD) mikrovlnné extrakce byla 3,3 %, RSD extrakce v ultrazvuku byla 7,5 %. Extrakční výtěžky mikrovlnné extrakce byly nejméně o 10 % vyšší než výtěžky extrakce prováděné v ultrazvukové lázni.

Mezi hlavní výhody mikrovlnné extrakce extrakčním činidlem na bázi kyseliny chlorovodíkové (6 mol l<sup>-1</sup> HCl + 0,1 mol l<sup>-1</sup> NaCl) patří krátký extrakční čas, možnost simultánní extrakce až 10 vzorků, extrakce bez použití organického rozpouštědla, stabilita extraktu v tmavě hnědých skleněných lahvích v ledničce nejméně 30 dnů a především vyšší přesnost a správnost stanovení v porovnání s extrakcí v ultrazvukové lázni.



Obr. 3. Vliv doby extrakce (a) ( $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),  $\blacklozenge$  extrakce v ultrazvuku – biologický materiál,  $\blacksquare$  mikrovlnná extrakce – biologický materiál,  $\blacktriangle$  extrakce v ultrazvuku – sediment,  $\times$  mikrovlnná extrakce; a extrakční teploty (b) ( $t_{\text{mikrovln}} = 10\text{ min}$ ,  $t_{\text{ultrazv}} = 45\text{ min}$ ) na extrakční výtěžek *R* rtuti při mikrovlnné extrakci i extrakci v ultrazvukové lázni,  $\blacklozenge$  extrakce v ultrazvuku,  $\blacksquare$  mikrovlnná extrakce (6 mol l<sup>-1</sup> HCl + 0,1 mol l<sup>-1</sup> NaCl (10 ml), DORM-2, CRM 580)



## Stabilita vzorků a extraktů

Odebrané vzorky ryb byly ihned po odběru zmrazeny ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Vzorky byly uchovávány zatavené v polyethylenové folii a hermeticky uzavřené v plastické přepravce. Během sledované doby (6 měsíců) nedocházelo u testovaných biologických materiálů (svalovina, játra, žábry, ledviny, kůže, střeva) ke ztrátě rtuti ani k transformaci jejich jednotlivých chemických forem.

Transformace chemických forem rtuti (methylace  $\text{Hg}^{2+}$ ) byla pozorována ve vzorcích sedimentů. Dlouhodobým skladováním vzorků sedimentů docházelo k mírnému vzrůstu obsahu  $\text{MeHgCl}$ , přičemž celkový obsah rtuti zůstal ve vzorku zachován. Stabilita odebíraných sedimentů byla prodlužována lyofilizací vzorku a následným uchováváním při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (obr. 4a). Stabilita referenčního materiálu je zajišťována ozářením sedimentu  $\gamma$ -zářením.

Stabilita extraktů byla sledována v rozmezí 2 měsíců. Přefiltrovaný extrakt ( $6\text{ mol l}^{-1}\text{ HCl} + 0,1\text{ mol l}^{-1}\text{ NaCl}$ ) referenčního materiálu DORM-2 i CRM 580 zředěný na koncentraci  $46,4\text{ }\mu\text{g l}^{-1}\text{ Hg}$  byl uchováván ve skleněných

vialkách z hnědého skla v ledničce. Extrakty referenčních materiálů DORM-2 i CRM 580 byly stabilní po dobu 30 dnů. Během této doby nebyly pozorovány žádné kvantitativní ani transformační změny stanovovaných chemických forem rtuti. Stabilita chemických forem rtuti byla prodlužována extrakčním činidlem ( $\text{HCl} + \text{NaCl}$ ), které zajišťovalo vznik komplexů  $\text{HgCl}_4^{2-}$  a  $\text{RHgCl}_2^-$ . Dostatečná kyselost extraktu a jeho vhodné skladování snižovaly riziko adsorpce nebo degradace chemických forem rtuti na minimum. Po 30 dnech se postupně snižovala koncentrace jak celkové rtuti, tak i  $\text{MeHgCl}$  (obr. 4b). Byla také sledována stabilita difenylrtuti ( $\text{Ph}_2\text{Hg}$ ).  $\text{Ph}_2\text{Hg}$  se v kyselém prostředí ihned rozkládala na  $\text{PhHgCl}$ . Pro stanovení  $\text{R}_2\text{Hg}$  by bylo zapotřebí provádět alkalickou hydrolyzu vzorku. Vzhledem k tomu, že sloučeniny  $\text{R}_2\text{Hg}$  se ve studovaných maticích i většině biologických materiálů nevyskytují, nebyla tato varianta dále ověřována.

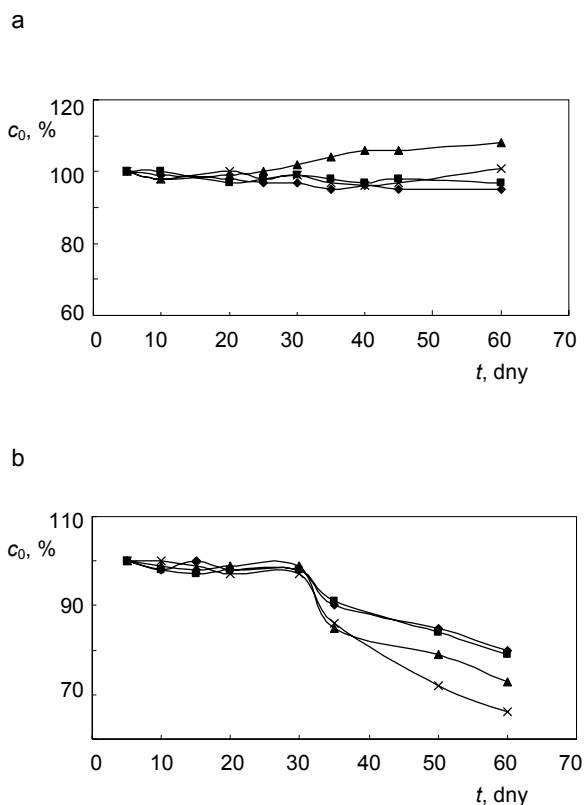
## Separace chemických forem rtuti HPLC

Chromatografická separace chemických forem rtuti ( $\text{MeHgCl}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{EtHgCl}$ ,  $\text{PhHgCl}$ ) byla prováděna na chromatografické koloně Hypersil BDS C18 s reverzní fází. Při optimalizaci separačních podmínek bylo sledováno složení mobilní fáze (vliv různých modifikátorů, pH), průtoková rychlost mobilní fáze a teplota separace. Detekce separovaných chemických forem rtuti byla prováděna atomovou fluorescenční spektrometrií metodou generování studených par rtuti (CV-AFS). Optimalizace experimentálních podmínek detekční metody je uvedena v dřívější práci<sup>6</sup>.

Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a modifikátorů (L-cystein, 2-sulfanylethanol, thiomocovina, kyselina sulfosalicylová, diethylthiokarbamat sodný – DDTc) v acetátovém pufru (pH 5). Modifikátory vytvářejí stabilní komplexy se sloučeninami rtuti a pomáhají tak překonat významné rozdíly v chemických i fyzikálních vlastnostech jednotlivých chemických forem rtuti a tím umožňují stanovit diametrálně odlišné sloučeniny v jednom separačním stupni. Vliv jednotlivých modifikátorů na chromatografickou separaci  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{MeHgCl}$  je znázorněn v tabulce II. Dále byla také testována separace chemických forem rtuti v přítomnosti tetrabutylamoniumchloridu nebo tetraethylamonium-bromidu v kombinaci s NaCl.

V přítomnosti L-cysteinu a thiomocoviny se nezadržovala v daném chromatografickém systému  $\text{Hg}^{2+}$  ani  $\text{MeHgCl}$ . Velmi silná retence chemických forem rtuti byla zaznamenána, pokud mobilní fáze obsahovala jako modifikátor diethylthiokarbamat sodný nebo kyselinu sulfosalicylovou. Separace chemických forem rtuti v přítomnosti tetrabutylamoniumchloridu nebo tetraethylamoniumbromidu v kombinaci s NaCl byla výrazně omezoována nízkou citlivostí stanovení (pětikrát nižší než v přítomnosti modifikátorů obsahujících síru).

Pro chromatografickou separaci chemických forem rtuti byl jako nejvhodnější modifikátor zvolen 2-sulfanylethanol. Vzrůstající koncentrace 2-sulfanylethanolu

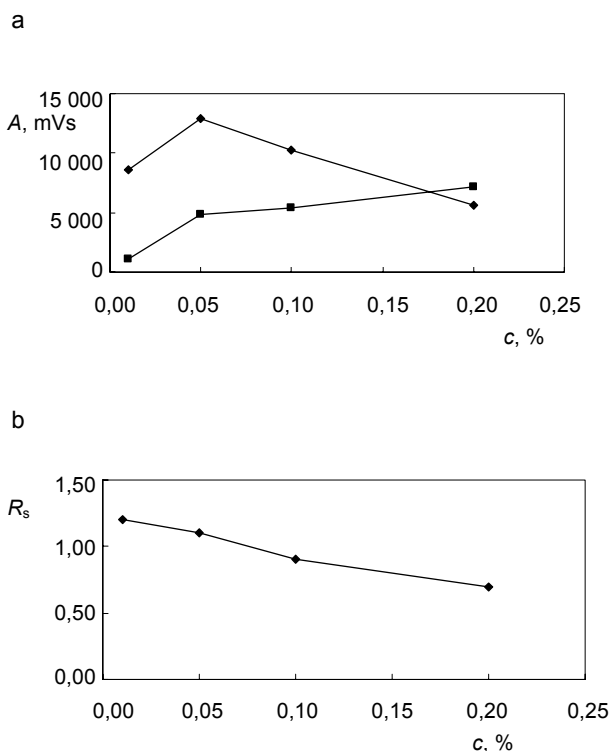


Obr. 4. Stabilita sedimentů (a) (celkový obsah (T-Hg) =  $89\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $\text{MeHgCl} = 10\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ );  $\blacklozenge$  T-Hg bez lyofilizace,  $\blacksquare$  T-Hg s lyofilizací,  $\blacktriangle$   $\text{MeHgCl}$  bez lyofilizace,  $\times$   $\text{MeHgCl}$  s lyofilizací; a extraktů (b),  $\blacklozenge$  DORM-2 (T-Hg),  $\blacksquare$  DORM-2 ( $\text{MeHgCl}$ ),  $\blacktriangle$  CRM 580 (T-Hg),  $\times$  CRM 580 ( $\text{MeHgCl}$ )

Tabulka II  
Vliv modifikátorů na chromatografickou separaci  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{MeHgCl}$

Modifikátor	Retenční časy $t_R$ [min]	Rozlišení $R_s$	Mobilní fáze
L-Cystein	$\text{MeHgCl}$ 6,1 $\text{Hg}^{2+}$ 5,7	0,0	7% MeOH + 0,05% L-cystein v acetátovém pufru
2-Sulfanylethanol	$\text{MeHgCl}$ 13,6 $\text{Hg}^{2+}$ 17,0	1,1	7% MeOH + 0,05% 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru
Thiomočovina	$\text{MeHgCl}$ 7,0 $\text{Hg}^{2+}$ 7,6	0,0	7% MeOH + 0,05% thiomočovina v acetátovém pufru
Diethyldithiokarbamát sodný	$\text{MeHgCl}$ 7,3 $\text{Hg}^{2+}$ 15,0	0,8	80% MeOH + 0,05% diethyldithiokarbamát sodný v acetátovém pufru
Sulfosalicylová kyselina	$\text{MeHgCl}$ 7,3 $\text{Hg}^{2+}$ 24,0	1,1	80% MeOH + 0,05% sulfosalicylová kyselina v acetátovém pufru

ovlivňovala citlivost stanovení  $\text{MeHgCl}$  i  $\text{Hg}^{2+}$ , ale neměla vliv na stanovení  $\text{EtHgCl}$  ani  $\text{PhHgCl}$ . Citlivost stanovení  $\text{MeHgCl}$  vzrostla čtyřikrát a  $\text{Hg}^{2+}$  jeden a půlkrát

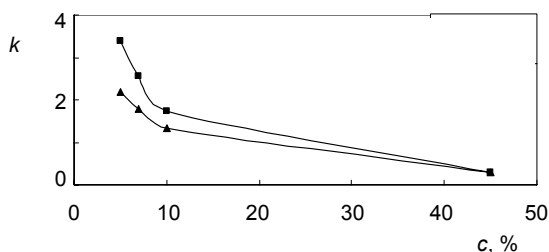


Obr. 5. Závislost analytického signálu (plochy píku) na koncentraci 2-sulfanylethanolu (a) a vliv koncentrace 2-sulfanylethanolu [%] na rozlišení  $\text{MeHgCl}$  a  $\text{Hg}^{2+}$  (b),  $\blacklozenge$  anorg. Hg,  $\blacksquare$   $\text{MeHgCl}$  ( $c = 10 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $\text{MeHgCl}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ), průtok  $0,15 \text{ ml min}^{-1}$ , m.f. 7% methanol + 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru)

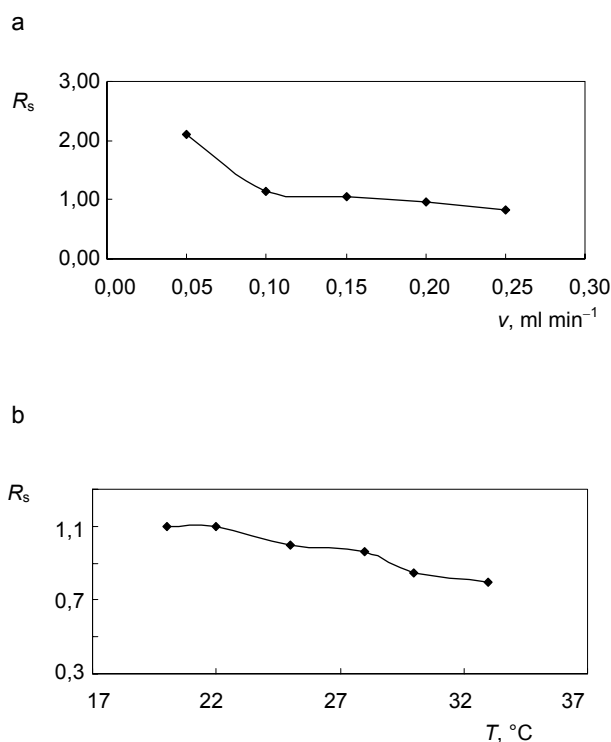
v prostředí 0,05% 2-sulfanylethanolu v porovnání s 0,01% 2-sulfanylethanolem (obr. 5a). Vzárostající koncentrace 2-sulfanylethanolu způsobovala také pokles rozlišení ( $R_s$ )  $\text{MeHgCl}$  a  $\text{Hg}^{2+}$  (obr. 5b). Pro chromatografickou separaci byla zvolena mobilní fáze obsahující 0,05% 2-sulfanylethanol.

Koncentrace methanolu v mobilní fázi byla měněna v rozmezí 5–45 %. Nejlepší účinnosti separace  $\text{MeHgCl}$  a  $\text{Hg}^{2+}$  bylo dosaženo, pokud mobilní fáze obsahovala 5 až 7 % MeOH (obr. 6). Vzhledem k silně nepolárním charakteru mají  $\text{EtHgCl}$  a  $\text{PhHgCl}$  v daném chromatografickém systému velmi dlouhé retenční časy (delší než 60 min). Stanovení  $\text{EtHgCl}$  a  $\text{PhHgCl}$  v rozumném retenčním čase je umožněno skokovým vzrůstem koncentrace methanolu v mobilní fázi na 100 % od 15. minuty separace. Acidita mobilní fáze (pH nastaveno kyselinou octovou a octanem amonným) neměla v rozmezí pH od 2,8 do 5,9 vliv na účinnost separace chemických forem rtuti.

Změna průtokové rychlosti mobilní fáze ovlivňovala rozlišení ( $R_s$ )  $\text{MeHgCl}$  a  $\text{Hg}^{2+}$ . S rostoucí průtokovou rychlostí klesalo rozlišení těchto dvou chemických forem rtuti; při průtokové rychlosti  $0,25 \text{ ml min}^{-1}$  již bylo nižší než 1,0. Rozlišení dvojic  $\text{Hg}^{2+} - \text{EtHgCl}$  a  $\text{EtHgCl} - \text{PhHgCl}$



Obr. 6. Závislost kapacitního faktoru  $\text{MeHgCl}$  a  $\text{Hg}^{2+}$  ( $30 \mu\text{g l}^{-1}$ ) na obsahu methanolu [%] v mobilní fázi (methanol + 0,05 % 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru, průtok  $0,15 \text{ ml min}^{-1}$ )



Obr. 7. Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze (a) a její teploty (b) na rozlišení MeHgCl a Hg<sup>2+</sup> (30 µg l<sup>-1</sup> Hg, 7 % methanol + 0,05 % 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru)

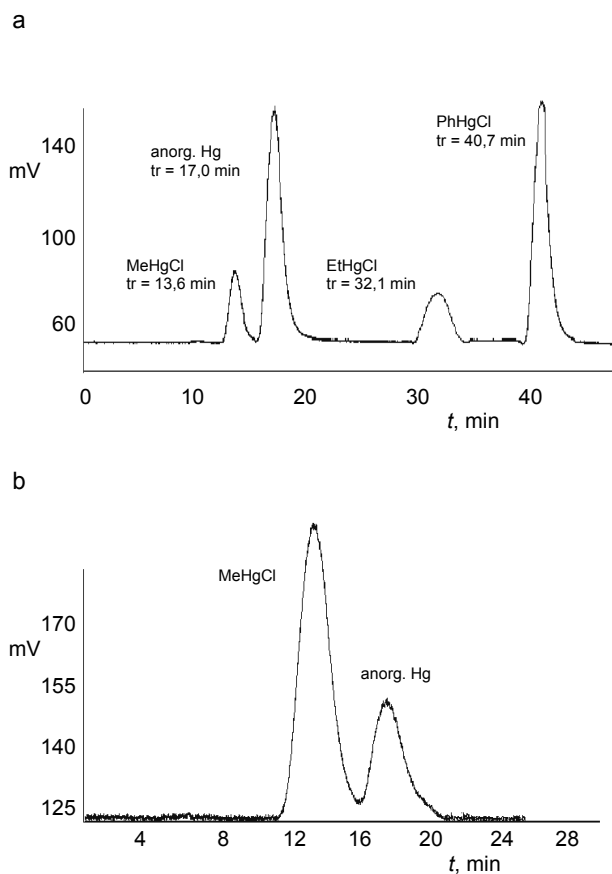
nebylo změnou průtokové rychlosti mobilní fáze významněji ovlivňováno. Pro vlastní chromatografickou separaci byla zvolena průtoková rychlost 0,15 ml min<sup>-1</sup> (obr. 7a) Vzářstající teplota separace ovlivňovala rozlišení ( $R_s$ ) MeHgCl a Hg<sup>2+</sup>. S rostoucí teplotou docházelo k nevýraznému poklesu rozlišení těchto dvou chemických forem rtuti (obr. 7b).

HPLC/CV-AFS systém byl pravidelně kalibrován standardními roztoky obsahujícími 1, 5, 10, 15, 30 a 60 µg l<sup>-1</sup> jednotlivých chemických forem rtuti. Kalibrační roztoky byly připravovány denně v prostředí 1,2 mol l<sup>-1</sup> HCl, 0,02 mol l<sup>-1</sup> NaCl a acetátového pufru (pH 5). Kalibrační křivky byly ve sledovaném koncentračním rozsahu pro všechny stanovené chemické formy rtuti lineární ( $r > 0,9998$ ). Vzorové chromatogramy standardů všech čtyř separovaných chemických forem rtuti a referenčního materiálu DORM-2 jsou uvedeny na obr. 8a,b. Retenční časy separovaných chemických forem rtuti byly 13,6 min pro MeHgCl, 17,0 min pro Hg<sup>2+</sup>, 32,1 min pro EtHgCl a 40,7 min pro PhHgCl. Mrtvý retenční čas byl 5 min.

Správnost stanovení MeHgCl byla kontrolována analýzou standardního referenčního materiálu svaloviny máčky skvrnité DORM-2 s obsahem MeHgCl (jako Hg) = 4,47±0,32 mg kg<sup>-1</sup> a analýzou standardního referenčního materiálu sedimentu CRM 580 s obsahem MeHgCl (jako

CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) = 75,5±3,7 µg kg<sup>-1</sup>. V referenčním materiálu DORM-2 bylo stanoveno 4,38±0,16 mg kg<sup>-1</sup> MeHgCl (jako Hg) a v referenčním materiálu CRM 580 bylo stanoveno 75,1±1,9 µg kg<sup>-1</sup> MeHgCl (jako CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>). Na základě testu správnosti s použitím vysoce spolehlivého referenčního materiálu bylo zjištěno, že stanovená hodnota je shodná s hodnotou certifikovanou a metoda tedy poskytuje správné výsledky (DORM-2:  $t = 1,39$ ;  $t_{krit} = 2,26$ , CRM 580:  $t = 0,49$ ;  $t_{krit} = 2,26$ ). Správnost stanovení ostatních chemických forem rtuti nemohla být určena z důvodu nedostupnosti referenčních materiálů.

Meze detekce (při navázce 1000 mg ± 0,1 mg a desetinasobném ředění, 3.S/N kritérium) a RSD uvedené v závorkách (při 5 µg l<sup>-1</sup>,  $n = 10$ ) pro jednotlivé chemické formy rtuti dosahovaly 0,20 µg kg<sup>-1</sup> (3,0 %) pro MeHgCl, 0,07 µg kg<sup>-1</sup> (5,3 %) pro Hg<sup>2+</sup>, 0,06 µg kg<sup>-1</sup> (3,4 %) pro PhHgCl a 0,12 µg kg<sup>-1</sup> (4,4 %) pro EtHgCl.



Obr. 8. Chromatogram standardů – MeHgCl, Hg<sup>2+</sup>, EtHgCl, PhHgCl (a) a referenčního materiálu DORM-2 (b) (30 µg l<sup>-1</sup> v prostředí 1,2 mol l<sup>-1</sup> HCl, 0,02 mol l<sup>-1</sup> NaCl a acetátového pufru) při stanovení HPLC-CV-AFS

### Porovnání HPLC-CV-AFS a GC-ECD při stanovení MeHgCl

K porovnání HPLC-CV-AFS s GC-ECD (cit.<sup>8</sup>) byly vybrány vzorky rybí svaloviny (tabulka III). Stanovení chemických forem rtuti HPLC/CV-AFS bylo prováděno při optimalizovaných parametrech stanovení zaznamenaných v tabulce I. Obsah celkové rtuti (T-Hg) byl stanoven jako součet všech chemických forem rtuti a ověřen analýzou na AMA 254. Každý vzorek byl měřen čtyřikrát.

Test shody středních hodnot byl prováděn s testovacím kritériem  $T_1$  i  $T_2$ . Na základě testování hypotézy o rozdílu mezi středními hodnotami dvou souborů dat bylo zjištěno, že obě testované metody poskytují shodné výsledky při stanovení celkové rtuti i MeHgCl.

Přestože obě metody poskytovaly shodné výsledky, jako výhodnější se jevílo stanovení chemických forem rtuti HPLC/CV-AFS, která poskytovala větší přesnost stanovení (GC-ECD: 10 %, HPLC/CV-AFS: 6 %), lepší mez detekce (GC-ECD: 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , HPLC/CV-AFS: 0,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) a mnohem větší selektivitu stanovení chemických forem rtuti.

### Analýza reálných vzorků

Navržená a optimalizovaná metoda stanovení byla použita pro analýzu jednotlivých forem rtuti (MeHgCl,  $\text{Hg}^{2+}$ , EtHgCl, PhHgCl) ve svalovině ryb odlovených v lokalitě Skalka u Chebu. Obsah celkové rtuti (T-Hg) byl stanoven jako součet všech chemických forem rtuti a ověřen analýzou na AMA 254. Každý vzorek byl měřen čtyřikrát. V analyzovaných vzorcích rybí svaloviny se obsahy celkové rtuti (T-Hg) pohybovaly v rozmezí 2,5–9,7  $\text{mg kg}^{-1}$  v sušině a procentuální obsahy MeHgCl mezi 90–99 % (tabulka III).

### Tabulka III

Srovnání koncentrací celkové rtuti (T-Hg) a methylhydrargyrium-chloridu (MeHgCl) ve vybraných druzích ryb ( $\text{mg kg}^{-1}$  v sušině, v závorkách jsou uvedeny RSD pro  $n=5-8$ ) stanovených HPLC/CV-AFS a GC-ECD technikami

Vzorek	Koncentrace <sup>a</sup> [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]					
	HPLC/CV-AFS		GC-ECD		Rozdíly	
	T-Hg	MeHgCl	T-Hg	MeHgCl	T-Hg	MeHgCl
Cejn velký ( <i>Abramis brama</i> )	2,55 (2,0)	2,49 (4,5)	2,53	2,47	0,02	0,02
Bolen dravý ( <i>Aspius aspius</i> ) <sup>b</sup>	9,65 (1,6)	9,55 (3,8)	9,68	9,52	-0,03	0,03
Bolen dravý ( <i>Aspius aspius</i> ) <sup>b</sup>	9,56 (1,6)	9,50 (4,0)	9,51	10,09	0,05	-0,59
Bolen dravý ( <i>Aspius aspius</i> ) <sup>b</sup>	9,62 (1,6)	8,70 (4,2)	9,70	8,82	-0,08	-0,12
Sumec velký ( <i>Silurus glanis</i> )	4,68 (1,8)	4,58 (4,6)	4,61	4,94	0,07	-0,36

<sup>a</sup> Testy shody středních hodnot („testy shodnosti“) HPLC/CV-AFS vs. GC-ECD pro celkovou rtuť – T-Hg ( $T_1 - T_2 = 0,003$ ,  $t_{\text{krit}} = 2,31$ ) a MeHgCl ( $T_1 - T_2 = 0,11$ ,  $t_{\text{krit}} = 2,31$ ) – střední hodnoty se shodují; <sup>b</sup> vzorky odebrány ve třech lokalitách

### Závěr

Byla vypracována metoda pro vysoce citlivé, selektivní, správné a přesné stanovení jednotlivých chemických forem (specií) rtuti (anorganické rtuti –  $\text{Hg}^{2+}$ , methylhydrargyrium-chloridu (MeHgCl), ethylhydrargyrium-chloridu (EtHgCl) a fenyhydrargyrium-chloridu – (PhHgCl)) vysoce účinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s atomovou fluorescenční spektrometrií (HPLC/CV-AFS). Pro separaci chemických forem rtuti byla používána reverzní chromatografická stacionární fáze Hypersil BDS C18 a isokratická eluce mobilní fází obsahující 7 % methanolu a 0,05 % 2-sulfanylethanolu v acetátovém pufru (pH 5) při průtokové rychlosti 0,15  $\text{ml min}^{-1}$ . Extrakce chemických forem rtuti byla prováděna extrakčním činidlem obsahujícím 6  $\text{mol l}^{-1}$  HCl + 0,1  $\text{mol l}^{-1}$  NaCl v mikrovlákném extraktoru (10 ml extrakčního činidla, 10 min, 55 °C, 400 W). Kalibrační křivky vykazovaly vysokou linearitu ( $r > 0,9998$ ) v koncentračním rozmezí 1–60  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Meze detekce (3 S/N, při navážce 1000  $\text{mg} \pm 0,1 \text{ mg}$  a desetinásobném ředění) a RSD hodnoty uvedené v závorkách (při 5  $\mu\text{g l}^{-1}$ ,  $n = 10$ ) byly 0,20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (3,0 %) pro MeHgCl, 0,07  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (5,3 %) pro  $\text{Hg}^{2+}$ , 0,06  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (3,4 %) pro PhHgCl a 0,12  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (4,4 %) pro EtHgCl. Stabilita odebíraných vzorků byla prodloužena na 2 měsíce lyofilizací vzorku a následným uchováním při -18 °C. Extrakty vzorků byly stabilní po dobu 30 dnů.

Oproti metodě navržené Ramalhozem<sup>9</sup>, umožňuje námi navržená metoda stanovit ve vzorku současně také sloučeniny EtHgCl a PhHgCl, snižuje retenční časy MeHgCl a  $\text{Hg}^{2+}$  a velmi zjednodušuje a urychluje extrakční postup.

*Tato práce byla financována z prostředků Grantové agentury ČR, projekt č. 525/03/1367 a 525/06/P143.*

## LITERATURA

1. Segade S. R., Tyson J. F.: *Spectrochim. Acta, Part B* 58, 797 (2003).
2. Ubillús F., Alegria A., Barberá R., Farré R., Lagarda M. J.: *Food Chem.* 71, 529 (2000).
3. Quevauviller P., Filippelli M., Horvat M.: *Trends Anal. Chem.* 19, 157 (2000).
4. Houserová P., Janák K., Kubáň P., Pavlíčková J., Kubáň V.: *Chem. Listy* 100, 862 (2006).
5. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. East Publishing, Praha 1998.
6. Houserová P., Hedbávný J., Matějčíček D., Kráčmar S., Sítko J., Kubáň V.: *Vet. Med. Czech* 50, 61 (2005).
7. Vázquez M. J., Abuín M., Carro A. M., Lorenzo R. A., Cela R.: *Chemosphere* 39, 1211 (1999).
8. Maršálek P., Svobodová Z., Randák T., Švehla J.: *Acta Vet. Brno* 74, 427 (2005).
9. Ramalhosa E., Ríó Segade S., Pereira E., Vale C., Duarte A.: *Anal. Chim. Acta* 448, 135 (2001).

**P. Houserová<sup>a</sup>, D. Matějčíček<sup>a</sup>, V. Kubáň<sup>a</sup>, J. Pavlíčková<sup>a</sup>, and J. Komárek<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, <sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, Masaryk University, Brno, Czech Republic): **Determination of Chemical Forms of Mercury Using High Performance Liquid Chromatography with Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometric Detection (HPLC/CV-AFS)**

Sonication and microwave-assisted extractions with thioacetic acid, citric acid, cysteine, 2-sulfanylethanol, aqueous HCl, and aqueous HCl – NaCl were tested for isolation of mercury species. A mixture of 6M HCl and 0.1M NaCl was selected as the most suitable extraction agent. The extraction efficiency was about 10 % higher and RSDs were below 3.3 % when microwave-assisted extraction was used instead of sonication. The HPLC/CV-AFS method was optimized and used for separation and determination of inorganic mercury and methyl-, ethyl- and phenylmercury chloride. Isocratic elution with a mixture containing 0.05 % of 2-sulfanylethanol, acetate buffer (pH 5) and 7 % of methanol, with methanol content increasing up to 100 % MeOH, was used for separation of mercury species on a reverse phase Hypersil BDS C18 column. The limits of detection of the HPLC/CV-AFS system were estimated (in  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ): 0.20 (MeHgCl), 0.07 ( $\text{Hg}^{2+}$ ), 0.06 (PhHgCl) and 0.12 (EtHgCl). The concentrations (2.5–9.7  $\text{mg kg}^{-1}$  in dry matter) of total mercury and methylmercury chloride in selected fish obtained by HPLC/CV-AFS were in good agreement (but more accurate) with GC-ECD. The RSDs 3.1–8.2 % and 4.1–9.0 % of the analytical procedures for the determination of total mercury (cold vapour AAS) and methylmercury chloride (HPLC/CV-AFS) were determined, respectively.

## STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU SUPEROXIDDISMUTASY POMOCÍ SOUPRAVY RANSOD V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

NATÁLIE BŘEZINOVÁ BELCREDI<sup>a</sup>, JAROSLAVA EHRENBARGEROVÁ<sup>a</sup>, JAROSLAV PRÝMA<sup>b</sup>  
a PAVLA HAVLOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>b</sup> Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno  
xbelcre0@node.mendelu.cz

Došlo 16.5.06, přijato 10.11.06.

Klíčová slova: superoxiddismutasa, enzym, Ransod, ječmen

### Úvod

V poslední době se mnoho vědeckých výzkumů zabývá oxidačním stresem, čímž se rozumí zvýšená přítomnost reaktivních forem kyslíku či volných radikálů, které následně vedou k porušení buňky. Za normálních podmínek je tvorba reaktivních forem kyslíku v rovnováze s mechanismy vedoucími k jejich odstraňování. Tento systém se označuje jako scavengerový, tzn. zametačový, který zajišťuje, že reakce probíhají ve fyziologickém rozmezí a organismus tudíž neohrožují. Mezi nejdůležitější enzymové scavengery patří superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa a glutathionreduktasa<sup>1</sup>.

Enzym superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) je zařazen do skupiny oxidoreduktas, jeho systematický název je superoxid/superoxid oxidoreduktasa<sup>2</sup> a byl objeven McCordem a Fridovichem jako vysoce aktivní obranný systém proti působení volných kyslíkových radikálů<sup>3</sup>. SOD katalyzuje dismutační reakci superoxidu a vodíku na méně reaktivní peroxid vodíku, který je dále odstraněn katalasami a peroxidasami<sup>1,4</sup>. Uvedená spontánní reakce je při pH 7 velmi rychlá a přesto je urychlena tímto enzymem o další čtyři řády (rychlostní konstanta je pak  $2 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (cit.<sup>5</sup>).

Superoxiddismutasa byla nalezena u téměř všech organismů, které poutají kyslík<sup>6</sup>, v některých aerotolerantních anaerobech<sup>7</sup>, obligátních anaerobech<sup>8</sup> a rozeznáváme tři druhy SOD lišící se kofaktorem, kterým je atom kovu ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ). FeSOD a MnSOD jsou strukturně velmi podobné a mají podjednotky o molekulové hmotnosti 23 kDa. Obě formy SOD se vyskytují ve formě dimeru, ale MnSOD se vyskytuje i jako tetramer<sup>9</sup> obsaže-

ný v mitochondriální matrix všech doposud studovaných rostlin na rozdíl od FeSOD, která je mnohem méně prostudovaná než MnSOD. FeSOD byla nalezena v chloroplastech u některých analyzovaných rostlinných druhů. CuZnSOD je enzym dimerické struktury o celkové molekulové hmotnosti 32 kDa, který byl identifikován v cytosolu a ve stromatu chloroplastu širokého spektra organismů<sup>10</sup> a nebo v podobě tetrameru ve tkáních člověka<sup>2</sup>.

Náš projekt se zabýval stanovením aktivity enzymu SOD v zrna ječmene, kde je lokalizován především v embryu a v menší míře je součástí i aleuronové vrstvy. Aktivita SOD v zrna ječmene se mění v závislosti na odrůdě a lokalitě pěstování<sup>11–13</sup>. SOD hraje důležitou roli nejenom v zrna ječmene, ale také ve sladu, kde zabraňuje žluknutí během skladování, což se pozitivně může odrazet na výsledném produktu pivovarského průmyslu – na pivu. Vyšší aktivita SOD byla zjištěna ve sladu oproti zrna<sup>13–15</sup>.

### Experimentální část

#### Přístroje a zařízení

Mletí vzorků zrna bylo provedeno na laboratorním mlýnku Super Jolly SJ 500 (Mezos, Česká republika). Rmutování probíhalo ve rmutovacím přístroji (I-Cube, Česká republika), který je určen pro laboratoře pivovarů a sladoven ke stanovení extraktu sladu metodami KONGRES a HARTONG. Rmutovací přístroj je opatřen mikropočítačem, odporovým teploměrem Pt 100, elektromagnetickým ventilem pro automatické zchlazování rmutovací lázně, LCD dvouřádkovým displejem, membránovou klávesnicí a řídicím softwarem. Na stanovení absorbance byl použit UV spektrofotometr Cary 1E firmy Varian (USA) ve spojení s vyhřívacím nosičem na kyvety (Varian, USA). K měření byly použity UV kyvety (Varian, USA). Podmínky, při kterých byla absorbance naměřena, jsou uvedeny v tabulce I.

#### Chemikálie a jejich příprava

Souprava Ransod (RANDOX Laboratories Ltd., Velká Británie), jejíž součástí byl substrát, pufr, xanthinoxidasa a standard. Všechny chemikálie kromě pufru byly v soupravě Ransod v sypké formě. Složení jednotlivých složek soupravy je uvedeno v tabulce II.

Princip metody je založen na využití xanthinu a xanthinoxidasy, které vytvářejí superoxidový radikál, který

Tabulka I  
Podmínky pro stanovení superoxiddismutasy

Parametr	Hodnota
Vlnová délka	505 nm
Kolona	1 cm optická délka
Teplota	37 °C
Měření	proti vzduchu

Tabulka II  
Složení soupravy Ransod

Obsah	Koncentrace roztoků	Stabilita
1. Substrát		10 dní při teplotě 2–8 °C.
Xanthin	0,05 mmol l <sup>-1</sup>	
I.N.T.	0,025 mmol l <sup>-1</sup>	
2. Pufr		uvedeno na obalu pufru
CAPS	40 mmol l <sup>-1</sup> , pH 10,2	
EDTA	0,94 mmol l <sup>-1</sup>	
3. Xanthinoxidasa	80 U/l	10 dní při teplotě 2–8 °C.
4. Standard	uvedeno vždy v příloženém letáku u soupravy	14 dní při teplotě 2–8 °C

reaguje s tetrazoliovou solí na červeně zbarvený formazán. Aktivita SOD je měřena stupněm inhibice této reakce, ke které dochází při teplotě 37 °C a absorbančí 505 nm.

Příprava soupravy Ransod:

- substrát – rozpuštěn ve 20 ml pufru,
- pufr – neupravuje se,
- xanthinoxidasa – rozpuštěna v 10 ml deionizované vody,
- standard – rozpuštěn v 10 ml deionizované vody.

Souprava Ransod je určena pro stanovení aktivity SOD ve vzorku krve.

Fosfátový pufr (RANDOX, Laboratories Ltd., Velká Británie) 0,01 mol l<sup>-1</sup>, pH 7,0.

#### V ý b ě r v z o r k ů

Pro analýzy byly použity vzorky zrna sedmi odrůd a sedmi linií jarního ječmene (tab. III), které byly vypěstovány na Školním zemědělském podniku MZLU v Žabčicích v roce 2005. Po sklizni byly odebrány vzorky zrna čtyř odrůd sladovnického typu (Amulet, Kompakt, Krona, Tolar), tří *waxy* (voskové zrno) odrůd (Wabet, Wanubet, Washonubet) vyšlechtěných v Montaně (USA), které mají v endospermu změněný poměr amylosa/amylopektinu ve prospěch amylopektinu. Dále bylo využito i zrno z vlastních linií, které vznikly křížením a selekcí odrůd sladovnických s *waxy* odrůdami. Soubor byl tedy

sestaven z geneticky odlišných genotypů, dala se tedy u nich předpokládat rozdílná aktivita sledovaného enzymu.

#### P r a c o v n í p o s t u p

##### Příprava vzorků zrna ječmene

Všechny vzorky byly rozemlety a homogenizovány. Do nádoby pro rmutování bylo naváženo 25 g vzorku zrna ječmene, které byly vystřeny 225 ml deionizované vody o teplotě 45 °C. Vzorky byly rmutovány 15 min při teplotě 45 °C ve rmutovacím přístroji metodou HARTONG. Po uplynutí této doby se vzorky samovolně nechaly chladit 30 min na teplotu 25 °C a minimálně jednu hodinu se filtrovaly. Takto upravené vzorky byly skladovány podle Bamforth<sup>11</sup> 18 h při teplotě 4 °C a zředěny 1:14 fosfátovým pufrem (0,01 mol l<sup>-1</sup>, pH 7,0) tak, aby se procenta inhibované reakce pohybovala mezi 30–60 % inhibice na ose y kalibrační křivky.

##### Měření absorbance

Další příprava byla shodná jak pro připravené vzorky zrna, tak pro standardy S1–S6 (tab. IV). Do kyvety bylo napipetováno 0,05 ml vzorku a 1,7 ml substrátu. Směs byla opatrně promíchána, vložena do spektrofotometru a inkubována 2 min při 37 °C, poté bylo přidáno 0,25 ml xanthinoxidasy, která odstartovala reakci. První absorbance byla naměřena po 30 s ( $A_1$ ) a druhá po třetí minutě ( $A_2$ ).

Tabulka III  
Seznam použitých linií a jejich zkratk

Waxy odrůdy	Použité označení	Pluchaté linie	Použité označení
Wabet	Wb	Kompakt x Krona	Ko x Kr
Wanubet	Wnb	Krona x Kompakt	Kr x Ko
Washonubet	Wsnb	Kompakt x Wabet	Ko x Wb
		Wabet x Kompakt	Wb x Ko
		Krona x Wanubet	Kr x Wnb
		Wanubet x Krona	Wnb x Kr
		Wabet x Washonubet	Wb x Wsnb

Tabulka IV  
Ředění standardu k sestrojení kalibrační křivky

Ozn.	Objem standardu	Objem fosfátového pufru [ml]
S6	neředěný standard	–
S5	5 ml z S6	5
S4	5 ml z S5	5
S3	5 ml z S4	5
S2	3 ml z S3	6
S1 <sup>a</sup>	fosfátový pufr	–

<sup>a</sup> Fosfátový pufr (S1) se rovná míra neinhibované reakce 100 %.

#### Výpočet aktivity

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \Delta A / \text{min. standardu nebo vzorku}$$

$$100 - \frac{\Delta A_{\text{standardu nebo vzorku}} / \text{min} \times 100}{\Delta A_{S1/\text{min}}} = \% \text{ inhibice}$$

$A_1$  – první absorbance naměřená po 30-ti sekundách,  $A_2$  – druhá absorbance naměřená po 3. minutě.

Procenta inhibice byly vyneseny do grafu kalibrační křivky, kde byl odečten odpovídající logaritmus koncentrace při základu deset. Po odlogaritmování byla hodnota vynásobena ředícím koeficientem a tento výsledek uváděn v jednotkách U/ml. Přepočet výsledku na U/g sušiny:

$$\text{SOD U/ml} \times \frac{\text{objem vystřené vody}}{\text{navážka vzorku zrna}} \times \frac{100}{\% \text{ sušiny}} = \text{SOD U/g sušiny}$$

#### Validace metody

##### Kalibrační křivka

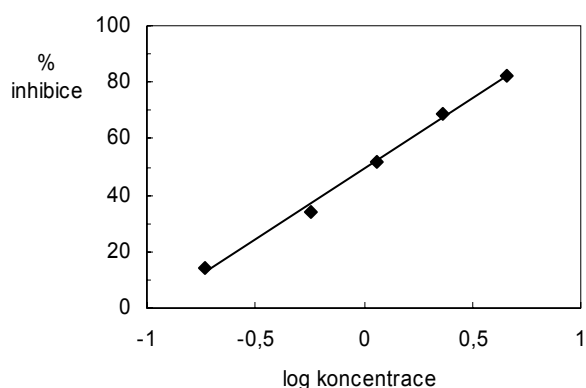
Standard byl připraven podle uvedené tabulky IV. Absorbance u připravených standardů S1–S6 byla naměřena stejným postupem jako u vzorků zrna. Tento postup je popsán výše. Do grafu byly vyneseny procenta inhibice proti  $\log_{10}$  koncentrace standardů S1–S6 (obr. 1).

##### Linearita a citlivost

Kalibrační graf byl lineární s průměrným koeficientem determinace ( $R = r^2$ )  $0,9906 \pm 0,0018$ .

##### Opakovatelnost

Přesnost byla vypočítána z 50 naměřených hodnot pro vzorek zrna linie Krona x Kompakt. Kontrolní vzorek byl měřen při každé analýze vzorků v časovém období čtyř měsíců. Průměrná aktivita enzymu SOD uvedeného vzorku byla  $(108,2 \pm 1,6)$  U/g sušiny.



Obr. 1. Kalibrační křivka;  $y = 49,625x + 49,257$ ,  $R^2 = 0,9945$

#### Statistické zpracování výsledků

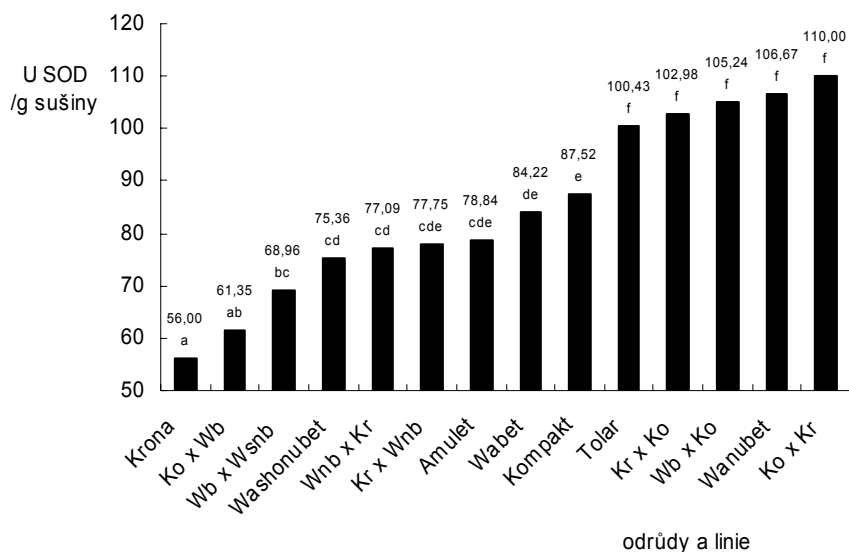
Získané experimentální výsledky byly zpracovány pomocí programu UNISTAT 5.1. vícefaktorovou analýzou variance s následným testováním rozdílů průměrných hodnot LSD –testem ( $P \leq 0,05$ ).

#### Výsledky a diskuse

Statisticky významně vyšší aktivita enzymu SOD (obr. 2) byla zjištěna u linií Ko x Kr (110 U/g sušiny), Wanubet (107 U/g sušiny), Wb x Ko (105 U/g sušiny), Kr x Ko (103 U/g sušiny) a také u sladovnické odrůdy Tolar (100 U/g sušiny) ve srovnání s dalšími devíti odrůdami a liniemi analyzovaného souboru. Odrůda Kompakt měla významně nižší aktivitu než již jmenované odrůdy, ale nelišila se významně od sladovnické odrůdy Amulet (79 U/g sušiny) a odrůdy Wabet (84 U/g sušiny), které nebyly statisticky významně rozdílné v porovnání s liniemi Kr x Wnb (78 U/g sušiny), Wnb x Kr (77 U/g sušiny) a odrůdou Washonubet (75 U/g sušiny). Sladovnická odrůda Krona (56 U/g sušiny) měla nejnižší aktivitu SOD, ale statisticky významně se nelišila od linie Ko x Wb (61 U/g sušiny).

Pomocí setu Ransod bylo možné stanovit aktivitu enzymu SOD ve vzorcích zrna ječmene po úpravě metodiky. Princip úpravy metodiky spočíval především v přípravě zrna ječmene, který byl naprosto odlišný od přípravy vzorků krve, pro který byla diagnostická souprava původně výrobcem určena. V postupu přípravy vzorků musel být vyřešen i poměr ředění fosfátovým pufrem tak, aby procenta inhibiční reakce bylo možné odečíst z grafu kalibrační křivky. Vzhledem k tomu, že se v této práci jednalo o stanovení enzymu s antioxidačním efektem, lze z uvedených výsledků předpokládat, že zrno odrůd s maximální aktivitou SOD bude vhodnou surovinou pro výrobu sladu,





Obr. 2. Průměrná aktivita enzymu superoxiddismutasy v zrna ječmene; odlišná písmena v grafu označují statisticky významně odlišné průměrné hodnoty při  $P \leq 0,05$ , Ko x Kr = Kompakt x Krona, Kr x Ko = Krona x Kompakt, Ko x Wb = Kompakt x Wabet, Wb x Ko = Wabet x Kompakt, Kr x Wnb = Krona x Wanubet, Wnb x Kr = Wanubet x Krona, Wb x Wsnb = Wabet x Washonubet

protože přítomnost enzymu v zrna a sladu zabraňuje nejen žluknutí během skladování, ale také nežádoucím příchutím piva<sup>12–16</sup>. SOD obecně, v surovinách používaných jako potraviny a krmiva, má důležitý význam jako enzymový scavenger při vychytávání škodlivých volných radikálů v lidském i živočišném organismu<sup>2</sup>.

Ze sladovnických odrůd české provenience vykazovala vysokou aktivitu SOD odrůda Tolar vyšlechtěná ve firmě Plant Select Hrubčice, dále tři linie vyšlechtěné na Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně a bezpluchá odrůda Wanubet americké provenience.

## Závěr

Cílem této práce bylo přizpůsobení analytického postupu přípravy zrna pro stanovení enzymu SOD v ječmeni jarním pomocí diagnostického setu Ransod firmy RANDOX. Opakovatelnost metody byla stanovena u linie Krona x Kompakt, jejíž průměrná aktivita SOD byla  $(108,2 \pm 1,6)$  U/g sušiny. Touto metodou jsme stanovili aktivitu SOD zrna sedmi odrůd a sedmi linií jarního ječmene sladovnické i nesladovnické kvality. Sledované vzorky měly aktivitu SOD v rozmezí 56–110 U/g sušiny. Nejnižší aktivita byla zjištěna u sladovnické odrůdy Krona. Statisticky významně vyšší aktivita byla zjištěna u pěti odrůd a linií, vesměs odlišného genetického původu, oproti dalším devíti genotypům v souboru. Pro použití na výrobu sladu se zvýšenou antioxidační kapacitou se jeví nejvhodnější česká sladovnická odrůda Tolar s aktivitou SOD 100 U/g sušiny. Ame-

rická odrůda Wabet a nově vyšlechtěné linie Kompakt x Krona, Wabet x Kompakt a Krona x Kompakt s aktivitou SOD 103–110 U/g sušiny budou vhodnými surovinami pro výrobu potravin či krmiv.

Diagnostický set Ransod, který byl popsán v této práci, lze spolehlivě použít pro stanovení aktivity SOD v zrna ječmene i ve sladu. Je však nutné přizpůsobit přípravu vzorků rostlinnému materiálu způsobem popsáným v této práci.

*Práce vznikla za podpory grantu FRVŠ 420/2005/G4, VC 1M0570 a GA ČR 525/05/0781.*

## Seznamy symbolů

CAPS	3-(cyklohexylamino)propan-1-sulfonová kyselina
I.N.T.	5-fenyl-2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-2H-tetrazolium-chlorid
Ko x Kr	Kompakt x Krona
Ko x Wb	Kompakt x Wabet
Kr x Ko	Krona x Kompakt
Kr x Wnb	Krona x Wanubet
SOD	superoxiddismutasa
Wb	Wabet
Wb x Ko	Wabet x Kompakt
Wnb	Wanubet
Wb x Wsnb	Wabet x Washonubet
Wnb x Kr	Wanubet x Krona
Wsnb	Washonubet

## LITERATURA

1. Škrha J.: *Remedia* 8, 362 (1998).
2. Fridovich I.: *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 58, 61 (1986).
3. McCord J. M., Fridovich I.: *J. Biol. Chem.* 244, 6049 (1969).
4. Hasan H. M., Fridovich I.: *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* 4, 160 (1981).
5. Mališková J.: *Bakalářská práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2004.
6. McCord J. M., Keele B. B. Jr., Fridovich I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1024 (1971).
7. Tally F. P., Goldin B. R., Jacobus N. V., Gorbach S. L.: *Infect. Immun.* 16, 20 (1977).
8. Hewitt J., Morris J. G.: *FEBS Lett.* 50, 315 (1975).
9. Racek J., Holeček V.: *Chem. Listy* 93, 774 (1999).
10. Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D.: *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 199 (1994).
11. Bamforth C. W.: *J. Inst. Brew.* 89, 420 (1983).
12. Havlová P.: *Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu*. ÚZPI, Praha, (1999).
13. Belcrediová N., Ehrenbergerová J., Havlová P.: *MendelNet'05 Agro., Brno, 29. listopad 2005*. Sborník abstraktů (Ryant P., Cerkal R., Středa T., Kapler P., Vejražka K., ed.), str. 19 (přednáška), (2005).
14. Boivin P., Allain D., Clamagirant V., Maillard M. N., Cuvelier M. E., Berset C., Richard H., Nicolas J., Forget-Richard F.: *24<sup>th</sup> Congress EBC: European Brewery Convention, Oslo, 1993*. Proceedings, str. 397, (1993).
15. Boivin P.: *Cerevisia* 26, 109 (2001).
16. Belcrediová N., Ehrenbergerová J., Havlová P.: *Acta Univ. Agric et Silv. Mendel. Brun.* 2, 7 (2006).

**N. Belcrediová<sup>a</sup>, J. Ehrenbergerová<sup>a</sup>, J. Prýma<sup>b</sup>, and P. Havlová<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*, <sup>b</sup> *Research Institute of Brewing and Malting, Brno*): **Analytical Determination of Superoxide Dismutase Enzyme in Plant Materials Using Ransod Set**

The activity of superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) in several barley grain samples was measured using a diagnostic Ransod set, which is utilized for determination of SOD in blood. The determination of SOD activity is based on inhibition of the reaction of xanthine and xanthine oxidase with a tetrazolium salt and measurement of absorbance of the produced formazane at 505 nm and 37 °C. The calibration curve was linear. The SOD activity of a Krona x Kompakt sample was (108.2±1.6) U/g dry matter. A significantly higher antioxidant activity was found in several samples, which are recommended for production of malt or food and fodder. The determination of SOD activity in barley and malt using the Ranson set is simple and reliable.

## MĚŘENÍ KRITICKÝCH MICELÁRNÍCH KONCENTRACÍ TENZIDŮ VE VODNÝCH ROZTOCÍCH

MARTINA MÜLLEROVÁ<sup>a</sup>, MAREK ŠVÁB<sup>a</sup>  
a MANUELA MOREIRA DOS SANTOS<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie ochrany prostředí, Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup> Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Rua D. Manuel II, 4050-345 Porto, Portugal

*martina.mullerova@vscht.cz*

Došlo 10.5.06, přepracováno 20.6.06, přijato 10.11.06.

Klíčová slova: tenzidy, micely, stanovení kritické micelární koncentrace

### Úvod

Roztoky povrchově aktivních látek (tenzidů) je možné použít k dekontaminaci zemin, sedimentů a kalů kontaminovaných perzistentními organickými polutanty (POP, cit.<sup>1,2</sup>). Takové znečištěné materiály představují závažný ekologický problém zejména proto, že spektrum použitelných dekontaminačních technologií je z důvodu stability a obtížné rozložitelnosti POP velmi omezené. Zajímavou alternativou pro takové materiály mohou být technologie založené na vyluhování kontaminantů vhodným vodným roztokem (většinou nazývané promývání nebo praní). Značné omezení pro technologie praní nebo promývání kontaminovaných zemin představuje nízká rozpustnost POP ve vodě. Tenzidy v roztoku ovšem umožňují jejich solubilizaci (neboli tzv. „pseudorozpouštění“) a tím převedení kontaminantu z kontaminovaného tuhého média do roztoku<sup>3</sup>.

Přestože je využití tenzidů v dekontaminačních technologiích v podmínkách České republiky poměrně novou oblastí, některá poloprovozní ověření aplikace tenzidů již úspěšně proběhla<sup>1,2</sup>. Ve všech aplikacích se využívá vlastnosti molekul tenzidu shlukovat se a tvořit tak struktury zvané micely<sup>4</sup>. Tvorbu micel umožňuje struktura molekuly tenzidu s jedním koncem molekuly nepolárním a druhým polárním. Ve vodném prostředí se v micelách tenzidy orientují nepolárním řetězcem dovnitř micely a polární skupinou ven<sup>5</sup>. Uvnitř micely tak vzniká nepolární prostředí, kde mohou být obsaženy nepolární látky (např. zmíněné kontaminanty). Tímto způsobem je tedy možné nepolární kontaminanty ze zeminy převádět do vodného roztoku<sup>6</sup>. Micelární solubilizací se mohou odstraňovat i kovy, např. Cd, Cu, Zn, Co nebo Ni. Zároveň s roztokem tenzidu je však nutné přidat i nepolární ligand. Vzniklý komplex je již nepolární a může se tedy solubilizovat uvnitř micely<sup>7</sup>.

Existence micel je v odborné literatuře označována jako zcela klíčová podmínka pro podstatnější solubilizaci nepolárních látek v roztoku tenzidu. Micely však nejsou v roztoku tenzidu přítomné v celém koncentračním rozmezí. Při nízkých koncentracích tenzidu se molekuly vyskytují výhradně jednotlivě (tzv. monomery, i když tento výraz není úplně přesný). Teprve po dosažení určité koncentrace se molekuly začínají agregovat do micel. Tato koncentrace se označuje jako kritická micelární koncentrace (KMK)<sup>4,5</sup>. V rozporu s označením se však jedná spíše o koncentrační rozmezí než o konkrétní hodnotu, ačkoli v odborné literatuře zabývající se využitím tenzidů k dekontaminacím se vždy operuje s konkrétní číselnou hodnotou.

V oblasti KMK dochází vlivem vzniku micel ke skokovým změnám celé řady vlastností tenzidového roztoku, např. povrchového napětí, osmotického tlaku, vodivosti, magnetické rezonance nebo solubilizace. Těchto změn využívají jednotlivé metody pro měření KMK. Tyto metody obecně vycházejí ze sledování závislosti některé z těchto veličin na koncentraci tenzidu a z indikace změn<sup>4</sup>. Hodnota KMK obvykle odpovídá průsečíku 2 přímků získaných proložení koncentračních závislostí měřené veličiny nad a pod KMK. Kromě běžných metod, jako je měření vodivosti<sup>8</sup>, povrchového napětí<sup>4,9</sup> nebo solubilizace přidaného barviva<sup>4,10</sup>, je možné použít i méně obvyklé metody, např. kapilární elektroforézu<sup>8,11</sup>, infračervenou spektrometrii<sup>12</sup>, potenciometrii<sup>13</sup>, NMR nebo fluorescenční spektroskopii<sup>14</sup>.

Problémem při měření KMK je obtížné porovnání naměřených hodnot s literaturou. V literatuře jsou dostupné hodnoty téměř výhradně pro čisté tenzidy, pro komerční směsi tenzidů, které se z praktických důvodů pro výzkum promývání kontaminovaných zemin obvykle používají, jsou hodnoty KMK pro porovnání výsledků velmi obtížné dosažitelné.

Existuje několik typů tenzidů. Pro promývání kontaminovaných zemin se však používají prakticky pouze tenzidy neiontové (NT) a aniontové (AT). Ostatní druhy se ve značné míře sorbují na částice zeminy a tím dochází k významnému snížení koncentrace tenzidu v promývacím roztoku<sup>15</sup>. Sorpce AT i NT na částice zeminy je méně významná.

Jak vyplývá z výše uvedených skutečností, znalost hodnoty KMK je klíčovým předpokladem pro výzkum promývání roztokem tenzidu. Proces solubilizace nepolárního kontaminantu je podmíněn přítomností micel v roztoku tenzidu, tedy překročením KMK. Vznik micel ovlivňuje kromě samotné efektivity solubilizace nepolárních látek i další procesy, např. sorpci tenzidu na zeminu<sup>16</sup> nebo rozpouštění tenzidu ve fázi kontaminantu<sup>17</sup>. Proto je znalost KMK použitého tenzidu zcela zásadní.

Cílem této práce je porovnat jednotlivé metody stanovení KMK. Vzhledem k tomu, že práce je součástí širšího výzkumu zabývajícího se promýváním kontaminovaných zemin roztokem tenzidu, jsou v rámci této práce zkoumány pouze NT a AT. V této práci byly použity 3 tenzidy neiontové a 2 aniontové.

## Experimentální část

V rámci práce byly porovnávány čtyři metody stanovení KMK tenzidů: metoda měření vodivosti<sup>8</sup>, povrchového napětí<sup>4</sup> a absorpce UV záření<sup>18</sup> a dále metoda solubilizace jódu<sup>10</sup>. Jako AT byly použity tenzidy Spolapon AOS 146 od firmy Enaspol (s obsahem aktivních složek 35,3 %) a dodecylsulfát sodný (SDS) od firmy Sigma-Aldrich o čistotě 90,5 %, resp. > 98,5 % (SDS o této vyšší čistotě byl použit jen pro srovnání výsledků při konduktometrickém stanovení KMK). Zástupcem NT byly Triton DF-16, Triton CF-21 a Brij 97, všechny od firmy Sigma-Aldrich. S výjimkou SDS se jedná o technické směsi. Pro SDS a Brij 97 existují údaje o hodnotě KMK v literatuře, pro KMK Tritonu DF-16 a Tritonu CF-21 jsou dostupné informace od výrobce. Pro Spolapon AOS 146 údaje o KMK nejsou k dispozici. V tab. I je uvedeno složení použitých tenzidů a jejich KMK nalezené v literatuře.

### Měření vodivosti

Stanovit hodnotu KMK pomocí měření vodivosti lze pouze u iontových tenzidů. V rámci této práce tedy byly touto metodou měřeny pouze oba tenzidy aniontové. Metoda využívá sledování změny vodivosti roztoku v závislosti na koncentraci tenzidu<sup>8</sup>. Do kádinky s 50 ml destilované vody byl za míchání postupně přidáván z byrety roztok aniontového tenzidu. Vodivost v kádince byla měřena konduktometrem GMH 3410 od firmy Greisinger Electronic, Regenstauf, Německo.

### Měření povrchového napětí

Metoda stanovení KMK sledováním povrchového napětí tenzidového roztoku v závislosti na jeho koncentraci je použitelná obecně pro jakýkoliv druh tenzidu. Povrchové napětí bylo měřeno skleněným stalagmometrem.

Tabulka I

Složení a KMK použitých tenzidů

Tenzid	Složení	KMK [mg l <sup>-1</sup> ]
SDS	dodecylsulfát sodný	2330 <sup>a</sup>
Spolapon AOS 146	směs lineárních alkensulfonátů a hydroxyalkansulfonátů sodných (C <sub>12</sub> –C <sub>16</sub> )	–
Triton DF-16	polyethoxylovaný lineární alkohol	530 <sup>b</sup>
Triton CF-21	polyethoxylovaný rozvětvený oktylfenyl alkohol	130 <sup>b</sup>
Brij 97	polyethoxylovaný (10) oleylalkohol	667 <sup>c</sup>

<sup>b</sup> Hodnoty KMK poskytnuté výrobcem (Sigma-Aldrich),  
<sup>a,c</sup> hodnoty KMK uvedené v literatuře<sup>10,19</sup>

Pro každou koncentraci daného tenzidu byla sledována hmotnost deseti kapek, výsledná hmotnost byla určena jako aritmetický průměr 10 měření. Toto měření bylo provedeno i pro destilovanou vodu. Hmotnost kapky pak byla přepočtena na povrchové napětí  $\gamma$  pomocí rovnice (1).

$$\gamma = \gamma_{\text{voda}} \times y/x \quad (1)$$

kde  $\gamma_{\text{voda}}$  je hodnota povrchového napětí destilované vody při teplotě měření,  $y$  hmotnost kapky roztoku tenzidu a  $x$  hmotnost kapky destilované vody. KMK byla určena ze závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu.

### Spektrofotometrické stanovení

Absorbance tenzidového roztoku byla měřena ve spektrofotometru Jasco V 530, Great Dunmow, Velká Británie. Vzhledem k tomu, že je nutné pracovat v oblasti UV záření, byly použity kyvety z křemenného skla o délce 2 cm. Z důvodu potřeby proměřit relativně velký počet roztoků s přihlédnutím ke zdlouhavé přípravě roztoků tenzidů v odměrných baňkách byly roztoky připravovány přímo v kyvetě ředěním zásobního roztoku tenzidu. Směšované objemy byly zjišťovány vážením kyvety na analytických vahách vždy před a po přidavku roztoku, resp. destilované vody. Koncentrace tenzidu v kyvetě byla poté vždy vypočtena. Roztok v kyvetě byl před měřením promíchán ponořením na asi 15 s do ultrazvukové lázně. Pro každou koncentraci bylo naměřeno spektrum v oblasti od 190 nm do 400 nm (proti destilované vodě).

### Solubilizační metoda

Poslední ověřovaná metoda využívá solubilizace přidaného barviva, v tomto případě jódu. Do 10ml odměrné baňky byl postupně automatickou pipetou přidán roztok tenzidu (různý objem) a 2,5 ml nasyceného roztoku jódu. Baňka byla poté doplněna po rysku destilovanou vodou. Pro každou koncentraci tenzidu byla proměřena absorbance pro spektrum vlnových délek od 200 do 550 nm. Absorbance byla měřena proti destilované vodě v křemenných kyvetách o délce 2 cm ve spektrofotometru Jasco V 530, Great Dunmow, Velká Británie.

V tab. II je uvedeno, které metody měření KMK byly použity pro jednotlivé tenzidy.

Tenzid SDS o čistotě > 98,5 % není v tabulce uveden, protože měření bylo provedeno jen metodou vodivostní pro účely porovnání získané hodnoty s hodnotou v literatuře (platnou pro čistý SDS).

## Výsledky a diskuse

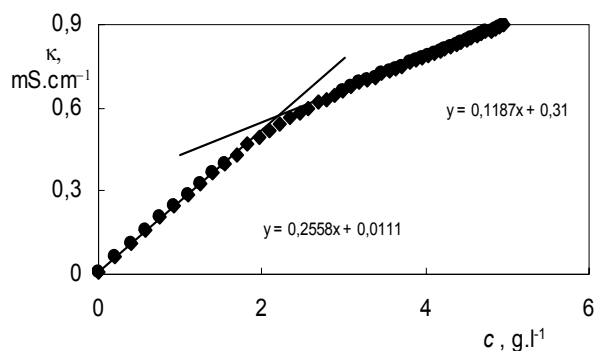
### Měření vodivosti

Tato metoda je použitelná pouze pro iontové tenzidy. Závislost vodivosti na koncentraci tenzidu je reprezentována dvěma přímkami s rozdílnými směnicemi. První z nich odpovídá koncentracím pod KMK, kdy jsou v roztoku

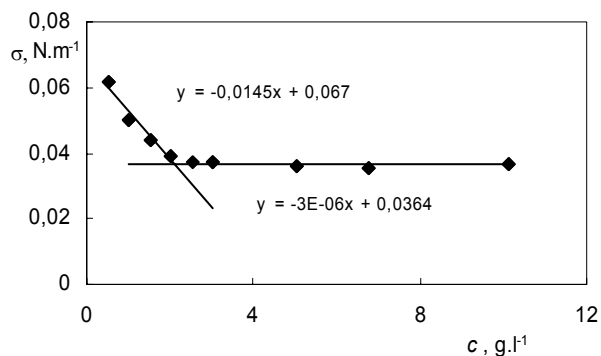
Tabulka II  
Metody měření KMK použité pro jednotlivé tenzidy

Metoda	SDS 90,5 %	Spolapon AOS 146	Triton DF-16	Triton CF-21	Brij 97
Povrchové napětí	x	x	x	x	x
Vodivost	x	x	—	—	—
Spektrofotometrické stanovení	x	x	x	x	x
Solubilizace	x	x	x	x	x

x – KMK daného tenzidu byla touto metodou stanovena



Obr. 1. Změny vodivosti v závislosti na rostoucí koncentraci tenzidu SDS (90,5%)



Obr. 2. Závislost povrchového napětí na koncentraci tenzidu SDS (90,5%)

přítomny pouze jednotlivé molekuly tenzidu. Při vyšších koncentracích začínají vznikat micely a dochází ke změně směrnice. Průsečík těchto přímek představuje výslednou hodnotu KMK (cit.<sup>8</sup>, obr. 1).

Tato metoda je experimentálně poměrně nenáročná a umožňuje jednoduše získat vodivost pro velké množství koncentrací. Stejným způsobem byly vyhodnoceny obdobné křivky získané pro tenzid SDS o čistotě > 98,5 % a Spolapon AOS 146. Grafy zde z důvodu rozsahu článku nejsou uvedeny. Výsledné hodnoty KMK shrnuje tab. III.

#### Měření povrchového napětí

Tuto metodu je možné použít pro stanovení KMK obou skupin tenzidů: AT i NT. Hodnota povrchového napětí roztoku tenzidu s rostoucí koncentrací klesá, v oblasti KMK dochází ke zpomalení tohoto poklesu. Tato skutečnost je vidět na obr. 2, který zobrazuje závislost povrchového napětí roztoku SDS na koncentraci tenzidu. Obdobně jako u metody měření povrchového napětí je možné hodnotu KMK tenzidu vypočítat jako průsečík dvou přímek<sup>4</sup>.

KMK tenzidu Spolapon AOS 146 metodou měření povrchového napětí stalagmometrem nebylo z důvodu přílišné pěnivosti jeho roztoku možné stanovit. Pro všechny ostatní tenzidy bylo měření provedeno a vyhodnoce-

no podobným způsobem, jaký znázorňuje obr. 2. Výsledné KMK jsou shrnuty v tab. III.

#### Spektrofotometrické stanovení

Tato metoda je založena na absorpci UV záření roztokem tenzidu. S rostoucí koncentrací tenzidu dochází při vlnové délce maxima ke zvyšování absorpce. Se vznikem micel se však tento nárůst zpomaluje (obr. 3). Vlnová délka absorpčního maxima většiny tenzidů se pohybovala od 190 do 195 nm, u tenzidu Triton CF-21 od 196 do 206 nm. U tenzidu Spolapon AOS 146 nemá závislost absorpce na vlnové délce maximum. Navíc pro koncentrovanější roztoky přesahovala absorpce při nízkých vlnových délkách měřicí rozsah přístroje. Z tohoto důvodu bylo pro vyhodnocení hodnoty KMK zvolena absorpce při konstantní vlnové délce 220 nm. Stejně jako u obou předchozích metod představuje hodnotu KMK průsečík dvou přímek vzniklých proložením naměřených dat. Výsledné KMK jsou shrnuty v tab. III.

#### Solubilizační metoda

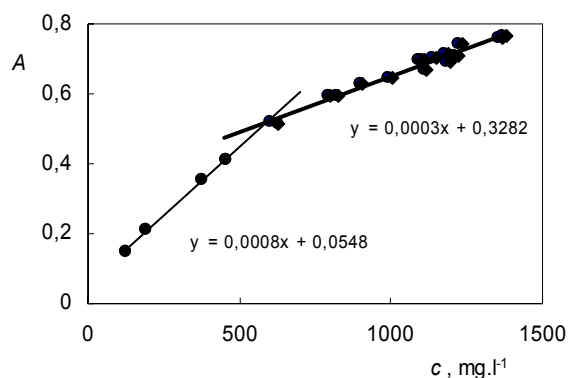
Pro použití této metody se jako klíčový faktor ukázalo solubilizační činidlo – nasycený roztok jódu. Jód bylo

Tabulka III

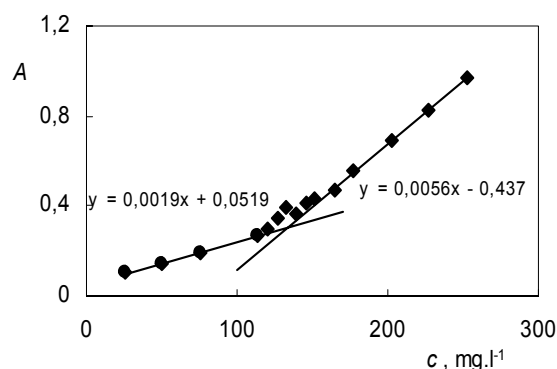
Hodnoty KMK v  $\text{mg l}^{-1}$  pro jednotlivé tenzidy naměřené různými metodami

Metoda	SDS 90,5 %	SDS 98%	Spolapon AOS 146	Triton DF-16	Triton CF-21	Brij 97
Měření vodivosti	2177	2372	2519	–	–	–
Povrchové napětí	2321	–	–	561	105	88
Spektrofotometrické stanovení	2373	–	2951	557	107	61
Solubilizace – absorbance při 286 nm	–	–	–	535	134	52

nutné rozpustit pomocí ultrazvuku a roztok skladovat ve tmě v uzavřené nádobě. I za těchto podmínek však docházelo ke snižování jeho absorbance, proto bylo nutné provádět měření KMK daného tenzidu v poměrně krátkém časovém úseku. Jako KMK byly, podobně jako u metody spektrofotometrické, vyhodnoceny koncentrace tenzidu, při kterých dochází při vlnových délkách 286, 346



Obr. 3. Závislost absorbance UV záření na koncentraci tenzidu Triton DF-16



Obr. 4. Závislost absorbance záření o vlnové délce 286 nm na koncentraci tenzidu Triton CF-21 za konstantního přírůvku jódu

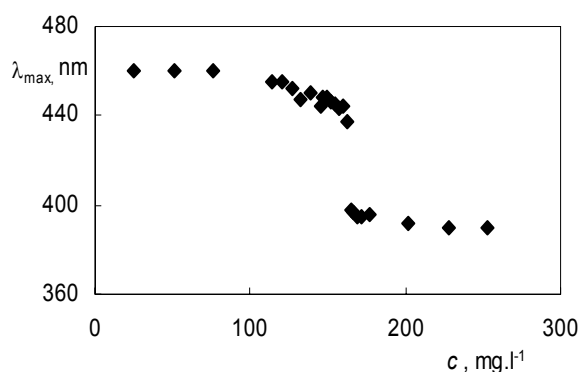
a 460 nm ke změně absorbance<sup>10</sup>(obr. 4), což bylo indikováno změnou směrnice přímky, kterou byla naměřená data proložena v oblasti nižších a vyšších koncentrací než KMK. Druhou metodou vyhodnocení bylo sledování vlnové délky maxima. Při koncentracích tenzidu pod hodnotou KMK byla vlnová délka maxima 460 nm, s rostoucí koncentrací tenzidu se však tato vlnová délka snižovala, až se ustálila na hodnotě asi 380 nm (obr. 5). KMK byla určena jako minimální hodnota první derivace závislosti vlnové délky maxima na koncentraci<sup>10</sup> (obr. 6), což teoreticky odpovídá inflexnímu bodu na naměřené křivce.

Výsledné KMK jsou shrnuty v tab. III.

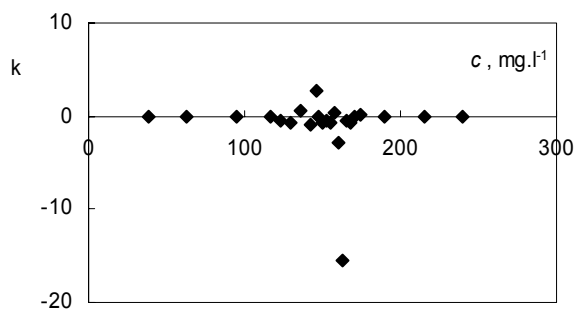
Pro měření KMK SDS nebyla tato metoda použitelná, protože nedocházelo k posunu vlnové délky maxima a závislost absorbance na koncentraci při 286, 346 a 460 nm vykazovala lineární průběh bez změn směrnice. Rovněž KMK Spolaponu AOS 146 nebylo možné touto metodou měřit. Při vyšších koncentracích Spolaponu absorpční spektrum nevykazovalo žádná maxima, protože absorbance solubilizovaného jódu byla překryta absorpcí tenzidu. Tento problém nevyřešilo ani zvýšení přírůvku nasyceného roztoku jódu.

Porovnání výsledků získaných různými metodami umožňuje tab. III.

Z tabulky III vyplývá, že všechny metody poskytují podobné výsledky. Odchyly mezi jednotlivými hodnotami je možné vysvětlit (kromě nepřesnosti měření) výše zmíněnou skutečností, že KMK představuje oblast koncentrací, nikoli konkrétní hodnotu. Navíc, jak bylo uvedeno, každá metoda využívá změny jiné vlastnosti roztoku. Diskutabilní je i vyhodnocení výsledků metod, kde se jedná o nalezení průsečíku proložených přímek. Hodnota průsečíku závisí na tom, které body se do proložení uvažují. V rámci této práce byly do proložení zahrnuty body (např. obr. 3 a obr. 4), které byly od očekávaného průsečíku vzdálenější (většinou alespoň 3 body v oblasti změny směrnice byly vynechány). Je však nutné připustit, že tímto postupem je do vyhodnocení vnesen určitý subjektivní prvek. Hodnoty KMK získané všemi metodami jsou proto spíše odhadem a nelze čekat přesnou shodu s publikovanými údaji, které byly navíc získány podobně subjektivním způsobem. Skutečnost, že různé metody měření KMK poskytují částečně odlišné výsledky, vyvolává nutnost uvádět u každé hodnoty KMK i metodu, jakou byla tato hodnota stanovena. Pokud je však cílem pouze přibližná hodnota sloužící např. pro porovnání různých



Obr. 5. Závislost vlnové délky maxima ( $\lambda_{\max}$ ) v přítomnosti jódu na rostoucí koncentraci tenzidu Triton CF-21



Obr. 6. Závislost směrnice tečny ( $k$ ) na koncentraci tenzidu Triton CF-21

tenzidů, není zřejmě nutné metodu uvádět.

S výjimkou tenzidu Brij 97 odpovídají naměřené výsledky hodnotám uvedeným v literatuře (tab. I). Hodnota KMK tenzidu Brij 97 uvedená v literatuře<sup>10</sup> je o řád vyšší než KMK naměřené v této práci. V literatuře však není uveden zdroj, odkud byla tato hodnota převzata, ani jakým způsobem byla naměřena – není tedy možné ověřit spolehlivost této hodnoty. Vzhledem k tomu, že v této práci se hodnoty KMK tenzidu Brij 97 naměřené pomocí různých metod navzájem příliš neliší, je možným vysvětlením rozdílu oproti literatuře řádová chyba v publikované hodnotě.

Při srovnání jednotlivých metod vychází jako nejméně vhodná metoda měření povrchového napětí, která je experimentálně velmi náročná. Pro AT se ukazuje jako nejvhodnější měření vodivosti, NT je možné měřit spekt-

rofotometricky v UV oblasti nebo pomocí solubilizace jódu. Výhodou metody posunu vlnové délky maxima při přidávku jódu je jednodušší vyhodnocení výsledků oproti metodám ostatním.

#### Seznam zkratk

POP	perzistentní organické polutanty
KMK	kritická micelární koncentrace
NT	neiontový tenzid
AT	aniontový tenzid
SDS	dodecylsulfát sodný

#### LITERATURA

- Šváb M., Kubal M., Raschman R.: EKO 6, 19 (2003).
- Šváb M., Kubal M., Raschman R.: Odpady 2, 22 (2004).
- Lowe D. F., Oubre C. L., Ward C. H.: *Surfactants and Cosolvents for NAPL Remediation*. Lewis Publishers, Boca Raton 1999.
- Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B.: *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. John Wiley & Sons, Chichester 2003.
- Blažej A.: *Tenzidy*. ALFA, Bratislava 1977.
- Zhou M., Rhue R. D.: Environ. Sci. Technol. 34, 1985 (2000).
- Shin M., Barrington S. F., Marshall W. D., Kim J.: Chemosphere 58, 735 (2005).
- Fuguet E., Rafols C., Rosés M., Bosch E.: Anal. Chim. Acta 548, 95 (2005).
- Patist A., Bhagwat S. S., Penfield K. W., Aikens P., Shas D. O.: J. Surf. Det. 3, 53 (2000).
- Hait S. K., Moulik S. P.: J. Surf. Det. 4, 303 (2001).
- Lin C. E.: J. Chromatogr., A 1037, 467 (2004).
- Tran C. D., Yu S.: J. Colloid Interface Sci. 283, 613 (2005).
- Nakashima T., Anno T., Kanda H., Sato Y., Kuroi T., Fujii H., Nagadome S., Sugihar G.: Colloids Surf., B 24, 103 (2002).
- Hierrezuelo J. M., Aguiar J., Ruiz C.: Colloids Surf., A 264, 29 (2005).
- Lee J. F., Hsu M. H., Chao H. P., Huang H. C., Wang S. P.: J. Hazard. Mater. B114, 123 (2004).
- Pavan P. C., Crepaldi E. L., Gomes G., Valim J. B.: Colloids Surf., A 154, 399 (1999).
- Zhao B., Zhu L., Yang K.: Chemosphere 62, 772 (2006).
- Aroguz A. Z.: Rev. Roumaine Chim. 38, 403 (1993).
- Mukerjee P., Mysels K. J.: *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*. United States Department of Commerce, Washington 1971.

**M. Müllerová<sup>a</sup>, M. Šváb<sup>a</sup>, and M. Moreira dos Santos<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Chemistry of Environment Protection, Institute of Chemical Technology, Praha* <sup>b</sup> *Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, Portugal*): **Measurement of Critical Micellar Concentrations of Tensides in Aqueous Solutions**

Critical micellar concentrations (CMC) of anionic Na dodecyl sulfate and Spolapon AOS 146 as well as of non-ionic Triton DF-16, Triton CF-21 and Brij 97 were meas-

ured by conductivity, surface tension, UV absorption and iodine solubilization methods. The obtained results were comparable and roughly in accordance with the literature data. The method of CMC determination should be always given in publications. The most appropriate method for anionic tensides is conductivity measurement whereas for nonionic tensides it is UV absorption and iodine solubilization. The surface tension measurement was experimentally demanding.



### **Dosáhli jste úspěchu ve výzkumu? Chcete pozvat veřejnost i odborníky na zajímavou vědeckou akci? Zajímají vás novinky v oblasti přírodních věd?**

Pak na adrese  
**[www.projektmedved.eu/stredisko](http://www.projektmedved.eu/stredisko)**  
navštivte nově vzniklé  
**Tiskové středisko vědy.**

Aktivitu směřující k popularizaci vědy připravil řešitelský tým projektu Medializace vědy (MedVěd) Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Garantem projektu i samotného střediska vědy je děkan Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého prof. RNDr. Juraj Ševčík, Ph.D. Tým tvoří odborníci z mediální i vědecké sféry.

Tiskové středisko vědy si klade za cíl vytvořit místo na internetu, kde si široké spektrum lidí od odborníků až po laickou veřejnost nebo novináře bude moci jednoduchým způsobem najít články, tiskové zprávy, avíza a výstupy z výzkumů z celé republiky.

Příspěvky přijímáme na adrese **[veda@projektmedved.eu](mailto:veda@projektmedved.eu)**. Zprávy bez zbytečného odkladu zařazujeme do systému, kde jsou tříděny podle regionu, kategorií nebo oborů. Portál tak nabízí snadnou orientaci v katalogizovaných zprávách, ale i vyhledávání pomocí fulltextového nástroje.

MedVěd – projekt medializace vědy  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Třída Svobody 26, 771 46 Olomouc,  
e-mail: [info@projektmedved.eu](mailto:info@projektmedved.eu), tel.: 585 634 004



## VLIV ZMĚN FYZIKÁLNÍCH PARAMETRŮ FLUIDNÍCH VRSTEV NA CHARAKTERISTIKY TLAKOVÝCH FLUKTUACÍ

OTAKAR TRNKA a MILOSLAV HARTMAN

Ústav chemických procesů, AV ČR, Rozvojová 135, 165 02  
Praha 6  
trnka@icpf.cas.cz

Došlo 29.6.06, přijato 7.12.06.

Klíčová slova: tlakové fluktuace, pracovní režimy fluidních vrstev, flukтуаční charakteristiky

### Úvod

Fluidační technika se používá v chemických zařízeních již poměrně dlouho. Mezi první technologie, ve kterých byla fluidní vrstva úspěšně aplikována, patří např. fluidní krakování uhlovodíků a zplyňování nebo spalování hnědého uhlí<sup>1,2</sup>. Způsob fluidizace nebo hydrodynamický režim fluidních vrstev je velice proměnlivý. Je ovlivňován hlavně fyzikální charakteristikou částic a rychlostí proudění fluidačního média. Významný je také vliv geometrie fluidní kolony či reaktoru. Rozdílné režimy fluidní vrstvy lze podle rostoucí rychlosti plynu rámcově seřadit následně: nehybná vrstva, bublinové fluidace, pístová fluidace, turbulentní případně rychlá fluidace a pneumatický transport. Podrobně jsme se stavy v systémech tuhá látka – plyn zabývali ve svých dřívějších pracích<sup>3,4</sup>.

Při provozu zařízení s fluidními vrstvami v systému tuhá látka – plyn má na výsledky procesů, které jsou ve vrstvách realizovány, podstatný vliv to, jaké fluidační režimy zde panují. Proto je sledování aktuálních fluidních režimů probíhajících ve vrstvě důležitou podmínkou úspěšné kontroly a řízení chemických procesů provozovaných ve fluidních vrstvách. Definiční jednotlivých fluidačních režimů jsou udávány většinou popisně a režimy samy se těžko určují na základě objektivních kvantitativních ukazatelů. Také členění fluidačních režimů při rostoucím průtoku není v literatuře uváděno zcela jednoznačně. Užitečné informace o hydrodynamice systému lze získat ze studia fluktuací tlaku uvnitř vrstvy. Je zřejmé, že tlakové fluktuace jsou vyvolávány vznikem a pohybem bublin (plynných kapes) a shlukem částic ve vrstvě. Na druhé straně řada detailů kolem šíření tlakových vln ve vrstvě zůstává nejasná<sup>5-8</sup>. V dalším textu použijeme členění užitého v pracích<sup>8,10</sup> a uvedeného přehledně v tabulce I. V práci<sup>10</sup> jsou také definovány prahové rychlosti jednotlivých skupin (tříd) fluidačních režimů:  $U_{mf}$  (prah fluidace),  $U_{turb}$

(prah turbulenci),  $U_{dil}$  (prah řídkých vrstev) a  $U_{out}$  (prah trvalého úletu).

Jedním ze způsobů, jak odhadovat aktuální režimy fluidací, je sledování a vyhodnocování tlakových fluktuací uvnitř vrstvy. Tento postup vede k objektivně měřitelným výsledkům, které lze obdržet metodami spektrální analýzy časových řad naměřených tlaků.

### Flukтуаční model fluidní vrstvy

V např. předchozí práci<sup>8</sup> je na základě měření tlakových fluktuací navržen flukтуаční model fluidní vrstvy. Ten je postaven na zpracování časových řad metodou diskrétní Fourierovy transformace (dále FFT), která je uvedena např. v cit<sup>9</sup>. Pro danou modelovanou fluidní vrstvu je postupně po časových úsecích dané délky 64 s zvyšován průtok plynu ( $U$ ) od nulové hodnoty až po maximálně provozovaný průtok  $U_{max}$ . V každém časovém úseku je změřena řada diskrétních hodnot tlaku plynu ( $P$ ) ve vrstvě a to s frekvencí 512 vzorků za vteřinu. Podél sekvence hodnot tlaku  $P$  délky 64 s ( $U$  konstantní) je postupně posunováno časové okno o délce 4 s, a to s krokem posuvu 1 s. Původních 2048 vzorků připadajících na časový interval 4 s je redukováno postupným průměrováním na počet 512 vzorků. Na datovou řadu každého okna je aplikován algoritmus FFT. Obdržíme 256 hodnot  $c_i$  (komplexních čísel), která reprezentují hodnoty spektrálních čár z oboru frekvencí  $f_i \in [f_{min}, f_{max}]$ , kde  $f_{min}=0,25$  Hz a  $f_{max}=64$  Hz. Komplexní spektrum je přepočteno na spektrum amplitudové ( $a_i = |c_i|$ ). Amplitudy  $a_i$  jsou následně seříděny sestupně podle svých hodnot. V pracích<sup>8,10</sup> jsou definovány dva parametry, které charakterizují tlakové fluktuace v daném časovém okně. Jsou to parametry označené jako  $E$  a  $M$  a stručně definované následujícími algoritmy a vzorci:

Medián  $f_M$  seříděného spektra je definován jako

$$f_M = f_{i_M} \quad (1)$$

kde  $i_M$  splňuje podmínku

$$\sum_{i=1}^{i_M} a_i = \sum_{i=i_M+1}^{256} a_i \quad (2)$$

Výkon spektra  $W$  je dán vzorcem



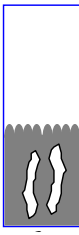


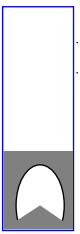

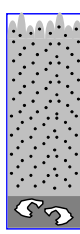

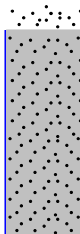

$$W = \frac{4}{256} \sum_{i=1}^{256} a_i^2 \quad (3)$$

Fluktuace tlaku v daném časovém okně jsou charakterizovány dvojicí hodnot  $M$  a  $E$  definovaných vztahy:

$$M = 1 - \frac{f_M}{f_{max}} \quad (4)$$

$$E = \sqrt{W} \quad (5)$$

Tabulka I  
Přehled režimů vrstvy zrnitého materiálu vertikálně protékané plynem<sup>a</sup>

Statické vrstvy	Bublinové vrstvy	Turbulentní vrstvy	Řídké vrstvy
 <p>nehybná vrstva</p> <p><b>1</b></p>	 <p>četné bubliny, částice v pohybu</p> <p><b>2+</b></p>	 <p>střední turbulence</p> <p><b>6</b></p>	 <p>začínající úlet částic</p> <p><b>8</b></p>
 <p>sporadické bubliny, částice v klidu</p> <p><b>2-</b></p>	 <p>velké bubliny</p> <p><b>3</b></p>	 <p>plná turbulence</p> <p><b>7</b></p>	 <p>řídká vrstva</p> <p><b>9</b></p>
	 <p>explodující bubliny</p> <p><b>4</b></p>		 <p>transportní řídká vrstva</p> <p><b>10</b></p>
	 <p>pístování</p> <p><b>5</b></p>		

<sup>a</sup> Rychlost plynu a mezerovitost vrstvy stoupají shora dolů a zleva doprava

Veličina  $M$  nabývá hodnot z intervalu  $[0,66, 1]$  a lze ji chápat jako míru dominantnosti spektra. Pro náhodný signál  $M \rightarrow 0,66$ , pro signál s jedinou (dominantní) frekvencí  $M \rightarrow 1$  (cit. <sup>8,10</sup>).

Hodnoty  $M(U)$  a  $E(U)$ , přiřazené určitému experimentálnímu bodu  $U$ , definujeme jako výsledek průměrování

hodnot  $M$  a  $U$  každého 4-sekundového okna podél jeho posuvu naměřenou 64-sekundovou sekvencí dat.

Trojici hodnot  $\mathbf{p} = [E(U), M(U), U]$  z třírozměrného prostoru  $\mathbf{F} \equiv E \times M \times U$  nazýváme „flukuačním bodem“ (stavem) fluidní vrstvy při rychlosti  $U$  proudícího plynu. Pro danou fluidní vrstvu je  $\mathbf{p}$  funkcí průtokové rychlosti plynu

$U$ , t.j.  $\mathbf{p} = \mathbf{p}(U)$ . Pro  $U \in [0, U_{\max}]$  reprezentuje  $\mathbf{p}(U)$  křivku v prostoru  $\mathbf{F}$ , kterou nazýváme fluktuální charakteristikou (fluidní vrstvy). Projekcí křivky do rovin  $E \times M$  a  $E \times U$  obdržíme graf „fluktuální charakteristiky“. Do tohoto grafu zaneseme změřené body  $\mathbf{p}(U_i)$  pro  $i = 1, 2, \dots, n_{\text{exp}}$ , kde  $n_{\text{exp}}$  je počet experimentálních bodů daného experimentu.

Jestliže se během provozu nemění žádný jiný provozní parametr fluidní vrstvy kromě rychlosti průtoku  $U$ , nazýváme tuto skutečnost „konkrétní realizací fluidní vrstvy“. Fluktuální charakteristika konkrétní realizace fluidní vrstvy je reprezentována křivkou neměnnou v čase. Změnou realizace fluidní vrstvy dochází obecně ke změně průběhu její charakteristické křivky. Fluidní vrstvu s neměnnou fluktuální charakteristikou nazýváme vrstvou stacionární. Vrstvu, jejíž fluktuální charakteristika se mění s časem, nazveme vrstvou nestacionární.

### Obecné transformace charakteristik

Jakákoliv změna materiálových a fyzikálních vlastností fluidní vrstvy je vždy provázena změnou průběhu příslušné fluktuální charakteristiky. Platí také ale opačné tvrzení: změna průběhu charakteristické křivky upozorňuje na to, že se vlastnosti fluidní vrstvy změnila. Nás bude především zajímat, jaký je vzájemný vztah mezi původní charakteristikou a charakteristikou po změně fyzikálních vlastností dané vrstvy. Cílem je ze způsobu změn charakteristických křivek odhadnout, k jakým změnám fyzikálních vlastností zkoumané vrstvy dochází. Ke srovnání dvou různých fluktuálních charakteristik použijeme metodu transformace jedné křivky na druhou, t.j. transformace souřadnic  $U$ ,  $E$  a  $M$ , při níž originální křivka přejde v křivku druhou resp. v křivku s nejmenší odchylkou (ve smyslu nejmenších čtverců) od originálu.

Dvě charakteristické křivky mohou být na sebe transformovány nejrůznějšími, obecně nelineárními transformacemi souřadnic  $U$ ,  $E$ ,  $M$ . Nejjednodušší transformací je transformace lineární. Lineární transformace popisují celou řadu důležitých a častých změn fluidních vrstev. Jednotlivé případy budou popsány dále.

### Lineární transformace charakteristik

Předpokládejme, že symbol  $E_0$  reprezentuje úroveň šumu pozadí, to je úroveň fluktuací, které vykazuje fluidní vrstva v klidovém stavu. Dále předpokládejme, že daná fluidní vrstva je popsána charakteristickou křivkou

$$[U, E(U), M(E)] \quad (6)$$

Nechť symboly  $\Delta$ ,  $a$ ,  $b$  značí tři konkrétní reálná čísla. Budeme říkat, že charakteristická křivka

$$[\underline{U}, \underline{E}(U), \underline{M}(E)] \quad (7)$$

je lineárně podobná (lineárně transformována z) křivce ( $I$ ), jestliže platí vztahy:

$$\underline{U} \cong \beta \cdot (U - \Delta) \quad , \quad \underline{E} - E_0 \cong \alpha \cdot (E - E_0) \quad , \quad (8)$$

$$\underline{M} = M$$

Jak uvidíme dále, lineárně podobné si jsou charakteristické křivky v případě některých důležitých základních změn ve fluidních vrstvách. Po určení parametrů  $\Delta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  mohou tato čísla kvantitativně určovat velikost dotyčných změn. Máme tak dán jistý nástroj nejen pro určení typů změn vrstvy, ale i pro odhad velikostí těchto změn. V následujících kapitolách budou rozebrány některé konkrétní případy takových změn a jejich promítnutí do změn fluktuálních charakteristik.

### Experimentální část

#### Změna množství materiálu ve vrstvě při konstantním průměru částic

Změna množství materiálu ve fluidní vrstvě je jednou z velice častých a poměrně jednoduchých změn parametrů vrstev, které vedou ke změně jejich chování a také odpovídajícím změnám fluktuálních charakteristik. Pojmem „množství materiálu ve vrstvě“ míníme v rámci tohoto článku klidový (sytný) objem vrstvy udaný v prostorových objemových jednotkách (ml).

Při změně množství materiálu v dané realizaci fluidní vrstvy zachovává fluktuální charakteristika veškeré prahové rychlosti tříd režimů ( $U_{\text{mf}}$ ,  $U_{\text{turb}}$ ,  $U_{\text{dil}}$ ), rychlosti počátků jednotlivých režimů  $U_i$ ,  $i=1, \dots, 10$ , jakož i polohu  $U_M$ , maxima křivky  $E(U)$ . Na základě experimentálních dat lze uvést pro vztah mezi množství materiálu a hodnotami  $E$  empirický vzorec:

$$\frac{E_1(U) - E_0}{E_2(U) - E_0} = \left( \frac{m_1}{m_2} \right)^2 \quad (9)$$

pro všechna  $U$  z intervalu  $0 \leq U < U_{\text{out}}$

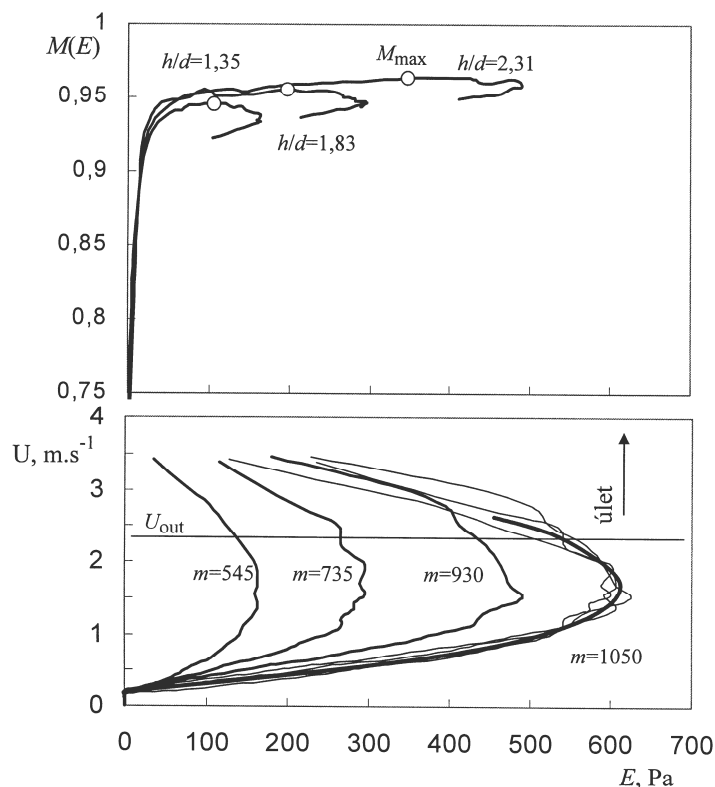
Přitom  $m_1$  a  $m_2$  značí dvě různá množství materiálu,  $E_1(U)$  a  $E_2(U)$  jim odpovídající hodnoty veličin  $E(U)$ . Symbolem  $E_0$  rozumíme hodnotu šumu pozadí. Situaci při změně množství materiálu ve vrstvě ilustruje obr. 1.

Ve vzorci (9) uvedená relace zůstává v platnosti i v případě, že bychom množstvím materiálu ve vrstvě definovali jako hmotnost nebo výšku fluidní vrstvy v klidovém stavu.

Platnost vzorce (9) byla prověřena pro vrstvy s hodnotami podílu  $h/d$  výšky a průměru vrstvy (kde  $h$  je sytná výška vrstvy a  $d$  její průměr) z intervalu  $1 \leq h/d \leq 3$ . Vztah je v praxi použitelný např. pro odhad množství materiálu, který během provozu nevrátne ulétne z fluidní vrstvy, resp. množství, které bylo do vrstvy během provozu přidáno či z ní odebráno.

Jak je patrné z obr. 1, se snižováním výšky vrstvy klesá hodnota  $M_{\text{max}}$  (maximálně dosažená hodnota veličiny  $M(E)$ ), reprezentující schopnost vrstvy pístovat. Pro podíl  $h/d \in <1$  až  $3>$  lze veličinu  $M_{\text{max}}$  aproximovat lineárně vztahem:

$$M_{\text{max}} = a \cdot (h/d) + b \quad (10)$$



Obr. 1. Vliv množství částic ve fluidní vrstvě na její fluktuální charakteristiku; charakteristické křivky pro fluidní vrstvy vápence s frakcí částic 0,5–0,65 mm. Uvedeny křivky pro vrstvy s klidovým objemem  $m=545$  ml ( $h/d=1,35$ ),  $m=735$  ml ( $h/d=1,85$ ) a  $m=930$  ml ( $h/d=2,31$ ). Soustava tří slabších křivek označená množství  $m=1050$  ml zobrazuje přepočítání tří předchozích křivek na vyznačené množství využitím vztahu (9). Silná křivka znázorňuje střední hodnotu všech tří přepočtů. Dělicí hranice se souřadnicí  $U=U_{out}$  značí začátek úletu částic mimo fluidní prostor (režim 10). Body označené značkou reprezentují maxima funkce  $M(E)$

kde  $a$  a  $b$  jsou konstanty, charakteristické pro zvolený fluidní prostor a daný materiál tvořící pevnou složku vrstvy.

Na obr. 1 je znázorněna změna fluktuální charakteristiky pro fluidní vrstvu s částicemi vápence o frakci 0,5 až 0,65 mm. Charakteristiky jsou zobrazeny pro vrstvy o klidovém objemu 545, 735 a 930 ml, což je ekvivalentní podílům výšky a průměru vrstvy s hodnotami 1,35, 1,85 a 2,31. Pro ilustraci platnosti vztahu (9) jsou znázorněny také tři průběhy funkce  $E(U)$ , které odpovídají přepočtu původních funkcí na předpokládaný průběh při fiktivním množství 1050 ml. Křivka znázorněná silnou čarou je grafem průměrné hodnoty všech tří přepočtů. Na první pohled je patrná poměrně dobrá shoda všech tří přepočtů, a to až k meznímu průtoku  $U_{out}$ , který označuje začátek trvalého úletu z vrstvy. Naopak pro průtoky  $U > U_{out}$  je shoda podstatně menší, což je důkazem nestacionarity fluidní vrstvy po překročení prahu  $U_{out}$ . Velké rozdíly v oblasti nad prahem  $U_{out}$  jsou důsledkem různých časových průběhů měření během jednotlivých experimentů a tudíž rozdíl-

ným množství materiálu, který v daném časovém úseku nevratně ulétl mimo fluidní prostor.

Vztah (9) je velmi dobře využitelný pro určení změny množství materiálu v případě, že do fluidní vrstvy je vsypán materiál původních vlastností nebo k určení množství materiálu, které se z vrstvy ztratilo během provozu.

Právě popisovaná změna fluidní vrstvy je nejjednodušším případem vedoucím k lineární transformaci charakteristických fluktuálních křivek. V tomto speciálním případě je dána vztahy (8) po dosazení parametrů:

$$\Delta = 0, \beta = 1 \quad a \quad \alpha = \left( \frac{m_1}{m_2} \right)^2 \quad (11)$$

Hystereze po částečném úletu pevného materiálu během provozu

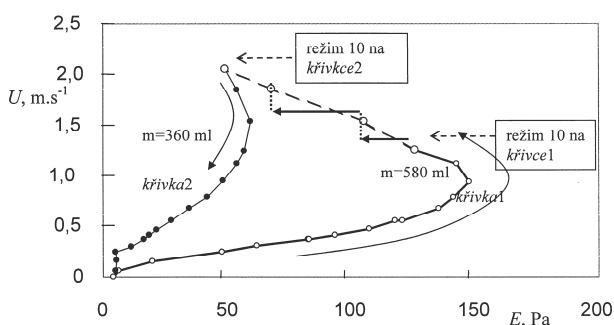
V tomto odstavci se věnujeme jevu, který nazýváme hysterezi fluktuální charakteristiky. Efekt vzniká tak, že

v zařízení je postupně zvyšován průtok plynu od  $0 \text{ m s}^{-1}$  až po průtok, který přesáhne prah  $U_{\text{ent}}$  trvalého úletu (t.j. počátek režimu 10 z tabulky I). Přitom určíme pro toto rozpětí  $U$  průběh flukuační charakteristiky. Jestliže je potom určována charakteristika vrstvy pro postupně se snižující průtoky plynu, výsledná křivka není identická s původní. Příčinou je skutečnost, že po přestoupení průtoku nad mez  $U_{\text{ent}}$  jistá část pevných částic opouští trvale fluidní prostor a navíc odlétnou z vrstvy spíše částice menších velikostí. To ale znamená, že vrstva nemá původní vlastnosti a tedy podle již zavedené definice se změnila jedna konkrétní realizace vrstvy v druhou. A k oběma realizacím pak pochopitelně patří různé charakteristické křivky.

Příklad jednoho takového experimentu znázorňuje obr. 2.

Pro fluidní vrstvu o klidovém objemu 580 ml s frakcí 0,1 mm až 0,65 mm síranu vápenatého je postupně zvyšována průtoková rychlost vzduchu od  $0 \text{ m s}^{-1}$  přes její prah fluidace ( $0,11 \text{ m s}^{-1}$ ) až k prahu  $U_{\text{ent}}$  trvalého úletu. Tomuto ději přísluší průběh křivky, označené jako *křivka1*. Při rychlosti  $U_{\text{ent}}=1,25 \text{ m s}^{-1}$  již dochází k trvalému úletu nekontrolovatelného množství částic menších rozměrů, a to po obecně nedefinované dobu. Při zachování konstantního  $U$  hodnota  $E(U)$  postupně klesá, což je znázorněno na grafu šipkou. Pokles se po dostatečně dlouhé době zastaví, a to tehdy, když z vrstvy ulétnou všechny částice menších velikostí. Po skokovém zvýšení  $U$  pokračuje charakteristická křivka v dalším poklesu s novou souřadnicí  $U$ . Charakteristická křivka tak má v oblasti třídy 10 schodovitý charakter, závislý na časovém rozvrhu skokových změn rychlosti  $U$ . Při dosažení rychlosti  $U=2,06 \text{ m s}^{-1}$  bylo zvyšování průtoku ukončeno.

Zpětné snižování rychlosti  $U$  se začalo provádět až po čase, kdy již z vrstvy prakticky neulétal žádný materiál. Charakteristická funkce  $E(U)$  této fáze experimentu je označena jako *křivka2*. Jde o křivku zcela jiné realizace fluidní vrstvy, než byla realizace počáteční. Zmenšil se



Obr. 2. Hysteréze flukuační křivky při nevratném úletu části materiálu z fluidní vrstvy; materiál vrstvy tvoří částice síranu vápenatého. ○ křivka 1 – charakteristická křivka pro vrstvu 580 ml s frakcí 0,1 až 0,65 mm, s prahem fluidace  $0,11 \text{ m s}^{-1}$  a prahem nevratného úletu  $1,25 \text{ m s}^{-1}$ . ● křivka 2 – charakteristika vrstvy po nevratném úletu části materiálu, objem vrstvy 360 ml, frakce 0,5 až 0,65 mm, prah fluidace  $0,27 \text{ m s}^{-1}$ , prah nevratného úletu  $2,06 \text{ m s}^{-1}$

objem vrstvy, změnila se frakčnost. Důležitým momentem je, že hodnota  $U=2,06 \text{ m s}^{-1}$  je pro tuto novou realizaci jejím prahem úletu, t.j. nové  $U_{\text{ent}}=2,06 \text{ m s}^{-1}$ . Po ukončení experimentu byly zjištěny parametry nové vrstvy. Výsledná vrstva obsahovala částice v intervalu od 0,5 mm až do 0,65 mm. Nový klidový objem této realizace byl určen na 360 ml.

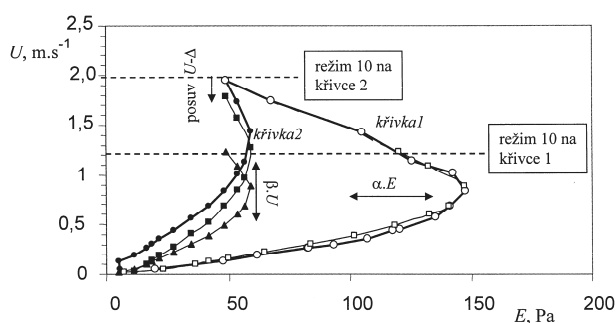
Z hysteréze flukuační křivky, která vzniká při postupném snižování průtokové rychlosti po nevratném úletu drobnějších částic mimo fluidační prostor, lze poměrně spolehlivě odhadnout prahové rychlosti jednotlivých fluidačních tříd nové (zbytkové) fluidní vrstvy, hlavně pak ale určit množství materiálu, který fluidní prostor během provozu opouští. Možný je také odhad změny frakčnosti originální vrstvy a vrstvy po částečném úletu. K tomu je však nutno použít poznatků uváděných v následující kapitole. Obě křivky lze vzájemně převést obecně lineární transformací souřadnic. Postup při transformaci je znázorněn na obr. 3. Sestává z následujících kroků:

Krok 1: Posuv *křivky2* podél souřadnice  $U$  tak, aby došlo k zákrytu prahů fluidace obou charakteristik. Délka posuvu  $\Delta$  je dána vztahem:

$$\Delta = U_{mf}^{(křivka2)} - U_{mf}^{(křivka1)} \quad (12)$$

Přitom horní indexy u veličin  $U$  označují původní vrstvu resp. vrstvu po hysterézi, dolní index *mf* označuje, že jde o prahy fluidace.

Krok 2: Lineární dilatace *křivky2* ve směru osy  $U$ . Koeficient dilatace  $\beta$  určíme tak, aby obě křivky dosahovaly svého maxima  $E(U)$  „zhruba“ pro stejnou hodnotu  $U$ . Transformaci souřadnice  $U$ , složenou z obou dílčích, mů-



Obr. 3. Postup při transformaci *křivky2* na křivku, srovnatelnou s původní *křivkou1*; ○ křivka 1 – charakteristická křivka pro vrstvu 580ml s frakcí 0,1 až 0,65 mm, po posuvu podél osy  $U$  o hodnotu  $\Delta U = -0,11 \text{ m s}^{-1}$ , prah fluidace v tomto zobrazení je  $0 \text{ m s}^{-1}$ . ● křivka 2 – charakteristická křivka vrstvy po nevratném úletu části materiálu, objem vrstvy 360 ml, frakce 0,5 až 0,65 mm. Křivka posunutá podél osy  $U$  o hodnotu  $\Delta U = -0,11 \text{ m s}^{-1}$ , prah fluidace v tomto zobrazení je  $0,16 \text{ m s}^{-1}$ . Postup lineární transformace: ■ posunutá křivka 2 ve směru  $U$  o její prah fluidace  $\Delta=0,16 \text{ m s}^{-1}$ . ▲ dilatace souřadnice  $U$  parametrem  $\beta=0,65$ . □ dilatace souřadnice  $E$  násobením parametrem  $\alpha=2,49$ . Tato křivka velice dobře aproximuje originální křivku 1

žeme zapsat ve tvaru:

$$\bar{U} = \Delta + \beta \cdot (U - \Delta) \quad (13)$$

Krok 3: Lineární dilatace souřadnice  $E$ :

$$\bar{E} = E_0 + \alpha \cdot (E - E_0) \quad (14)$$

kde  $\alpha$  je určeno tak, aby maximum funkce  $E^{(křivka1)}(U)$  a maximum funkce  $E^{(křivka2)}(U)$  po transformaci (14) byly „pokud možno“ shodná. Přitom hodnota  $E_0$  ve vztahu (14) reprezentuje úroveň pozadí veličiny  $E$ .

Hledáme tedy lineární transformaci souřadnic tak, aby výsledná funkce  $\bar{E}(U)$  co nejlépe aproximovala (ve smyslu minima sumy čtverců odchylek) jí odpovídající úsek originální funkce  $E(U)$ . Požadavkem je tak definován optimalizační proces určený pro fitování tří parametrů  $\Delta$ ,  $\beta$  a  $\alpha$ . V našem případě byly optimalizací určeny parametry s hodnotami:  $\Delta=0,16 \text{ m s}^{-1}$ ,  $\beta=0,7$  a  $\alpha=2,49$ .

Interpretací parametrů obdržíme následující vlastnosti nové fluidní vrstvy:

1) Parametr  $\Delta$  určuje, že prah fluidace nové vrstvy po úletu je  $\bar{U}_{mf} = U_{mf} + \Delta = 0,27 \text{ m s}^{-1}$ . Tento prah skutečně velmi dobře odpovídá experimentálně určeným hodnotám po ukončení provedeného experimentu.

2) Použitím vztahů (11) můžeme určit dosazením hodnoty  $\alpha=2,49$  množství hmoty zbylé ve vrstvě po úletu:

$$m^{(křivka2)} = m^{(křivka1)} \cdot \frac{1}{\sqrt{\alpha}} = 580 \cdot \frac{1}{\sqrt{\alpha}} = 367 \text{ ml} \quad (15)$$

což se dobře shoduje s množstvím, skutečně zjištěným jako zbytek po ukončení experimentu (zjištěno 360 ml).

3) Ze skutečnosti, že transformovaná křivka  $\bar{E}(U)$  aproximuje původní charakteristickou křivku *křivka1* (viz obr. 3), je možno konstatovat, že veškeré prahy mezi třídami a režimy mají tyto funkce shodné. Inverzí vztahu (13) a použitím (12) je možno odvodit vztah pro výpočet prahů tříd i režimů výsledné vrstvy v závislosti na hodnotách těchto prahů pro vrstvu původní:

$$U_{prah}^{(křivka2)} = \frac{U_{prah}^{(křivka1)} - U_{mf}^{(křivka1)}}{\beta} + U_{mf}^{(křivka1)} \quad (16)$$

kde dolní index *prah* udává název třídy resp. číslo daného režimu.

### Vliv velikosti částic

Velikost částic fluidní vrstvy je jedním z důležitých parametrů, který určuje chování fluidních vrstev a má rozhodující vliv na jejich fluidační režimy. Proto se také rozhodujícím způsobem podílí na tvaru příslušných fluktuálních charakteristik dané vrstvy. Charakteristiky se v souvislosti s tím velice citlivě mění např. při rozměňování materiálu během delšího provozu dané vrstvy nebo v případě aglomerace částic ve vrstvě.

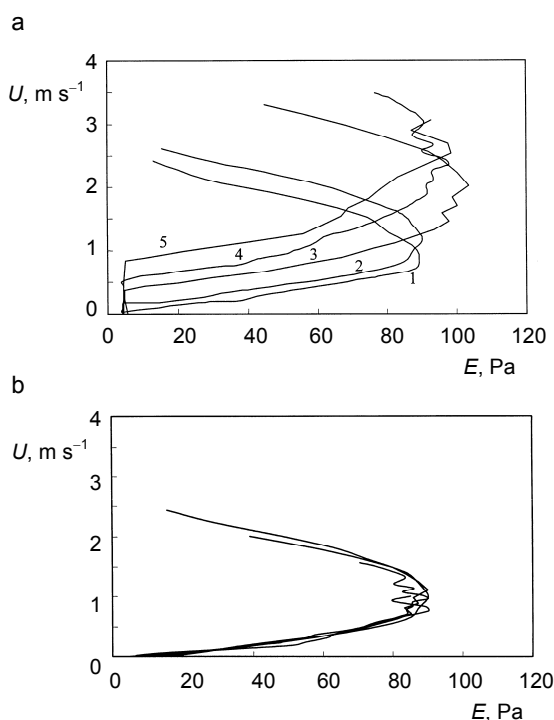
Předpokládáme stejná objemová množství (v klidovém stavu, v ml) částic téhož materiálu. Vrstvy se budou lišit pouze velikostí použitých částic. Ke studiu výše zmíněného vlivu byly provedeny experimenty na dvou materiálech, které se od sebe podstatně liší jak tvarem částic,

Tabulka II

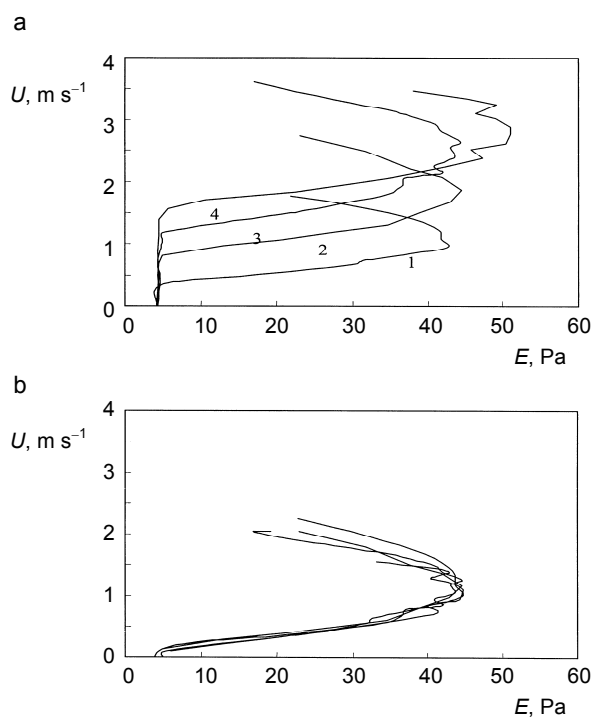
Přehled velikostí částic  $d_p$  při experimentech a závislost jejich vlivu na parametry lineárních transformací fluktuálních charakteristik

<i>Materiál – balotina<sup>a</sup> <math>\rho=1,58 \text{ g ml}^{-1}</math></i>			
$d_p$ [mm]-průměr	$\Delta \cong U_{mf}$	$\alpha$	$\beta$
0,28	0,10	0,99	1,10
0,56	0,18	1,00	1,00
0,77	0,43	1,15	0,70
0,90	0,53	1,09	0,53
1,30	0,84	1,09	0,45
<i>Materiál – čistírenské kaly<sup>b</sup> <math>\rho=0,52 \text{ g ml}^{-1}</math></i>			
$d_p$ [mm]-průměr	$\Delta \cong U_{mf}$	$\alpha$	$\beta$
0,65	0,32	0,956	1,55
1,30	0,69	1,000	1,00
2,40	1,07	0,995	0,80
4,50	1,39	1,145	0,75

<sup>a</sup> Balotina – přísně kulové skleněné částice s velkou sypnou hustotou  $\rho$ ; <sup>b</sup> čistírenské kaly – tvarově velice různorodé částice malé sypné hustoty



Obr. 4. Vliv velikosti částic na průběh fluktuálních charakteristik fluidní vrstvy s balotinou. **a)** průběhy fluktuálních charakteristik pro různé frakce; 1: frakce 0,25–0,315 mm; 2: frakce 0,5–0,63 mm; 3: frakce 0,65–0,9 mm; 4: frakce 0,8–1 mm; 5: frakce 1,2–1,4 mm. **b)** průběhy charakteristik po lineárních transformacích; všechny křivky lineárně deformovány na průběh křivky 2. Průběh této křivky v obou grafech označen silnější čarou



Obr. 5. Vliv velikosti částic na průběh fluktuálních charakteristik fluidní vrstvy s čistírenskými kalů. **a)** průběhy fluktuálních charakteristik pro různé frakce; 1: frakce 0,5–0,8 mm; 2: frakce 1–1,6 mm; 3: frakce 2–2,8 mm; 4: frakce 4–5 mm; **b)** průběhy charakteristik po lineárních transformacích; všechny křivky lineárně deformovány na průběh křivky 2. Průběh této křivky v obou grafech označen silnější čarou

tak i některými fyzikálními parametry. Tím by měla být dostatečně zaručena možnost posouzení obecnější platnosti získaných poznatků. Použity byly částice balotiny (přísně kulovité částice s velkou specifickou hmotností) a částice sušených čistírenských kalů (poměrně lehké částice velice rozmanitých tvarů). Pro oba materiály bylo zkoumáno několik velikostních frakcí. Na základě experimentálních dat byly zobrazeny pro jednotlivé případy příslušné fluktuální charakteristiky a tyto srovnány mezi sebou. Závěrem byly formulovány dále prezentované poznatky pro deformace charakteristik v závislosti na změnách velikosti částic. Přehled použitých materiálů je uveden společně s dalšími údaji v tabulce II.

Podrobné prozkoumání obdržených charakteristických křivek umožňuje shrnout jejich vlastnosti do následujících tezí.

Charakteristické funkce  $E(U)$  pro fluktuální charakteristiky vrstev stejného materiálu při odlišné velikosti částic jsou na sebe vzájemně dobře transformovatelné pomocí v úvodu popsaných lineárních transformací souřadnic  $U$  a  $E$ , daných parametry  $\alpha$ ,  $\Delta$  a  $\beta$ . Výsledky transformací jsou názorně na obr. 4 a 5. Z těchto obrázků a hodnot parametrů uvedených v tab. II plynou následující poznatky:

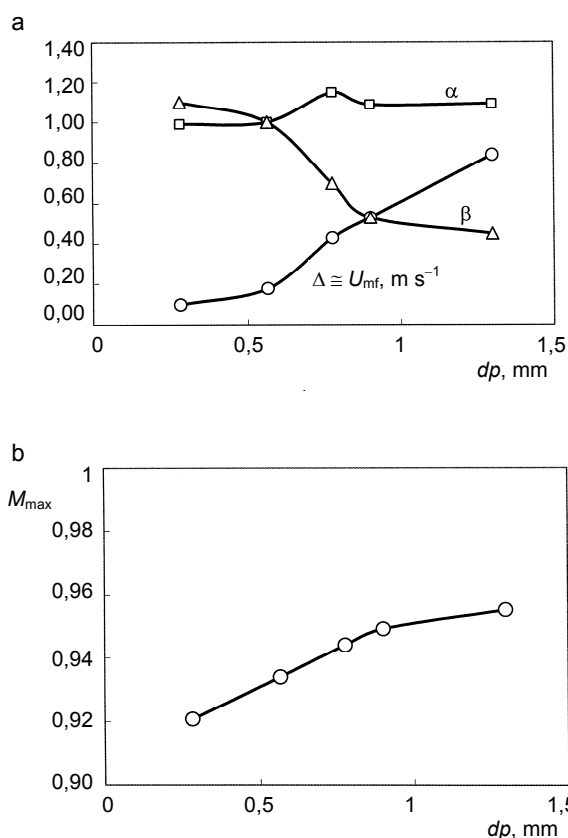
Parametr  $\Delta$  je silně závislý na průměrné velikosti  $d_p$  částic ve vrstvě a reprezentuje změnu prahů fluidace  $U_{mf}$  dané vrstvy pro různé velikosti částic.

Parametr  $\beta$  reprezentující dilataci souřadné osy  $U$  je také na  $d_p$  závislý poměrně výrazně.

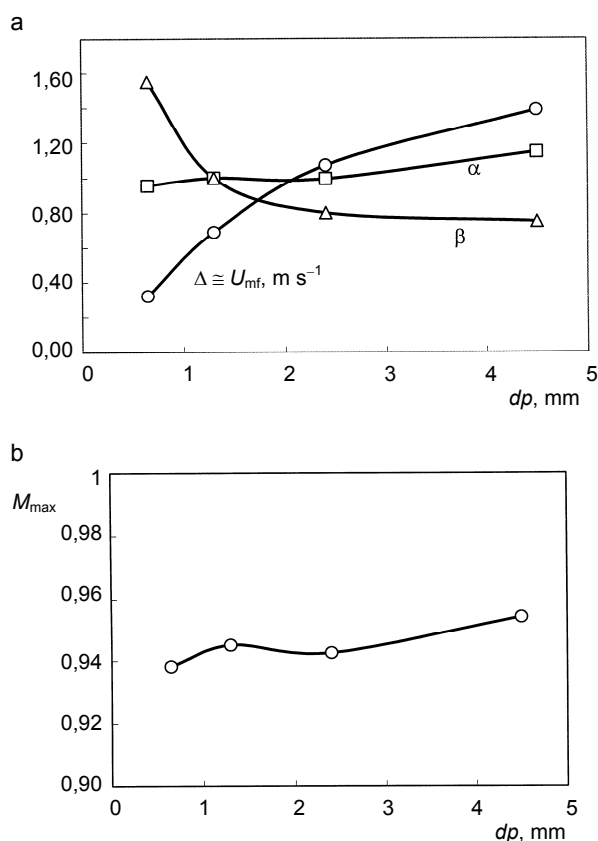
Parametr  $\alpha$ , reprezentující dilataci souřadné osy  $E$  se mění s průměrnou velikostí částic  $d_p$  relativně málo (v obou případech mezi hodnotami 0,95 až 1,14). To lze jinými slovy vyjádřit jako skutečnost, že maximum funkce  $E(U)$  pro daný materiál závisí na  $d_p$  poměrně slabě.

Závislosti diskutovaných parametrů na  $d_p$  pro oba prozkoumané materiály jsou znázorněny na obr. 6 a 7. Pro úplnost je znázorněna také závislost maximální hodnoty  $M_{max}$  charakteristické funkce  $M(E)$ . Z grafu je patrné, že i toto maximum se s  $d_p$  mění poměrně málo, a to tak, že s rostoucím průměrem částic roste. Jinak řečeno schopnost vrstvy pístovat roste s velikostí částic.

Poznamenejme na závěr, že z lineární podobnosti charakteristických funkcí  $E(U)$  pro různé průměry částic zůstávají na charakteristických křivkách zachovány poměry prahů jednotlivých tříd fluktuálních režimů  $U_{mf}$ ,  $U_{turb}$ ,  $U_{dil}$  a  $U_{emax}$  a samozřejmě i prahů samotných fluidních režimů.



Obr. 6. Závislosti parametrů  $\Delta$ ,  $\alpha$  a  $\beta$  lineárních transformací flukтуаčních charakteristik na velikosti částic ve vrstvě s balotinou. a) Parametry  $\Delta$ ,  $\alpha$  a  $\beta$ ; b) Závislost maxima veličiny  $M(U)$



Obr. 7. Závislosti parametrů  $\Delta$ ,  $\alpha$  a  $\beta$  lineárních transformací flukтуаčních charakteristik na velikosti částic ve vrstvě s čistirenskými kaly; a) parametry  $\Delta$ ,  $\alpha$  a  $\beta$ ; b) závislost maxima veličiny  $M(U)$

## Závěry

V našich předchozích pracích<sup>8,10</sup> byla zavedena metoda pro zjišťování okamžitého stavu fluidace na základě zpracování tlakových fluktuací vrstvou proudícího plynu a popsán způsob identifikace konkrétních fluidních režimů. V právě předkládaném textu pak jsou popsány způsoby, jak ze změn flukтуаčních charakteristik odhadovat některé základní změny, ke kterým může během provozu fluidačního procesu často docházet. V obou právě zmíněných publikacích jsou tak obsaženy důležité poznatky, které umožňují vypracovat řadu algoritků a programů pro výpočetní techniku sloužící k automatizované identifikaci stavu fluidních vrstev, varování v případě přiblížení provozu k havarijním stavům a k odhadu některých změn fluidace za provozu fluidní vrstvy. Takové prostředky mohou být přínosem a zkvalitněním prací spojených s řízením a obsluhou fluidních reaktorů. Prezentované poznatky již byly aplikovány při řízení poloprovozního fluidního reaktoru o rozměrech  $0,3 \times 0,3 \times 5$  (m), přičemž nebyly zjištěny žádné podstatné odchylky od chování v článku popisovaném experimentálním zařízením.

*Předkládaný text vznikl na základě experimentálních prací v rámci grantového projektu IAA400720701 Grantové agentury Akademie věd ČR.*

## Seznam symbolů

$a_i$	amplituda $i$ -té spektrální čáry
$c_i$	komplexní hodnota $i$ -té spektrální čáry (příslušné frekvenci $f_i$ ), Pa
$d$	průměr vrstvy, cm
$d_p$	průměrná velikost částic ve vrstvě, mm
$E_0$	hodnota $E$ pro šum pozadí
$E(U)$	charakteristická veličina tlakových fluktuací při rychlosti $U$ , definovaná vztahem (5), Pa
<b>F</b>	trojrozměrný prostor $E \times M \times U$
FFT	rychlá Fourierova transformace
$f_i$	frekvence spektrální čáry, Hz
$f_M$	medián setříděného spektra, Hz
$f_{max}$	maximální frekvence diskrétního Fourierova spektra, Hz
$f_{min}$	minimální frekvence diskrétního Fourierova



	spektra, Hz
$h$	výška vrstvy, cm
$m$	množství částic ve vrstvě (klidový objem vrstvy), ml
$M(U)$	charakteristická veličina tlakových fluktuací při rychlosti $U$ , definovaná vztahem (4), bezrozměrná
$P$	tlak plynu ve vrstvě, Pa
$\mathbf{p}$	vektor $[E(U), M(U), U]$ , fluktuační stavový vektor
$\Delta P$	tlaková ztráta, Pa
$U$	rychlost plynu ve volném průřezu kolony, $\text{m s}^{-1}$
$U_{\text{dil}}$	práh třídy řídkých režimů fluidní vrsrvy, $\text{m s}^{-1}$
$U_{\text{out}}$	práh trvalého úletu fluidní vrsrvy (režimu 10), $\text{m s}^{-1}$
$U_{\text{max}}$	maximum provozované průtokové rychlosti, $\text{m s}^{-1}$
$U_{\text{mf}}$	práh fluidace fluidní vrsrvy, $\text{m s}^{-1}$
$U_{\text{turb}}$	práh třídy turbulentních režimů fluidní vrsrvy, $\text{m s}^{-1}$
$W$	výkon spektra, $\text{Pa}^2$

## Ř e c k é s y m b o l y

$\beta$	dilatace souřadnic osy $U$
$\alpha$	dilatace souřadnic osy $E$
$\Delta$	posuv počátku os charakteristické křivky ve směru osy $U$
$\rho$	sypná hustota, $\text{kg m}^{-3}$

## LITERATURA

1. Yates J. G.: *Fundamentals of Fluidized-Bed Chemical Processes*. Butterworths, London 1983.

2. Yates J. G., Simons S. J. R.: *Int. J. Multiphase Flow* 20, Suppl., 297 (1994).
3. Hartman M., Svoboda K., Veselý V., Ziolkowski D.: *Chem. Listy* 81, 1233 (1987).
4. Hartman M., Beran Z., Svoboda K., Veselý V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60, 1 (1995).
5. Svoboda K., Čermák J., Hartman M., Drahoš J., Selucký K.: *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 22, 514 (1983).
6. Svoboda K., Čermák J., Hartman M., Drahoš J., Selucký K.: *AIChE J.* 30, 513 (1984).
7. Zhao G.-B., Zang Z.-R.: *AIChE J.* 49, 869 (2003).
8. Trnka O., Veselý V., Hartman M., Beran Z.: *AIChE J.* 46, 509 (2000).
9. Press W. H., Flannery B. P., Teukolsky S. A., Vetterling W. T.: *Numerical Recipes in Pascal*. Cambridge Univ. Press, Cambridge 1992.
10. Trnka O., Hartman M., Veselý V.: *Chem. Listy* 99, 330 (2005).

**O. Trnka and M. Hartman** (*Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Influence of Changes in Physical Parameters of Fluidized Beds on Its Characteristics of Pressure Fluctuations**

Fluctuation characteristics are effective tools for determination of the type and state of fluidization during the operation of a fluid layer. They are based on monitoring and processing of fluctuation spectra of a gas in which a solid is fluidized. A method of evaluation of changes in operation parameters of the layers during a long operation of a fluid device, based on assessment of changes in corresponding fluctuation characteristics is proposed.

## DESORPČNÍ ELEKTROSPREJ: MODERNÍ METODA ANALÝZY ORGANICKÝCH POVRCHŮ

VÁCLAV RANC<sup>a</sup>, VLADIMÍR HAVLÍČEK<sup>b</sup>,  
PETR BEDNÁŘ<sup>a</sup> a KAREL LEMR<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, PŘF UP Olomouc, Tř. Svobody 8, 779 00 Olomouc, <sup>b</sup> Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4  
lemr@prfnw.upol.cz

Došlo 12.4.07, přijato 30.4.07.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, DESI, chirální analýza, analýza léčiv

### Obsah

1. Úvod
2. Ionizace desorpcí elektrosprejem (DESI)
3. Aplikace DESI v analýze chirálních látek
4. Závěr

### 1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie dnes patří mezi klíčové analytické techniky, a to jak ve výzkumu<sup>1</sup>, tak i v oblasti rutinní analýzy. Během posledních dvaceti let se použití metody rozšířilo snad do všech oblastí přírodních věd, od geologie, přes fyziku, astronomii a chemii k biologii, k analýze životního prostředí, do farmacie, medicíny, atp. Metoda je nezastupitelná v lékařství (diagnostika nádorových onemocnění, metabolických chorob atd.), pro kriminalisty (identifikace drog, detekce výbušnin, identifikace pachatelů zvláště nebezpečné trestné činnosti), je výhradním nástrojem antidopingových kontrol, používá se v archeologii (datování stáří předmětů) a geologii, v monitorování kvality životního prostředí, v toxikologii i v chemii (sledování průběhu chemických reakcí). Hmotnostní spektrometry jsou součástí výbavy většiny vesmírných sond i některé speciální vojenské techniky. Významnou úlohu hraje hmotnostní spektrometrie v otázkách národní bezpečnosti: technika dokáže odhalit a identifikovat látky, které mohou být zneužity při terorismu a bioterorismu.

Vývoj analytických metod na bázi hmotnostní spektrometrie se v posledních letech ubírá stále častěji k postupům umožňujícím rychlou a především ekonomicky nenáročnou analýzu, a to i stále větších molekul<sup>2</sup>. S neustálým technologickým pokrokem již dnes není problém vyvinout hmotnostně-spektrometrickou analytickou metodu pro analýzu biopolymerů, která bude disponovat

detekčním limitem řádově v desetinách ppm (cit.<sup>3</sup>). Takto nízkých detekčních limitů lze však v mnoha případech dosáhnout jen u standardu, kde není analýza zatížena předúpravou vzorků. Značně komplikovanější je situace při analýze reálných biologických vzorků, kdy jejich zpracování zůstává stále jedním z klíčových kroků. Existuje celá řada způsobů hmotnostně-spektrometrické analýzy biologických vzorků. V zásadě nejsnazší cestou je použití desorpčních ionizačních technik, které umožňují i analýzu povrchu vzorku, anebo ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“, ESI). Vývoj technik povrchové analýzy makromolekul založených na hmotnostní spektrometrii je v popředí zájmu předních výzkumných týmů v oblasti hmotnostní spektrometrie již od 70. let minulého století, kdy byla poprvé světu představena ionizační technika založená na desorpci plazmatem <sup>252</sup>Cf (cit.<sup>4</sup>). Ta umožnila hmotnostní spektrometrii realizovat analýzu menších proteinů, a to až do hmotnosti v řádu desítek tisíc Daltonů a s limitem detekce v řádu pg l<sup>-1</sup>. V roce 1981 byl učiněn další krok na cestě k analýze biopolymerů, neboť byla vyvinuta technika FAB (cit.<sup>5</sup>) („fast atom bombardment“, ionizace bombardováním rychlými atomy), která se stala široce rozšířenou standardní metodou pro ionizaci peptidů. O necelých deset let později byla světu představena ionizace desorpcí laserem (LDI) (cit.<sup>6,7</sup>). Dalším zásadním krokem byl vývoj v oblasti MALDI (cit.<sup>8</sup>) (ionizace/desorpce laserem za účasti matrice) nebo SELDI (cit.<sup>9</sup>) (povrchem podpořená ionizace/desorpce laserem). Za objev technik umožňujících ionizaci biomolekul byla v roce 2002 udělena Nobelova cena za chemii. Dosud jmenované techniky však i přes nemalý přínos neobdourávají a často ani nezjednodušují samotnou přípravu vzorků k analýze. Z tohoto pohledu se jako velmi zajímavá jeví moderní ionizační technika DESI (cit.<sup>10,11</sup>) (ionizace desorpcí elektrosprejem).

### 2. Ionizace desorpcí elektrosprejem (DESI)

Princip DESI vychází z konceptu elektrospreje. Sprejovaná kapalina (často se jedná o směs vody s methanolem v poměru 1:1) je aplikována na studovaný povrch vzorku pod určitým úhlem (obvykle 50°) a z určité vzdálenosti (zpravidla 5 mm). Geometrické parametry a vlastní parametry elektrospreje ovlivňují průběh desorpce a výtěžnost tvorby iontů. Interakcí iontů vzniklých sprejováním s povrchem vzorku dochází k desorpci iontů analytů, které jsou následně vedeny do hmotnostně-spektrometrického analyzátoru. Koncept desorpce elektrosprejem sebou přináší celou řadu výhod, na základě kterých se zcela mění pohled na hmotnostní spektrometrii jako na techniku analýzy vzorků se složitými maticemi<sup>12</sup>, neboť tato nová ionizační technika zjednodušuje vlastní úpravu vzorků, někdy ji i zcela odbourává. Skutečností však také je, že dosahované meze detekce jsou výrazně vyšší v porovnání s elektrosprejem. Velký aplikační potenciál DESI lze demonstrovat na celé řadě vyvinutých analy-

tických postupů, které DESI využívají. DESI se řadí mezi neinvazivní techniky umožňující *in vivo* analýzu bez nutnosti použití anestetik. Tato vlastnost byla demonstrována například při výzkumu metabolismu orálně podaných léčiv následně detegovaných na povrchu lidské kůže<sup>13</sup>. Jednalo se o analýzu ketaminu a xylazinu. Schopnost DESI analyzovat makromolekuly vyplývá z vlastnosti ESI generovat vícenásobně nabitě ionty. DESI již byla úspěšně aplikována při analýze cytochromu c (cit.<sup>14</sup>) nebo hemoglobinu<sup>15</sup> ve vzorku lidské krve. V současné době je též velice důležitá detekce a identifikace výbušnin<sup>16</sup>. Aplikovatelnost DESI v této oblasti lze demonstrovat např. na analýze trinitrohexahydro-1,3,5-triazinu (RDX) a oktahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocinu (HMX) (cit.<sup>17</sup>). Hmotnostní spektrum je znázorněno na obr. 1. Dosažený detekční limit metody byl řádově v pg mm<sup>-2</sup>. Uplatnění ionizace desorpcí elektrosprejem např. i ve zmíněné oblasti značně rozšiřuje možnosti využití hmotnostní spektrometrie i mimo chemické laboratoře. Výzkumná skupina R. G. Cookse intenzivně pracuje na vývoji přenosného detektoru výbušnin<sup>18</sup> založeného na DESI-MS, který by bylo možné využít např. v odbavovacích halách letišť či v budovách se zvýšeným bezpečnostním rizikem. Ionizace desorpcí elektrosprejem též zásadním způsobem rozšiřuje možnosti kombinace hmotnostní spektrometrie a jí získaných dat s jinými technikami. Již byly popsány např. metody využívající měření DESI-MS a jadernou magnetickou rezonancí (NMR) (cit.<sup>19</sup>) jako metabolomický/metabonomický nástroj umožňující diagnostiku karcinomů. Autoři publikace popisují identifikaci více než 80 metabolitů ve vzorku krysí moče, která byla analyzována pomocí DESI, a to bez jakékoli úpravy. Vlastní identifikace metabolitů byla založena na porovnání fragmentačních hmotnostních spekter a dat získaných NMR.

### 3. Aplikace DESI v analýze chirálních látek

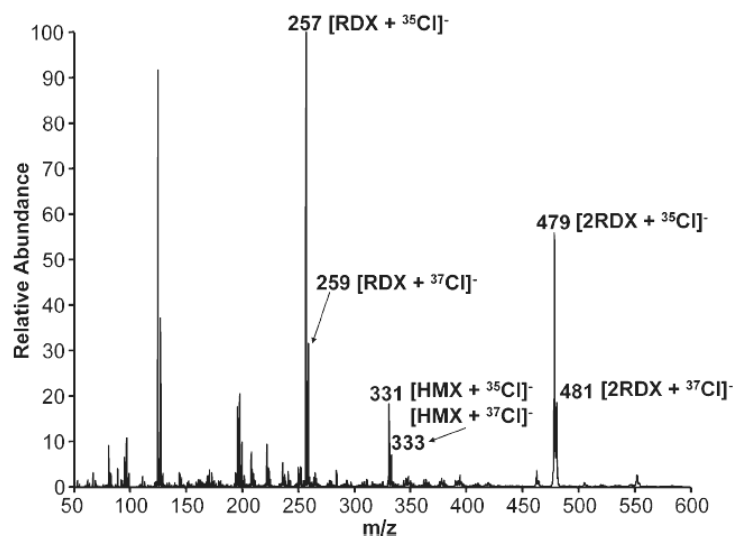
Dalším velkým aplikačním potenciálem hmotnostní spektrometrie je screening chirálních látek. Jednou z perspektivních metod umožňujících hmotnostní spektrometrii tento typ analýzy je Cooksova kinetická metoda<sup>20–23</sup>. Principem metody je tvorba trimerních klastrů analyzované látky (A) s opticky čistou referenční látkou (ref) a kovem (M), nejčastěji mědi. Obecný vzorec vzniklého klastru je  $[M(\text{ref})_2(\text{A})-\text{H}]^+$ . Fragmentace generovaného klastru vede k odštěpení jednoho z ligandů, tedy referenční látky nebo analytu.

Chirální diskriminace se projevuje v hodnotě R dané poměrem intenzit produktů fragmentace  $[M(\text{ref})(\text{A})-\text{H}]^+$  a  $[M(\text{ref})_2-\text{H}]^+$  (rovnice (1)). Chirální selektivita použitého systému je vyjádřena pomocí veličiny  $R_{\text{chiral}}$ , kterou popisuje rovnice (2).

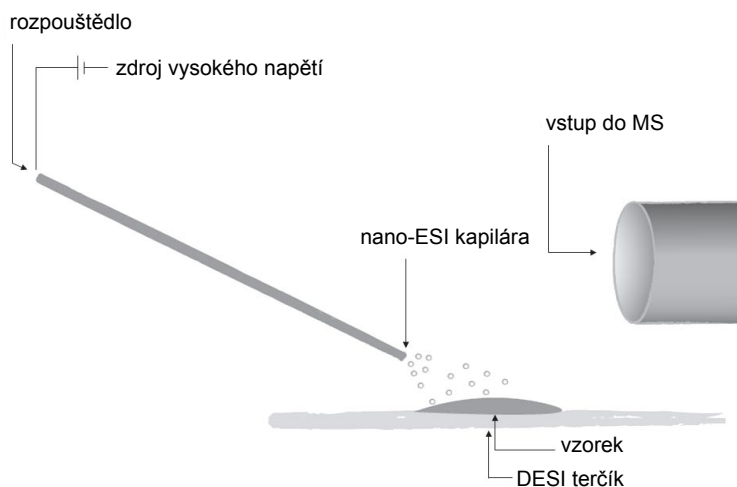
$$R = \frac{[M(\text{ref})\text{A}-\text{H}]^+}{[M(\text{ref})_2-\text{H}]^+} \quad (1)$$

$$R_{\text{chiral}} = \frac{R_R}{R_S} \quad (2)$$

kde  $R_R$  a  $R_S$  jsou hodnoty R pro čistý R a S enantiomer. Z uvedených vztahů vyplývá, že pro hodnotu  $R_{\text{chiral}} = 1$  nevykazuje použitý systém žádnou chirální selektivitu. Čím více se liší od jedné, tím je chirální diskriminace výraznější. Cooksova kinetická metoda již byla modifikována tak, aby umožňovala vysoce prostupnou průtokovou injekční analýzu<sup>23,24</sup> a aby byla využitelná pro spojení hmotnostního spektrometru se separačními technikami jako např. s HPLC (cit.<sup>24</sup>) nebo CE (cit.<sup>25</sup>). Ionizace



Obr. 1. Hmotnostní spektrum získané DESI analýzou výbušnin typu RDX a HMX (převzato z cit.<sup>17</sup>; Reprinted with permission from ref. 17. Copyright (2005) American Chemical Society)



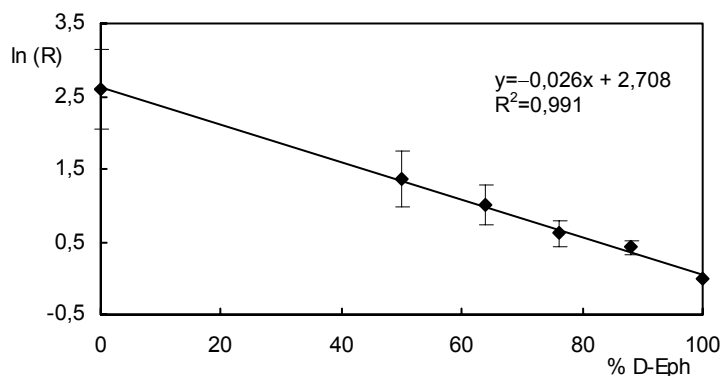
Obr. 2. Schéma konstrukční varianty DESI, tzv. nano-DESI vyvinuté na našem pracovišti

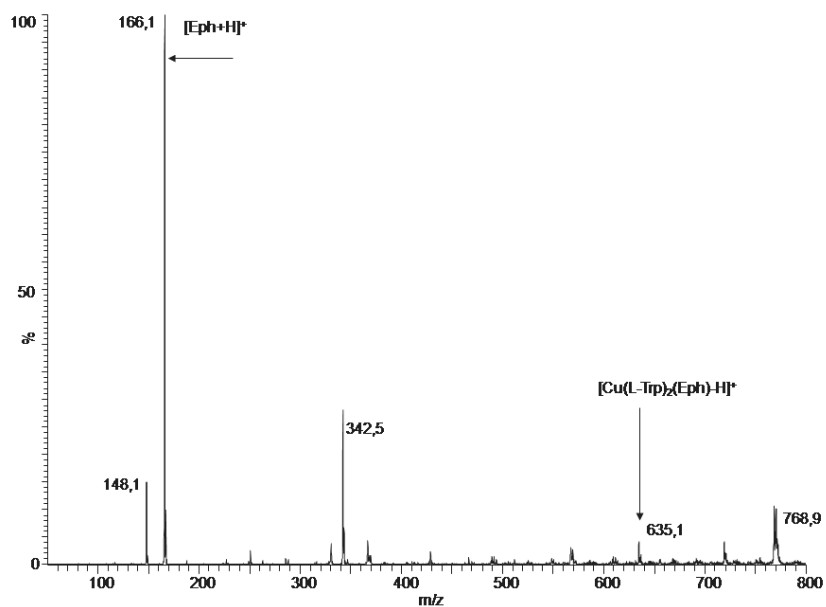
desorpci elektrosprejem však ještě dále rozšiřuje aplikační potenciál této metody. Experimenty na našem pracovišti dokládají možnost nově aplikovat DESI i v analýze chirálních látek bez jejich předchozí izolace z matrice. Výsledky analýzy umožňují velice rychle rozhodnout, zda je ve vzorku obsažen *R* nebo *S* enantiomer, případně racemát. Tato schopnost může být potenciálně využita nejen v aplikacích zaměřených na výstupní kontrolu kvality léčiv, ale i při kontrole průběhu asymetrických syntéz a podobně.

Koncept námi sestaveného DESI však nevychází z elektrospreje, tak jak jej popisuje Z. Takáts a spol.<sup>10</sup>, ale z nano-ESI (obr. 2). Tato modifikace umožňuje pracovat při nižších průtocích sprejované kapaliny (řádově desítky  $\text{nl min}^{-1}$ ), čímž se omezuje rozmývání analytu. Jako držák

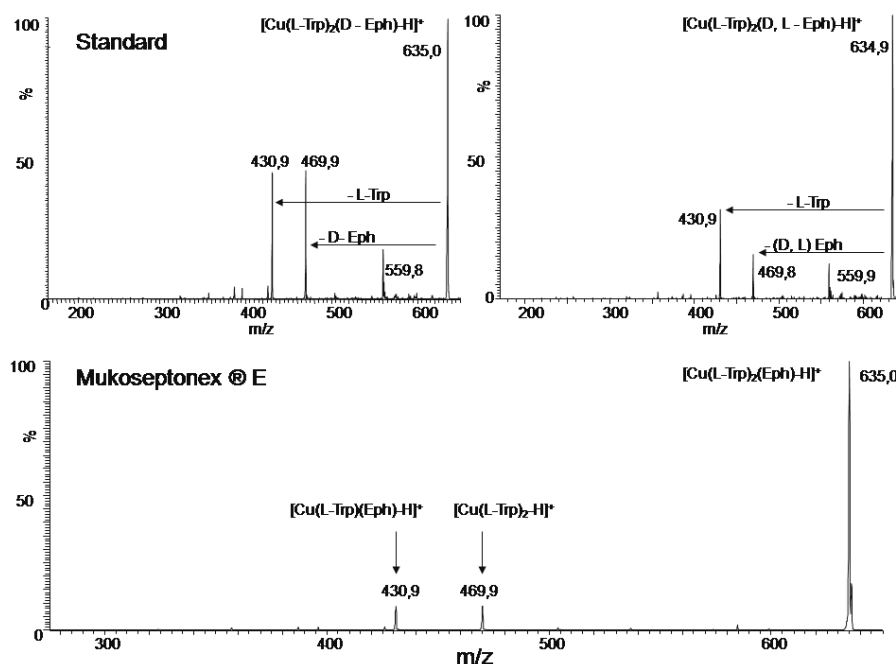
vzorků slouží polyetylenový výlisek se vzorkovacím terčíkem o velikosti  $5 \times 2 \text{ mm}$ . V současnosti jsou na našem pracovišti vyvíjeny metody založené na DESI, které umožňují screening chirálních léčiv v různých maticích (farmaceutické přípravky, krev).

Jako příklad je dále podrobněji popsán postup a výsledky chirální analýzy efedrinu v komerčním preparátu Mukoseptonex® E. Chirálním selektorem byla směs *L*-tryptofanu a  $\text{CuCl}_2$ . Selektor byl aplikován pomocí sprejovací kapaliny o složení  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  *L*-tryptofan a  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$   $\text{CuCl}_2$  ve směsi voda–methanol (1:1, v/v). Pro kalibraci byly použity roztoky *D*-efedrinu a racemické směsi ( $5 \text{ mmol l}^{-1}$ , voda–methanol, 1:1, v/v). Bylo použito celkem 5 roztoků o zastoupení *D*-efedrinu 50, 64, 76, 88 a 100 %. Na vzorkovací terčik DESI bylo aplikováno 10  $\mu\text{l}$

Obr. 3. Kalibrační závislost  $\ln(R)$  na enantiomerním podílu *D*-efedrinu (*D*-Eph)



Obr. 4. Hmotnostní spektrum Mukoseptonexu® E; Eph – efedrin, Trp – tryptofan



Obr. 5. Fragmentační spektrum trimerního klastru pro standardy efedrinu (nahore) a pro efedrin v Mukoseptonexu® E (dole); Eph – efedrin, Trp – tryptofan

vzorku, vzniklá kapka byla sušena 2 minuty na vzduchu a ihned analyzována. Kalibrační závislost je znázorněna na obr. 3. Korelační koeficient 0,991 je pro screeningové nasazení vyvinuté metody zcela dostačující. Veličina  $R_{\text{chiral}}$

byla určena z kalibrační závislosti a její hodnota je  $2,7 \pm 0,12$ , což dokládá potřebnou chirální selektivitu. Získaná kalibrace byla následně použita pro chirální analýzu efedrinu v komerčním přípravku Mukoseptonex® E

s deklarovanou koncentrací efedrinu 10 mg ml<sup>-1</sup>. Vzorek nebyl nijak upravován a 10 µl bylo přímo naneseno na filtrační papír umístěný na vzorkovacím terčíku. Po dvou minutách byla provedena analýza. Zjištěný obsah D-efedrinu ve sledovaném vzorku byl 102±7,7 %, což je pro odlišení od racemátu zcela postačující.

Hmotnostní spektrum získané při DESI analýze vzorku Mukoseptonexu® E je na obr. 4 a dokládá tvorbu trimerního klastru přímo z reálného vzorku v iontovém zdroji. Rozdíly v intenzitách fragmentů vzniklých při kolizi indukované disociací trimerního klastru v iontové pasti jsou patrné z obr. 5. Z porovnání spekter je rovněž zřejmé, že ve vzorku je obsažen D-enantiomer.

Úspěšná tvorba trimerního klastru v prostředí DESI je důležitá nejen pro vlastní analýzu, ale je zajímavá i z hlediska pochopení základních dějů uplatňujících se v průběhu analýzy. Cílové trimerní klastry jsou generovány na základě interakce iontů chirálního selektoru s analytem a tato technika potvrzuje vznik trimerního klastru až v prostoru iontového zdroje a nikoliv v roztoku směsi analytu s chirálním selektorem přiváděným do iontového zdroje, což lze považovat za významné pro studium chirální diskriminace kinetickou metodou.

#### 4. Závěr

Ionizace desorpceí elektrosprejem v dnešní době patří k ionizačním technikám s vysokým aplikačním potenciálem, což dokazuje počet aplikací, které již byly za relativně krátký čas existence této techniky publikovány. DESI nachází uplatnění nejen v analýze složitých matric, ale též i jako možná další alternativa k používaným zobrazovacím hmotnostně-spektrometrickým technikám. Prezentované výsledky dosažené s jednoduchým DESI systémem založeným na nanoelektrospreji a sestaveným na našem pracovišti ukázaly aplikovatelnost DESI v chirální analýze.

*Autoři práce děkují za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM6198959216 a LC 7017) a Grantové agentuře České republiky (203/07/0765).*

#### LITERATURA

- Hoffman E., Stroobant V.: *Mass Spectrometry Principles and Applications*, pp. 1–2. Wiley and Sons, New York 2001.
- Baier D.: *Think knowledge: A philosophy of Scientific Instruments*. University of California press, Berkeley 2004.
- Aggarwal S. K., Kinter M., Fitzgerald R. L., Herold D. A.: *Crit. Rev. Lab. Sci.* 31, 35 (1994).
- Anderl R. A., Cole J. D., Greenwood R. C.: *Nucl. Instrum. & Methods Phys. Res., Sect. B* 26, 333 (1987).
- Barber M., Bordoli R. S., Sedgwick R. D., Tyler A. N.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 325 (1981).
- Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F.: *Anal. Chem.* 57, 2935 (1985).
- Karas M., Hillenkamp F.: *Anal. Chem.* 60, 2299 (1988).
- Tanaka H., Xuan L. J., Morimoto S., Shoyama Y., Isobe R., Nojima K.: *Spectrosc. Int. J.* 15, 1 (2001).
- Czader M., Kuzdzal S., Flinn I., Byrd, J., Chan D., Borowitz M. J.: *Blood* 96, 579A (2000).
- Takáts Z., Wiseman J. M., Gologan B., Cooks R. G.: *Science* 306, 471 (2004).
- Cooks R. G., Gologan B., Wiseman J., Talaty, N., Chen H., Cotte – Rodriguez I.: *Abstr. Paper. Am. Chem. Soc.* 230, U298 (2005).
- Qu J., Liang Q., Luo G., Wang Y.: *Anal. Chem.* 76, 2239 (2004).
- Takáts Z., Czuczy N., Skoumal R., Katona M., v *Proceedings of the 17th International Mass Spectrometry Conference*, poster Nr.: TuOr-24, Prague 2006.
- Myung S., Wiseman J., Valentine S. J., Takáts Z., Cooks R. G.: *J. Phys. Chem.* 7, 110 (2006).
- Wiseman J., Puolittavial S., Takáts Z., Cooks G., Caprioli R.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 4 (2005).
- Cotte-Rodriguez I., Cooks R. G.: *Chem. Comm. (Cambridge, England)*, 2968 (2006).
- Cotte-Rodriguez I., Takáts Z., Talaty N., Chen H., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* 77, 6755 (2005).
- Mulligan C. C., Talaty N., Cooks R. G.: *Chem. Commun. (Cambridge, England)*, 1709 (2006).
- Chen H., Pan Z., Talaty N., Raftery D., Cooks R. G.: *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 20, 1577 (2006).
- Tao W. A., Gozzo F. C., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* 73, 1692 (2001).
- Augusti D. V., Carazza F., Augusti R., Tao W. A., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* 74, 3458 (2002).
- Tao W. A., Clark R. L., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* 74, 3783 (2002).
- Ranc V., Fryčák P., Müller L., Bednář P., Lemr K.: *Chem. Listy* 100, 8 (2006).
- Lemr K., Ranc V., Fryčák P., Bednář P., Ševčík J.: *J. Mass Spectrom.* 41, 499 (2006).
- Ranc V., Bednář P., Fryčák P., Lemr K.: v *Proceedings of the 17th International Mass Spectrometry Conference*, Poster Nr.:ThP – 019, Prague, Czech Republic 2006.

**V. Ranc<sup>a</sup>, V. Havlicek<sup>b</sup>, P. Bednar<sup>a</sup>, and K. Lemr<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Palacky University Olomouc; <sup>b</sup> Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Desorption Electrospray: A Modern Tool for Organic Surface Analysis**

Applicability of mass spectrometry is related to the progress in instrumentation including ion sources. Ionization techniques in MS often need sample preparation, which increases the analysis time. From this point of view, DESI (desorption electrospray ionization) seems to be an interesting alternative. Electrospraying of a sample with

a liquid leads to the production of analyte ions desorbed from the surface-deposited sample. A new modification of DESI, where electrospraying is provided by nano-ESI, and a new application in chiral analysis have been developed. Chiral analysis employs the Cooks kinetic method. Chiral selector is sprayed by nano-ESI onto the surface with a deposited chiral analyte. Trimeric clusters are formed in the bulk of the ion source. Their fragmentation allows

chiral discrimination of enantiomers. The power of the DESI-based mass spectrometric tool is demonstrated on chiral analysis of ephedrine in commercial pharmaceutical Mucoseptonex<sup>®</sup> E. The analysis is performed without any sample preparation. That is why the analysis is simple and cost-effective. Calibration for ephedrine was performed with D-enantiomer and the racemate (correlation coefficient  $R^2 = 0.996$ ) was obtained.



# Invited Lecture Series

Topic: Steroids

## **ent-Steroids: Chemistry and Biology**

*ent*-Steroids are the non-naturally occurring enantiomers (mirror images) of natural steroids. Early studies of *ent*-steroids focused largely on their hormonal actions, and it was found that *ent*-steroids lacked hormonal activity. Because an *ent*-steroid has the mirror image shape of its corresponding natural steroid, it is expected to have different receptor-mediated actions. By contrast, because the *ent*-steroid is an enantiomer of the natural steroid, it has the same physical properties as the natural steroid.

## Speaker: Professor Douglas F. Covey

Department of Molecular Biology and Pharmacology,  
Washington U. School of Medicine, St. Louis, MO, USA

ÚOCHB AV ČR, v. v. i.

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR  
Flemingovo nám. 2, Praha 6

Lecture Hall 10:00 am





Ústav počítačové a řídicí techniky VŠCHT Praha  
Laboratoř řízení bioprocесů

**nabízí volná místa**

mladého výzkumného pracovníka  
a doktoranda (či doktorandů)

pro výzkum v oblasti multiagentních řídicích systémů a jejich aplikací  
v řízení biotechnologických procesů.

Úspěšní kandidáti se zúčastní řešení integrovaného projektu 6. rámcového programu  
EU BIOPRODUCTION (Sustainable Microbial and Biocatalytic Production of Advanced Functional  
Materials).

Půjde o teoretický i praktický výzkum a vývoj architektury multiagentních řídicích systémů  
i jednotlivých agentů se zaměřením na specifika řízení bioprocесů.

Projekt je realizován v úzké součinnosti s Newcastle University, Technical University of Denmark,  
The Centre of Process Innovation UK, Centre for Research and Technology Hellas, a dalšími  
20 spolupracujícími universitami, výzkumnými ústavami a podniky v Evropě.

Laboratoř řízení bioprocесů je vedoucí výzkumnou skupinou v oboru se zkušenostmi z mezinárodních  
projektů a představuje tak stimulační výzkumné prostředí. V projektu půjde o teoretickou i experimen-  
tální práci v úzké spolupráci s ostatními partnery v projektu.

Hledáme vysoce motivované mladé výzkumné pracovníky a doktorandy. Finanční podmínky jsou  
na úrovni obdobných projektů EU, tj. plně konkurenční. Místa jsou dostupná na 3–4 roky.  
Výzkumný pracovník může nastoupit ihned, doktorandi od začátku nového školního roku.

Zájemci by měli předložit:

- krátký motivační dopis,
- krátký životopis,
- jména a adresy dvou doporučujících osob včetně e-mail kontaktu,
- odkazy na svou doktorskou práci anebo klíčové publikace.

Zájemci mohou být požádáni o doplňující materiály a počítat s osobním pohovorem, na kterém získají  
i podrobný popis projektu.

Všechny dotazy a žádosti posílejte elektronicky na:

Prof. Ing. Jan Náhlík, CSc.  
Ústav počítačové a řídicí techniky  
VŠCHT Praha  
Technická 3–5  
166 28 Praha 6  
Jan.Nahlik@vscht.cz

## LABOREXPO 2007

Praha 26. 9. – 27. 9. 2007

### "Moderní trendy ve farmaceutických výrobcích"

Farmaceutický průmysl je jedním z nejdynamičtěji se rozvíjejících průmyslových oborů, ve kterém je podíl inovací zásadním faktorem růstu. V posledních letech se i v České republice daří rozvíjet nové metody a aplikace a sledovat mezinárodní trendy. Revolucí ve farmaceutickém průmyslu je nástup biotechnologie, která spolu s využitím nových materiálů a s novými přístupy analytické chemie mění současné terapeutické možnosti. Mezi základní předpoklady úspěchů v těchto aplikacích patří interdisciplinární přístup a kooperace pracovišť základního výzkumu s komerčními subjekty. Tento odborný seminář mapuje vybrané aspekty současného vývoje farmaceutického průmyslu a výzkumu v naší republice.

#### Program semináře:

##### 26. 9. 2007

Ing. Miroslav Kuchař Dr.Sc. (Zentiva a.s.): „**Současné trendy výzkumu a vývoje léčiv**“

Prof. Dr. Karel Ulbrich, DrSc. (Ústav makromolekulární chemie AV ČR): „**Polymerní terapeutika**“

Dr. Ladislav Cvak (IVAX CZ): „**Přírodní látky v moderní farmacii**“

Prof. MUDr. RNDr. Vilém Šimánek, DrSc. (LF UP Olomouc): „**Rostlinné látky v etiologii a prevenci nádorových onemocnění**“

Doc. RNDr. Radek Zbořil, PhD. (PřF UP Olomouc): „**Magnetické nanočástice v medicíně**“

Ing. Jiří Protivínský (VŠCHT Praha, LASAK a.s.): „**Inovativní technologie úpravy povrchu dentálních implantátů pro rychlé a bezpečné vhojení**“

Prof. RNDr. Bohumil Kratochvíl, DSc. (VŠCHT Praha): „**Rozmanitost pevných farmaceutických substancí**“

Prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. (PřF UK Praha): „**HPLC v analýze léčiv**“

RNDr. Dana Procházková (Sigma-Aldrich s.r.o.): „**Volba vhodné kolony pro HPLC**“

##### 27. 9. 2007

Doc. Ing. Martin Fusek, CSc. (LIFE SCIENCES CAPITAL, s.r.o.): „**Bioléčiva**“

Doc. RNDr. Vladimír Viklický, CSc. (ÚMG AV ČR): „**Biosimilars – možnosti v České republice**“

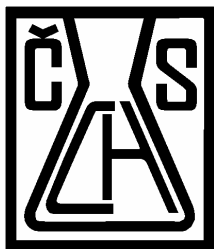
Doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D. (LF UP Olomouc): „**Biologická léčba v onkologii: jak poskytnout správnou léčbu správnému pacientovi?**“

Doc. Ing. Josef Hájíček, CSc. (Zentiva a.s.): „**Biokatalýza ve farmaceutické chemii**“

RNDr. Zbyněk Prokop, Ph.D. (PřF MU-Loschmidovy laboratoře): „**Využití enzymů ve farmaceutických výrobcích**“

RNDr. Milan Kalina (MERCK, s.r.o.): „**Některé aspekty chromatografických separací v downstream procesech**“

Více informací, registrace, aktuální zprávy: [www.laborexpo.cz](http://www.laborexpo.cz)



Česká společnost chemická  
Sekretariát a redakce Chemických listů  
Novotného lávka 5  
116 68 Praha 1  
tel./fax: 222 220 184, redakce tel. 222 221 778  
e-mail: chem.spol@csvts.cz  
<http://www.csch.cz>

## Proč se stát členem České společnosti chemické

Zapojení v České společnosti chemické, členu Asociace českých chemických společností, přináší individuálním chemikům kromě vlastního členství v největší a nejstarší profesní organizaci chemiků:

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCH,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění...
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCH,
- možnost dostávat 4× ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů,
- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- možnost objednání „osobního balíku předplatného“ Chemických listů a časopisů konsorcia EUChemSoc,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě, informace o dění v evropských chemických strukturách
- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu Eurchem, platného v celé EU,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCH,
- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- vedle individuálního členství je možné kolektivní členství firem,
- a řadu dalších služeb.

### Jak se stát členem ČSCH

Členská přihláška je k dispozici na internetových stránkách ČSCH nebo na sekretariátu ČSCH. Členství je přístupné pro všechny zájemce o chemii a přijetí nového člena doporučí dva členové ČSCH (doporučení je možné nahradit odborných životopisem), členství nabývá platnosti po schválení hlavním výborem ČSCH.

Výši členských příspěvků a možné slevy schvaluje na návrh předsednictva hlavní výbor ČSCH.

OBSAH		CONTENTS	
<b>ÚVODNÍK</b>	467	<b>EDITORIAL</b>	467
<b>REFERÁTY</b>		<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Biologické složky biosenzorů pro stanovení těžkých kovů</b>	468	<b>Biological Components of Heavy Metal Biosensors</b>	468
P. Vopálenský, T. Ruml a P. Kotrba		P. Vopálenský, T. Ruml, and P. Kotrba	
<b>Aplikácia oxidu chloričitého ako dezinfekčného činidla na úpravu vody</b>	480	<b>Application of the Chlorine Dioxide as Disinfection Agent for Potable Water Treatment</b>	480
L. Gajdoš, K. Munka, M. Karácsonyová a J. Derco		L. Gajdoš, K. Munka, M. Karácsonyová, and J. Derco	
<b>Metabolity endofytických mikroorganizmov ako biologicky účinné látky</b>	486	<b>Metabolites of Endophytic Microorganisms as Bioactive Compounds</b>	486
M. Valachová, M. Múčková a M. Šturdíková		M. Valachová, M. Múčková, and M. Šturdíková	
<b>LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY</b>		<b>LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS</b>	
<b>Stanovení chemických forem rtuťi kapalinovou chromatografií s detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií technikou generace studených par</b>	495	<b>Determination of Chemical Forms of Mercury Using High Performance Liquid Chromatography with Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometric Detection (HPLC/CV-AFS)</b>	495
P. Houserová, D. Matějčík, V. Kubáň, J. Pavlíčková a J. Komárek		P. Houserová, D. Matějčík, V. Kubáň, J. Pavlíčková, and J. Komárek	
<b>Stanovení aktivity enzymu superoxididmutasy pomocí soupravy Ransod v rostlinném materiálu</b>	504	<b>Analytical Determination of Superoxide Dismutase Enzyme in Plant Materials Using Ransod Set</b>	504
N. Belcrediová, J. Ehrenbergerová, J. Prýma a P. Havlová		N. Belcrediová, J. Ehrenbergerová, J. Prýma, and P. Havlová	
<b>Měření kritických micelárních koncentrací tenzidů ve vodných roztocích</b>	509	<b>Measurement of Critical Micellar Concentrations of Tensides in Aqueous Solutions</b>	509
M. Müllerová, M. Šváb a M. Moreira dos Santos		M. Müllerová, M. Šváb, and M. Moreira dos Santos	
<b>Vliv změn fyzikálních parametrů fluidních vrstev na charakteristiky tlakových fluktuací</b>	515	<b>Influence of Changes in Physical Parameters of Fluidized Beds on Its Characteristics of Pressure Fluctuations</b>	515
O. Trnka a M. Hartman		O. Trnka and M. Hartman	
<b>Desorpční elektrosprej: moderní metoda analýzy organických povrchů</b>	524	<b>Desorption Electrospray: A Modern Tool for Organic Surface Analysis</b>	524
V. Ranc, V. Havlicek, P. Bednar a K. Lemr		V. Ranc, V. Havlicek, P. Bednar, and K. Lemr	

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 101 (2007), čís./no. 6 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 131, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 117 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hettflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/ EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2007 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plně předplatné 2007 (12 čísel) 1512 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 756 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2007 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Dáno do tisku 29.5.2007.