

## Odborná kniha – skripta – elektronické pomůcky aneb Quo vadis učebnice?

My, kteří již něco pamatujeme (ale přitom toho hodně zapomínáme), jsme absolvovali vysokoškolská studia v době, kdy studijní pomůckou v naprosté většině předmětů byla skripta nebo vlastnoručně psané záznamy přednášek. A ze vzpomínek pamětníků, kteří studovali vysokou školu těsně po druhé světové válce vím, že některá skripta vznikala právě ze záznamů přednášek a studenti si je vydávali vlastním nákladem. V menší míře vždy byly a jsou využívány odborné knihy. Nabídka odborných knih pro vysokoškolské studenty (a nejen pro ně) není v současnosti příliš široká. Státem dotované česky psané celostátní vysokoškolské učebnice patří minulosti a i když na trhu lze pořídit kvalitní odborné texty v anglickém jazyce (které jsou v řadě základních technických předmětů považovány za výukový standard v anglosaské oblasti), jejich cena téměř řádově převyšuje současnou cenu vysokoškolských skript (pro ilustraci těm, kteří absolvovali již před nějakou dobou – cena běžných skript pro VŠCHT Praha se pohybuje mezi 200 až 350 Kč). Studenti ve své většině nejsou zatím ani finančně ani jazykově tak dobře vybaveni, abychom všem mohli s klidným svědomím doporučit zahraniční literaturu. Vydání česky psané odborné knihy je však při limitovaných nákladech technické literatury velmi drahé a bez sponzorské účasti (která je pro tento typ literatury bohužel spíše výjimkou) prakticky neuskutečnitelné.

Žijeme však v době, která skloňuje multimedialitu ve všech pádech, prakticky každý student má přístup do počítačové sítě domovské fakulty a napojení na internet z domova se stává běžnou záležitostí. Mohlo by se zdát, že nové informační technologie mohou nahradit klasická tištěná média. Začalo to e-knihami. Pro beletrii, charakteristickou sekvenčním čtením, v roce 1971 odstartoval M. S. Hart projekt Gutenberg, který si vekl za cíl převést do podoby čitelné na počítači maximální množství knih, na které se nevztahují autorská práva. Projekt je stále živý (<http://www.gutenberg.org/>) a v současnosti si čtenář může vybrat mezi více než 16 000 knihami z mnoha světových jazyků (např. čeština je zastoupena R.U.R. Karla Čapka). Jen za období od 11.5 do 11.6. 2005 byl počet stažení e-knih z portálu této organizace vyšší než jeden milion. Nás v daném okamžiku více zajímá druhá skupina knih reprezentovaná učebnicemi, encyklopediemi, odbornými pojednáními, příručkami apod., které se sice dají také číst sekvenčně, častěji však v této oblasti – a to je pro ni typické – chceme rychle vyhledávat informace vztahující se ke konkrétnímu problému a interaktivně je řetězit. Vyžadujeme tzv. hypertextovou informaci, která představuje technologii charakteristickou pro Internet.

Elektronické pomůcky tohoto typu přinášejí řadu výhod, které napomáhají snadnějšímu pochopení výkladu látky – možnost bohatého vizuálního doprovodu ať již ve formě grafů, fotografií, animací, nebo videoklipů se zvukovým doprovodem. Tvorba elektronických pomůcek je např.

jedním z tematických okruhů, ve kterých Fond rozvoje vysokých škol vypisuje každoročně granty na modernizaci vysokoškolské výuky. Takto vznikající výukové prostředky jsou buď pasivní, tedy pouze výkladové, nebo vyžadující interaktivní spoluúčast studenta, a to např. buď při rozhodování o úrovni názornosti příp. rychlosti výkladu, nebo při samotestování pochopení předkládané látky. Vznikají celé tzv. e-learningové (elektronické výukové) systémy určené pro vytváření a publikování elektronických výukových kursů v prostředí Internetu. Tradiční způsoby vzdělávání v posluchárnách a na seminářích jsou takto doplňovány novými formami výuky, využívajícími moderní technologie. Jde nejenom o multimediální, zábavnější a tím efektivnější učící programy přístupné na CD nebo získatelné po Internetu, ale i přímo o on-line výuku po Internetu, ať už samoučící formou nebo za účasti lektora ve virtuálních posluchárnách. Zdůrazňován je při tom přístup ke zdrojům a službám, výměna informací a vzdálená spolupráce. E-learning je momentálně velmi diskutovaným a perspektivním způsobem vzdělávání v podnicích, státních institucích, nebo u kombinovaných forem vysokoškolského studia. Výhody jsou pochopitelné – převažují ty finanční, jako je úspora za dopravu, ubytování a další cestovní výdaje, nezanedbatelnou skutečností je pak i úspora časová. Pro mladou generaci, odkojenou počítačovými hrami, výměnou informací prostřednictvím P2P sítí a trávící na „chatu“ hodiny je tento způsob přijímání informací zcela přirozený.

Znamená to tedy, že klasickým skriptům odzvání? Vžijte se opět na chvíli do role studenta připravujícího se na zkoušku (např. u vody – v letním zkouškovém období, nebo na horské chatě v zimě). Skripta pod hlavou netlačí zdaleka tolik jako notebook, daleko lépe se do nich vyznačuje barevnými fixy a čitelnost osluněného textu je významně lepší u skript než na displeji obrazovky s tekutými krystaly! Samozřejmě i v této oblasti se technika rychle vyvíjí a pohodlně lze využít specializovaná zařízení malých rozměrů s možností personalizace uloženého textu. Nicméně skripta mohou představovat také významný suvenýr z pobytu na alma mater, ke kterému se v odborném životě často vracíváme. Nedostatek odborných publikací v přijatelné ceně pak způsobuje, že některá skripta se stávají bestsellery, neboť je kupuje i širší odborná veřejnost a jejich reedice se tak vydávají daleko častěji, než by odpovídalo počtu studentů daného oboru. Navíc moderní skripta vycházejí často současně nejen v tištěné, ale i v elektronické podobě. Ta potom umožňuje interaktivní vyhledávání, použití křížových odkazů, přenos dat ve formátu PDF atd. Takže e-pomůcky jsou realitou, klasická skripta však zůstávají a s novými formami se doplňují. Úroveň znalostí studenta bude stejně záviset především na jeho zápalu pro věc a studijní pili....

Pavel Chuchvalec

## STACIONÁRNÍ FÁZE V AFINITNÍ CHROMATOGRAFII

TEREZA VAŘILOVÁ

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Albertov 2030, 128 43 Praha 2  
tereza.varilova@seznam.cz

Došlo 22.7.04, přepracováno 7.3.05, přijato 7.4.05.

Klíčová slova: afinitní chromatografie, afinitní nosič, afinitní ligand, biologicky aktivní látka

### Obsah

1. Úvod
2. Princip afinitní chromatografie
3. Nosiče pro afinitní chromatografii
4. Aktivace nosičů
5. Imobilizace afinitního ligandu na tuhý nosič
6. Blokace nezreagovaných aktivních skupin
7. Stanovení množství imobilizovaného ligandu
8. Eluce látek z kolony
9. Příklady použití afinitní chromatografie
10. Závěr

### 1. Úvod

V dnešní době se stále častěji hledají způsoby analýzy a detekce biologicky aktivních látek, hlavně peptidů, bílkovin, léčiv a drog a složitých směsí, které je potřeba přečistit a rozdělit. Jednou z metod vhodných k tomuto účelu je afinitní chromatografie.

Princip afinitní chromatografie je znám už dlouho<sup>1,2</sup>. Její aplikaci v HPLC umožnila příprava afinitních stacionárních fází, které snesou práci za vysokých tlaků, ale nezpůsobují denaturaci bílkovin. Stacionární fáze jsou obvykle připravovány na míru pro purifikaci daného proteinu a každý separační proces musí být optimalizován.

Afinitní chromatografie (ALC) je moderní separační metoda, která spojuje výhody HPLC s výjimečnou biologickou specifičností bioafinitní chromatografie. To je též důvodem, proč roste zájem o biochemické a biolékařské aplikace této metody<sup>3</sup>.

### 2. Princip afinitní chromatografie

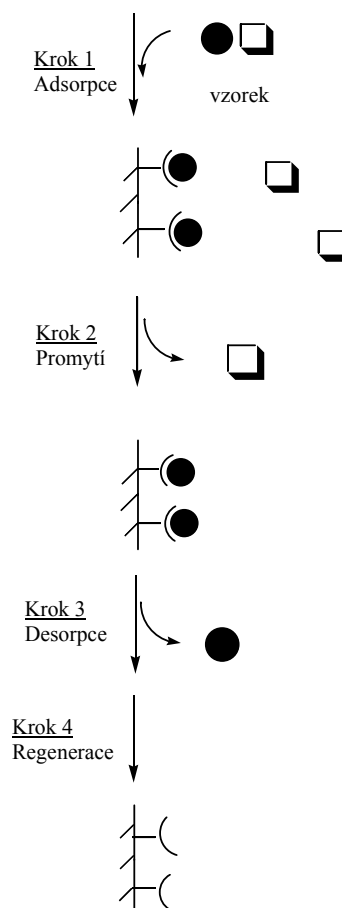
Afinitní chromatografie je založena na výjimečné schopnosti biologicky aktivních látek vázat specificky a reversibilně komplementární struktury (např. enzym –

substrát, enzym – inhibitor, enzym – kofaktor, protilátka – antigen, protilátka – haptén, hormon – receptor, lektin – sacharid apod.). Biospecifické interakce zahrnují vodíkové vazby, hydrofobní interakce, Londonovy disperzní síly a coulombické interakce<sup>3-5</sup>. Princip separace pomocí afinitní chromatografie je patrný z obr. 1.

Látka E interaguje s ligandem L za vzniku komplexu E...L. Tvorbu tohoto komplexu popisuje rovnice (1) a příslušná rovnovážná konstanta  $K$ .



$$K = \frac{[E...L]}{[E] \cdot [L]}$$



Obr. 1. **Princip afinitní chromatografie** (upraveno podle<sup>6</sup>); Krok 1 – Nadávkování vzorku: vzorek v roztoku je biospecificky sorbován na ligand stacionární fáze. Krok 2 – nečistoty jsou vymyty z kolony a detegovány jako první pík. Krok 3 – molekula sorbované látky je uvolněna disociací (nebo desorpce) pufrem obsahujícím desorpční činidlo. Krok 4 – afinitní kolona je regenerována a připravena pro další použití

Rovnovážná konstanta  $K$  musí být dostatečně vysoká, aby mohlo dojít ke tvorbě komplexu, ale ne tak vysoká, aby znemožnila eluci látek z kolony<sup>7</sup>. Ligandy mohou být monospecifické nebo skupinově specifické. Monospecifické ligandy se vážou silněji než skupinově specifické a rovnovážné konstanty se pohybují řádově mezi  $10^6$  až  $10^8$  mol<sup>-1</sup> l. Pokud jsou v rozmezí  $10^3$  až  $10^5$  mol<sup>-1</sup> l, dochází spíše k retardaci látek než ke tvorbě stabilního komplexu. Nad  $10^9$  mol<sup>-1</sup> l musí být použity k eluci látek drastické podmínky<sup>7,8</sup>.

Kinetika sorpce je v afinitní chromatografii pomalejší než např. v iontově výměnné rozdělovací chromatografii. Důležitá je rovněž otázka, zda imobilizované látky mají stejnou biologickou aktivitu jako neimobilizované. Zatímco v řadě případů bylo potvrzeno shodné chování, jindy byly pozorovány odchylky, např. stacionární fáze se zkříženým albuminem připravené odlišným způsobem vykazovaly různé chromatografické vlastnosti<sup>9</sup>.

Nejčastěji se používají biologické ligandy (enzymy, receptory, protilátky, Protein A, lektiny, nukleové kyseliny), avšak jejich aplikace je omezena vysokou cenou a/nebo jejich relativní nestabilitou. Proto je snaha nahradit přírodní ligandy syntetickými, robustnějšími. Patří mezi ně nízkomolekulární ligandy jako jsou barviva, chelatovné kovy, thiofilní ligandy a deriváty kyseliny borité. Syntetické ligandy vykazují obvykle skupinovou selektivitu, interagují s různými proteiny současně, proto je snaha zvýšit selektivitu separace<sup>10</sup>.

Afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech s chelatovnými kovy jako jsou Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> nebo Co<sup>2+</sup> (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) je velmi účinná pro čištění rekombinantních proteinů a často se používá pro stanovení biologicky aktivních látek v těle<sup>11</sup>.

### 3. Nosiče pro afinitní chromatografii

Stacionární fáze se obvykle připravují chemickou vazbou afinitního ligandu na tuhý nosič. Používají se stabilní hydrofilní makroporézní nebo neporézní matrice. Jejich významné charakteristiky jsou velikost částic, distribuce velikosti porů, přístupný povrch a flexibilita polymeru, protože vysoké dostupnosti ligandu lze dosáhnout pouze s pohyblivými řetězci polymeru<sup>8</sup>. Matrice musí co nejméně interagovat s analytem (minimální nespécifické interakce)<sup>12,13</sup> a být teplotně, chemicky a mechanicky stabilní<sup>13,14</sup>. Důležitá je rovněž pH stabilita. Nosič musí obsahovat velké množství chemických skupin, které mohou být aktivovány tak, aby umožnily kovalentní připojení ligandu<sup>12</sup>. Některé nosiče dodává výrobce již v aktivované formě, jiné je nutné předem aktivovat.

V určitých případech lze použít fyzikálně chemické vlastnosti stacionární fáze pro zachycení ligandu fyzikálními silami. Tím vzniká snadno regenerovatelný materiál za nízkou cenu. Tak byla např. připravena afinitní stacionární fáze s barvivem Procion-Brown H-A k čištění lysozymu z vaječného bílku<sup>15</sup>. Podobně byl imobilizován konkanava-

lin A na oxid zirkoničitý na základě acidobazických interakcí. Stabilita stacionární fáze byla zvýšena reakcí s glutaraldehydem a po použití snadno regenerována odstraněním konkanavalinu z povrchu s možností opětné adsorpce<sup>16</sup>.

Existuje řada komerčně dostupných materiálů, vhodných pro přípravu afinitních stacionárních fází.

#### Silikagel

Silikagel je často používaný nosič pro přípravu stacionární fáze. Jeho povrch je nutné nejprve modifikovat, aby mohl být navázán afinitní ligand (např. zavádění epoxy- nebo isothiokyanátové skupiny). Takto aktivovaný silikagel může přímo reagovat s ligandem, který obsahuje hydroxylové, thiolové nebo aminoskupiny<sup>3</sup>. Tento materiál snese i vysoké tlaky, ale je nestabilní v kyselé i alkalické oblasti (využitelný rozsah pH je omezen na oblast  $2 < \text{pH} < 8$ ). Nespécifické interakce lze pozorovat již při  $\text{pH} > 4$  (cit.<sup>10</sup>). Relativně nový nosič je koloidní roztok skleněných vláken. Derivatizací se eliminují nespécifické interakce. Jeho hlavní výhody jsou velký povrch (důsledkem je velká kapacita pro vzorky), vysoká účinnost a mechanická odolnost ve srovnání s měkkými gely (agarosa, perlová celuloza). Nevýhodou, podobně jako u silikagelu, je omezený rozsah pH, takže nelze použít alkalické pufrů, doporučované pro extrakci a přečištění tkáňových proteinů<sup>17</sup>.

#### Anorganické oxidy Al, Ti a Zr

Další skupinou anorganických materiálů používaných jako nosiče jsou různé oxidy kovů<sup>10</sup>, nejčastěji Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (alumina), TiO<sub>2</sub> a ZrO<sub>2</sub>. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> a ZrO<sub>2</sub> existují v mnoha amorfních a krystalických formách. Jejich chemická stabilita je vyšší než u silikagelu. Alumina je chemicky odolnější než oxid křemičitý a rozpouští se pouze při  $\text{pH} > 12$  a pod  $\text{pH} < 3$ . Avšak její povrch je heterogenní, proto kolona s Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vykazuje nižší účinnost oproti SiO<sub>2</sub>. TiO<sub>2</sub> a ZrO<sub>2</sub> mají výborné mechanické vlastnosti a chemickou stabilitu, odolávají vysokým tlakům (až do 500–600 bar) a snášejí práci i v extrémních pH (1–14) (cit.<sup>10</sup>).

#### Agarosové nosiče a jejich deriváty

Nejběžnějším agarosovým nosičem je Sepharosa, která obsahuje dvě polysacharidové jednotky, je stabilní v rozmezí pH 4–9 a snese teploty až do 40 °C. Lze ji používat i při velké koncentraci soli a močoviny. Dále je Sepharosa odolná vůči běžným organickým rozpouštědlům a nevykazuje nespécifické interakce. Nevýhodou je nízká tlaková stabilita, proto není vhodná pro HPLC (cit.<sup>12</sup>). Agarosa s divinylsulfonem (DVS) křížově navázaným na agarosu (DVS-agarosa) má výrazně lepší vlastnosti oproti klasické agarose: je mechanicky stabilní, chemicky stálá v kyselém a neutrálním prostředí a dostatečně teplotně stabilní<sup>18</sup>.

#### Polyakrylamidové gely

Jedná se o hydrofilní kopolymery<sup>12</sup> založené na bázi akrylamidu a akrylamidových derivátů. Jakožto syntetické

polymery nejsou napadány mikroorganismy a mají delší trvanlivost. Jsou stále ve zředěných roztocích solí, detergentů, močoviny a v organických rozpouštědlech, i když za extrémních podmínek lze pozorovat určitou změnu pórovitosti. Mezi nepoužívanější polyakrylamidové nosiče patří Bio-Gely, které jsou stabilní při pH 1–10.

#### *Hydroxyalkylmethakrylátové nosiče*

Tyto materiály se připravují polymerací hydroxyalkylesterů kyseliny methakrylové s alkylen-bis(methakrylát). Poměrem reagujících složek lze řídit počet reaktivních skupin, pórovitost i velikost vnitřního povrchu gelu. Jejich výhodou je chemická i mechanická stabilita a rezistence vůči mikroorganismům. Jejich nevýhodou je částečně hydrofobní charakter, a tedy i náchylnost k nespecifickým hydrofobním interakcím<sup>12</sup>.

Mezi nejrozšířenější hydroxyalkylmethakrylátové nosiče patří hydroxyethylmethakrylát (HEMA), což je makroporézní kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu. HEMA se dodává v různé velikosti částic, je stabilní až do tlaku 20 MPa a při pH 2 až 12 a kompatibilní s většinou organických rozpouštědel<sup>19,20</sup>.

Dále sem patří Toyopearl<sup>21–23</sup>, což je hydrofilní, makroporézní sorbent na bázi kopolymeru ethylenglykolu a methakrylátu. Je stabilní při pH 2–12 a v teplotním rozmezí 4–60 °C. Má značný vylučovací limit (100 nm), vysokou kapacitu a definovanou velikost částic. Výhodou jsou minimální nespecifické interakce a vysoká výtěžnost proteinů, enzymů a glykoproteinů. Komerčně dostupný je tento nosič pod názvem TSK-gel od firmy Tosoh.

#### *Dextranové gely*

Dextran je větvený polysacharid složený z jednotek glukosy, který vzniká ze sacharosy působením některých mikroorganismů. Rozpustný dextran obsahuje přes 90 % glykosidických vazeb  $\alpha$ -1,6 a je větvený glykosidickými vazbami 1,2, 1,3 a 1,4. Trojrozměrný gel se připravuje reakcí rozpustného dextranu s epichlorhydrinem v alkalickém prostředí. Dextranové gely<sup>12</sup>, komerčně známé pod názvem Sephadex, jsou chemicky velmi stálé (nemění se ani dvouměsíčním působením 0,2 M NaOH při 60 °C). Glykosidické vazby jsou však citlivé k hydrolyze při nízkých hodnotách pH a také mechanická stabilita je nižší.

#### *Celulosa*

Celulosa je tvořena hlavně lineárním polymerem D-glukosových jednotek vázaných vazbou  $\beta$ -1,4, přičemž v malém měřítku se vyskytuje i vazba 1,6. Komerčně dostupná mikrokrytalická celulosa je obvykle zesíťována nějakým činidlem se dvěma funkčními skupinami, např. epichlorhydrinem, a je značně chemicky stálá<sup>12</sup>.

Protože celulosa je snadno dostupná a levná, je nejvíce používaná v průmyslové oblasti. Perlová celulosa je všestranný, makroporézní, hydrofilní materiál s velkou kapacitou. Ve formě membrány je to oblíbená matrice. Vlákniťatá celulosa je důležitý sorbent pro vazbu DNA

(DNA-celulosa)<sup>24</sup>. Její nevýhodou je nízká mechanická stabilita.

#### *Polystyren*

Polystyreny<sup>13</sup> s různým stupněm zesíťování jsou odolnější vůči tlaku než polysacharidové nosiče, i když ve srovnání s anorganickými materiály vykazují nižší tlakovou toleranci. Polystyren může bobtnat v přítomnosti organických rozpouštědel. Vzhledem k hydrofobnímu charakteru polymeru vykazuje nespecifické interakce a nižší účinnost. Tyto nevýhody mohou být částečně odstraněny pokrytím polymeru vhodnou sloučeninou nebo blokováním zbytkových funkčních skupin. Vlastnosti polystyrenu mohou být změněny zabudováním řetězce polyethylenglykolu do málo zesíťovaného polymeru. Tento nový materiál dobře bobtná v organických i vodných roztocích.

#### *Nové materiály*

Materiály připravené sol-gel technologií umožňují zakapsulování ligandů při zachování jejich biologické aktivity. Ligandy nejsou vázány chemicky, pouze fyzikálními silami<sup>25</sup>. Materiály připravené sol-gel technologií obsahující proteiny byly využity jako imunoafinitní sorbenty. Vykazovaly vyšší stabilitu z hlediska denaturace a mikrobiální degradace i nižší nespecifické interakce<sup>26</sup>. Z dosavadní praxe se zdá, že optimalizací výrobního procesu bude možné zajistit, aby selektivita fáze byla dána pouze zachycenými ligandy.

Vtištěné syntetické receptory představují nový typ vysoce selektivních afinitních stacionárních fází, založených rovněž na molekulovém rozpoznávání. Jejich příprava spočívá v polymeraci jednoho nebo více monomerů se zesíťovadlem, poroginem (rozpouštědlem) a iniciátorem polymerace v přítomnosti analytu (ligandu). Po polymerizaci je extrahován rozpustný analyt a v polymeru zůstane obtisky s umělými vazebnými místy. Takto získaný materiál je schopen selektivně rozpoznat a vázat vtištěnou molekulu<sup>27–29</sup>.

Vtištěné syntetické receptory mají oproti biologickým receptorům řadu výhod. Zatímco přírodní receptory mají omezenou stabilitu, jejich příprava je obtížná a vyžaduje purifikační procesy, jsou syntetické receptory na bázi vtištěných polymerů velmi robustní a vydrží eluci řadou rozpouštědel. Odstraňují tak problémy spojené s nestabilitou biomolekul a komplikovanou přípravou afinitních stacionárních fází. Nevýhodou mohou být nespecifické interakce samotného polymeru<sup>29</sup>.

Monolitické fáze našly uplatnění i v afinitní chromatografii. Jejich hlavní výhodou proti náplňovým kolonám spočívá v extrémně rychlých separacích, důležitých při analýze labilních látek, jako jsou proteiny. Mezi další výhody patří nižší spotřeba vzorku a rozpouštědel a nižší detekční limit<sup>30</sup>. Komerčně dostupné jsou i monolitické disky, na něž je možné navázat afinitní ligandy a využít je při izolaci biologicky aktivních látek<sup>31</sup>. Afinitní monolitické disky byly použity pro separaci monospecifických polyklonálních protilátek<sup>32</sup>.

#### 4. Aktivace nosičů pro afinitní chromatografii

Pokud není nosič aktivovaný již od výrobce, je nutné jej ještě před navázáním ligandu aktivovat. Aktivačních reakcí existuje velmi mnoho, nejběžnější jsou:

- Bromkyanová metoda (CNBr)<sup>33</sup>; Tento způsob převažuje pro aktivaci polysacharidových nosičů a je často používán v laboratorním i průmyslovém měřítku. Má řadu výhod: je téměř univerzální (lze ho proto použít pro polymery obsahující hydroxylové skupiny), na aktivované nosiče lze navázat jak malé, tak vysokomolekulární ligandy obsahující primární aminoskupiny a příprava nosičů je relativně jednoduchá. Mezi nevýhody patří vysoká toxicita bromkyanu. Tato metoda je zvláště mírná pro vazbu citlivých biomolekul, jako jsou enzymy a protilátky. Příklad aktivace nosiče a vazby ligandu je uveden na obr. 2.
  - Aktivace divinylsulfonem (DVS)<sup>33</sup>; Divinylsulfon je bifunkční činidlo, které se používá podobně jako v předchozím případě pro aktivaci nosičů s hydroxylovými skupinami. DVS zavádí reaktivní vinyl skupiny do matrice pro vazbu aminů, alkoholů, thiolů a fenolů. Gely aktivované DVS jsou reaktivnější než gely aktivované epoxy skupinami, a proto je vazebný proces rychlejší a účinnější. Jsou vhodné pro imobilizaci cukrů prostřednictvím jejich hydroxylových skupin. Nevýhodou je nestabilita imobilizovaných ligandů v alkalickém prostředí daná labilní etherovou vazbou mezi DVS a nosičem.
  - Aktivace epoxy skupinami (bisoxiranem)<sup>33</sup>; Bisoxira-
- ny mohou být použity pro zavedení epoxy skupiny do mnoha hydroxylovaných polymerů. Jako aktivační činidlo se nejčastěji používá 1,4-butandiol-diglycidylether, který v alkalické oblasti reaguje ochotně s hydroxylovými skupinami za vzniku derivátů obsahujících hydrofilní raménko (spacer) o dlouhém řetězci s reaktivní oxiranovou skupinou na konci. Mezi bisoxiranem a matricí se vytvoří stabilní etherová vazba. Koncová epoxyskupina může reagovat s ligandy, které obsahují hydroxylové, aminové nebo thiolové skupiny.
- Aktivace organickými sulfonylchloridy<sup>33</sup>; Tato metoda se používá pro aktivaci agarosy a dalších hydroxylovaných matric. Organické sulfonylchloridy, jako jsou *p*-toluensulfonylchlorid (tosylchlorid) a 2,2,2-trifluoroethansulfonylchlorid (tresylchlorid), reagují s neaktivními hydroxylovými skupinami nosiče na aktivní sulfonové skupiny. Tyto aktivované nosiče mohou být použity pro vazbu ligandu obsahující thiolové a/nebo amino skupiny (thiolové skupiny jsou reaktivnější). Vazbu ligandu lze provést ve vodných i organických rozpouštědlech (např. v dimethylformamidu). Materiály aktivované tresylem jsou velmi účinné pro imobilizaci ligandů v neutrálním prostředí při 4 °C.
  - Triazinová metoda<sup>33,34</sup>; Trichlor-s-triazin lze použít pro aktivaci agarosových nosičů (využívá se pro imobilizaci heparinu). Hlavní nevýhodou aktivace pomocí trichlor-s-triazinu je jeho vysoká toxicita. Tento způsob aktivace je méně běžný.

Tabulka I

Reakční podmínky imobilizace pro různé funkční skupiny (upraveno podle<sup>4</sup>)

Aktivní skupina	Reagující skupiny ligandu	Reakční podmínky
Bromkyan	-NH <sub>2</sub>	pH 7–10, doba 1–12 h, teplota 4–25 °C
Divinylsulfon	-NH <sub>2</sub> -OH -SH	pH 6–11, doba 2–24 h, teplota 4–25 °C
Epoxy	-NH <sub>2</sub> -OH -SH -COOH	pH 5–12, doba 4–72 h, teplota 4–60 °C
Tresyl	-NH <sub>2</sub>	pH 7–9, doba 2–16 h, teplota 4–25 °C
Aldehyd	-NH <sub>2</sub>	pH 3–10, doba 1–12 h, teplota 4–25 °C

Nosič	Aktivace	Vazba	Afinant
— OH	+BrCN	— O-CN + H <sub>2</sub> N-ligand	— O-CNH-ligand
— OH	+ClSO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	— SO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> N-ligand	— NH-ligand + HOSO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>

Obr. 2. Příklad aktivace nosiče a vazby ligandu (upraveno podle<sup>14</sup>); BrCN – aktivace bromkyanem, ClSO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> – aktivace tresylchloridem

## 5. Imobilizace afinitního ligandu na tuhý nosič

Imobilizace biomolekul na anorganické, organické a polymerní povrchy jsou obvykle založeny na kovalentní vazbě, fyzikální adsorpci, zachycení v semipermeabilní membráně a mikroenkapsulaci v polymerních mikrokuličkách a hydrogelech. Nejčastější je imobilizace pomocí kovalentní vazby. Ostatní metody nejsou obecně použitelné a ve většině případů jsou omezeny jen na malý rozsah analytů a aplikací<sup>8</sup>.

Podmínky imobilizace se liší v závislosti na vlastnostech ligandu a typu aktivních skupin nosiče. Reakční podmínky imobilizace pro nosiče s různými aktivními skupinami ukazuje tabulka I. Z ní je patrné, že na většinu běžných nosičů je možné imobilizovat afinitní ligand v teplotním rozmezí 4–25 °C (pouze pro epoxy aktivní skupiny lze teplotu zvýšit až na 60 °C) a během 24 hodin. Hodnota pH imobilizace se liší podle konkrétního typu ligandu a jeho reagující skupiny.

Bylo zjištěno, že imobilizaci na epoxy aktivované nosiče lze podpořit zvýšením koncentrace solí v roztoku (např.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) v důsledku zvýšení hydrofobních interakcí. Pro proteiny a nukleotidy se imobilizace zvýší v neutrálním prostředí, kdežto pro malé afinitní ligandy při vyšším pH (cit.<sup>35</sup>).

Jako ligandy mohou být použity všechny látky schopné biospecifické reverzibilní vazby. Nízkomolekulární ligandy jsou stabilnější a stericky lépe dosažitelné než vysokomolekulární ligandy, které jsou hůře definovatelné a mohou podléhat denaturaci<sup>14</sup>.

## 6. Blokace nezreagovaných aktivních skupin

Protože po imobilizaci afinitního ligandu na tuhý nosič zůstane na nosiči vždy část skupin aktivních, je nutné je zablokovat<sup>4</sup>. K tomu se nejčastěji využívá dvou postupů:

- Vazba vhodné látky na zbytkové aktivní skupiny nosiče: na nezreagované aktivní místo nosiče se naváže vhodná látka (např. glycin, glycerol nebo ethanola-min), která by neměla ovlivňovat sorpci a desorpci analytu.
- Hydrolyza zbytkových aktivních skupin vedoucí k jejich odstranění: provádí se v alkalickém prostředí a je využitelná pouze pro ligandy, které jsou v tomto prostředí stálé.

Pro vymytí nekovalentně vázaného afinitního ligandu se používají pufrы s vysokou iontovou silou a pH, při kterém probíhala imobilizace.

## 7. Stanovení množství imobilizovaného ligandu

Důležitou charakteristikou afinitní stacionární fáze je množství kovalentně navázaného ligandu<sup>12</sup>. Ke zjištění jeho koncentrace bylo vypracováno mnoho metod:

### *Diferenční analýza*

Množství ligandu vázaného k nosiči se vypočítá z rozdílu mezi celkovým množstvím ligandu přidaného do reakční směsi a množstvím nezreagovaného ligandu, které se získá po důkladném promytí sorbentu. Tato metoda je velmi nepřesná, zejména když se kovalentně váže jen malá část ligandu, nebo je-li ligand špatně rozpustný.

### *Přímá spektrometrie*

V případě transparentních nosičů se může zjišťovat množství kovalentně navázaného ligandu přímou spektrometrií.

### *Kyselá nebo enzymová analýza*

Působením kyseliny za drastičtějších podmínek dochází k hydrolyze vazby mezi ligandem a nosičem a uvolní se volný ligand nebo produkt jeho degradace, který lze stanovit (např. v případě proteinů analýzou aminokyselin). Tato metoda není příliš výhodná, protože může dojít k současnému rozkladu nosiče (tento problém lze částečně řešit enzymovou hydrolyzou za mírných podmínek).

### *Elementární analýza*

Množství navázaného ligandu lze také určit z elementární analýzy. Stanovuje se přítomný prvek, např. síra, jod, dusík nebo fosfor. Elementární analýza dusíku může poskytovat zkrácené výsledky, protože jeho obsah vzrůstá při aktivaci bromkyanem.

### *Radioaktivita*

V některých případech lze použít ligand značený radioizotopem. Jako radioizotopy se nejčastěji používají  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{57}\text{Co}$ .

## 8. Eluce látek z kolony

Látky, které silně interagují se stacionární fází, se zadrží v koloně a je nutné je uvolnit do mobilní fáze. Eluci analytů z kolony je možno provést dvěma způsoby<sup>4</sup>:

- Nespecifická eluce; Při této metodě látka eluuje při změně některé z vlastností mobilní fáze, např. hodnoty pH, iontové síly, relativní permitivity nebo teploty. Ve většině případů stačí pro eluci změna hodnoty jedné veličiny. Při analýze proteinů je nutno dodržet podmínky, při kterých nedochází k jejich denaturaci.
- Specifická eluce; Při tomto způsobu eluce se do mobilní fáze přidá látka, která vytvoří s ligandem pevnější komplex než je původní komplex analytu. Tento způsob eluce bývá šetrnější ke stanovovaným látkám. Eluci lze provést izokraticky nebo pomocí gradientu.

Izokratický způsob je vhodný pro jednoduché látky, které mají malou afinitu k ligandu. V případě použití gradientové eluce je důležité zvolit vhodnou strmost gradientu: při mírném gradientu se většinou látky dobře rozdělí, ale jejich píky nebývají dostatečně úzké, při strmém gradientu se analyty hůř rozdělí, ale píky jsou ostřejší.

Tabulka II  
Příklady použití afinitní chromatografie

Biologicky aktivní látka	Afinitní ligand	Původ vzorku	Lit.
Aspartátové proteasy	aromatické aminokyseliny	žaludeční sliznice	66
Pepsin	DIT <sup>a</sup>	žaludeční sliznice	42, 43
Heparin vázající a heparin nevázající proteiny	heparin	kančí semenná plazma	55,56
Serinové proteasy	BPTI <sup>b</sup>	hovězí a lidský intervertebrální disk	41
FABP <sup>c</sup>	Lb-FABP	kuřecí játra	67
Mléčný represor β-galaktosidasy	DNA - sepharosa	bakterie	68
IgA <sup>d</sup>	TG19318 (syntetický peptidový ligand)	supernatant surové buněčné kultury	52,53
IgM <sup>e</sup>	TG19318 (syntetický peptidový ligand)	myš	54
AGP <sup>f</sup>	kyselina imidodiocetová s Cu (II)	plazma	69
Molekulový receptor viru dengue	rekombinantní E protein	dengue virus typ 4	47
Lektin	Affi-gel, blue gel	houby <i>Xerocomus spadicus</i>	70
Estradiol	tetrapeptid	–	45
Glykoproteiny	Con A <sup>g</sup>	lidské krevní sérum, rakovinotvorné buňky	71
Glykoproteiny	lektin	–	72
L-, D-tryptofan	HSA <sup>h</sup>	–	73
Deriváty benzodiazepinu	HSA	–	74
Atrazin (pesticid)	antiatrazin - protilátka	zemina	39

<sup>a</sup>DIT – 3,5-dijodo-L-tyrosin, <sup>b</sup>BPTI – bazický pankreatický inhibitor trypsinu, <sup>c</sup>FABP – proteiny vážící mastné kyseliny, <sup>d</sup>IgA – imunoglobulin A, <sup>e</sup>IgM – imunoglobulin M, <sup>f</sup>AGP – α<sub>1</sub>-kyselý glykoprotein, <sup>g</sup>Con A – konkanavalin A, <sup>h</sup>HSA – lidský sérový albumin

## 9. Příklady použití afinitní chromatografie

Metoda afinitní chromatografie se nejčastěji používá k izolaci peptidů, proteinů, glykoproteinů a obecně biologicky aktivních látek. Vybrané aplikace použití afinitní chromatografie ukazuje tabulka II. Z této tabulky je patrné, že možnosti aplikace této metody jsou velmi široké. Afinitní metody se hodí pro prekoncentraci stopových množství sloučenin, čištění analytů v komplexních směsích i k analýze látek<sup>36</sup>. Také se používají pro analýzy v oblasti životního prostředí<sup>37</sup>, např. pesticidů<sup>37–39</sup> a toxinů<sup>37,40</sup>. Tato stanovení bývají komplikována složitými maticemi a časovou nutností několika předseparačních kroků<sup>37</sup>.

Četné aplikace jsou v lékařství a medicíně, např. enzymy<sup>41–44</sup>, hormony<sup>45,46</sup>, viry a jejich genetický fond<sup>47–49</sup>, rakovinotvorné markery<sup>50,51</sup>, protilátky<sup>52–54</sup>, proteiny semenné plazmy<sup>55,56</sup> a léky či drogy<sup>57,58</sup>. ALC je nepostradatelnou metodou v proteomice<sup>59–61</sup>.

Důležité jsou práce zaměřené na stanovení vazebných konstant pro kvantifikaci interakce protein-ligand<sup>45,62–65</sup>. Jako příklad je možné uvést stanovení vazebné konstanty

komplexu heparinu s protrombinem III ( $3,4 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ l}$ , cit.<sup>65</sup>).

Afinitní chromatografie se často kombinuje a doplňuje s dalšími separačními technikami, např. s dvoudimenzionální elektroforézou (2-DE). Před vlastní separací proteinů metodou 2-DE lze afinitní chromatografii použít pro prekoncentraci a předúpravu vzorku<sup>59</sup>.

## 10. Závěr

Afinitní chromatografie je metoda separace a izolace biologicky aktivních látek, založená na jejich specifických interakcích (molekulovém rozpoznávání) s ligandy. Během posledních dvaceti let prošla velkým vývojem a stala se účinným nástrojem pro řadu aplikací. V současné době dochází k velkému pokroku ve vývoji afinitních stacionárních fází (vtištěné polymery, materiály připravené sol-gel technologií a monolitické fáze) i v miniaturizaci techniky (např. afinitní membrány).

Základní charakteristiky afinitní chromatografie jsou shrnuty v tabulce III.

Tabulka III  
Přehled hlavních charakteristik afinitní chromatografie (upraveno podle<sup>8</sup>)

Parametr	Hodnota
Princip separace	dělí molekuly podle biospecifické aktivity
Využití	– jednostupňové přečištění cílové molekuly, – čištění označených rekombinantních proteinů, – skupinové separace, – odstranění specifických kontaminantů
Separáčnické charakteristiky	– rozlišení velmi vysoké, – zatížení vysoké, – rychlost střední, – výtěžek vysoký
Hlavní parametr optimalizace	výběr afinitního ligandu
Specifikace	– velmi jednoduchý purifikační protokol, – vyžaduje pouze jednoduché vybavení, – velmi vhodné pro značené rekombinantní proteiny

## LITERATURA

- Rajagopalan T. G., Moore S., Stein W. H.: *J. Biol. Chem.* 241, 4940 (1966).
- Walters R. R., Buck R. P.: *J. Chromatogr., A* 188, 61 (1980).
- Hynek R.: *Chem. Listy* 89, 93 (1995).
- Turková J.: *Bioaffinity Chromatography*. 2. vydání. Elsevier, Amsterdam 1993.
- Kašička V.: *Chem. Listy* 91, 320 (1997).
- Man C. T., Hodges R. S. (ed.), v knize: *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*, str. 480. CRC Press, Boca Raton 1991.
- Glatz Z.: *Chem. Listy* 96, 127 (2002).
- <http://www.amershambiosciences.com>, staženo 17. 2. 2005.
- Allenmark S.: *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*. 2. vydání. Ellis Horwood, New York 1991.
- Leonard M.: *J. Chromatogr., B* 699, 3 (1997).
- Zouhar J.: *Chem. Listy* 93, 683 (1999).
- Lowe C.R., Dean P.D.G.: *Afinitní chromatografie*. SNTL, Praha 1979.
- Tozzi C., Anfossi L., Giraudi G.: *J. Chromatogr., B* 797, 289 (2003).
- Štulík K.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
- Giuliano K. A.: *Anal. Biochem.* 200, 370 (1992).
- Glavanovich M. H., Carr P.W.: *Anal. Chem.* 66, 2584 (1994).
- Zusman R., Zusman I.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 175 (2001).
- Porath J., Låås T., Janson J.-Ch.: *J. Chromatogr., A* 103, 49 (1975).
- Čoupek J., Vinš I.: *J. Chromatogr., A* 658, 391 (1994).
- Turková J., Bláha K., Horáček J., Vajčner J.: *J. Chromatogr., A* 215, 165 (1981).
- Tosoh Bioscience: *2003 Laboratory Products Catalogue*, str. 93.
- Matsumoto I., Ito Y., Seno N.: *J. Chromatogr., A* 239, 747 (1982).
- Nakamura K., Suzuki T., Kamichika T., Hasegawa M., Kato Y., Sasaki H., Inouye K.: *J. Chromatogr., A* 972, 21 (2002).
- Gemeiner P., Polakovič M., Mislovičová D., Štefuca V.: *J. Chromatogr., B* 715, 245 (1998).
- Jin W., Brennan J. D.: *Anal. Chim. Acta* 461, 1 (2002).
- Spitzer B., Cichna M., Markl P., Sontag G., Knopp D., Niessner R.: *J. Chromatogr., A* 880, 113 (2000).
- Sellergren B.: *J. Chromatogr., A* 673, 133 (1994).
- Kandimalla V. B., Ju H.: *Anal. Bioanal. Chem.* 380, 587 (2004).
- Quaglia M., De Lorenzi E., Sulitzky C., Massolini G., Sellergren B.: *Analyst* 126, 1495 (2001).
- Pan Z., Zou H., Mo W., Huang X., Wu R.: *Anal. Chim. Acta* 466, 141 (2002).
- Tennikova T. B., Freitag R.: *J. High Resol. Chromatogr.* 23, 27 (2000).
- Josic D., Lim Y.-P., Štrancar A., Reutter W.: *J. Chromatogr., B* 662, 217 (1994).
- Hramnson G. T., Mallia K. A., Smith P. K.: *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. Academic Press, London 1992.
- Finlay T. H., Troll V., Hodgins L. T.: *Anal. Biochem.* 108, 354 (1980).
- Wheatley J. B., Schmidt D. E. Jr.: *J. Chromatogr., A* 849, 1 (1999).
- Stevenson D.: *J. Chromatogr., B* 745, 39 (2000).



37. Van Emon J. M., Gerlach C. L., Bowman K.: *J. Chromatogr.*, B 715, 211 (1998).
38. Thomas D. H., Beck-Westermeyer M., Hage D. S.: *Anal. Chem.* 66, 3823 (1994).
39. Ferrer I., Hennion M.-C., Barceló D.: *Anal. Chem.* 69, 4508 (1997).
40. Carvajal M., Arroyo G.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 1301 (1997).
41. Šťovíčková J., Podrazký V., Trnavský K.: *J. Chromatogr.*, B 575, 229 (1992).
42. Arnoštová H., Kučerová Z., Tišlerová I., Trnka T., Tichá M.: *J. Chromatogr.*, A 911, 211 (2001).
43. Tonková E., Tichá M., Kučerová Z.: *Int. J. Biochromatogr.* 4, 35 (1998).
44. Sahin-Tóth M.: *Pancreatology* 1, 461 (2001).
45. Tozzi C., Anfossi L., Giraudi G., Giovannoli C., Baggiani C., Vanni A.: *J. Chromatogr.*, A 966, 71 (2002).
46. Rulli S. B., Zitta K., Calandra R. S., Campo S.: *Neuroendocrinology* 78, 280 (2003).
47. Reyes-del Valle J., del Angel R. M.: *J. Virol. Methods* 116, 95 (2004).
48. Eshaghi M., Tan W. S., Mohidin T. B. M., Yusoff K.: *Virus Res.* 106, 71 (2004).
49. Guarino L., Mistretta T.-A., Dong W.: *Virus Res.* 90, 187 (2002).
50. Sumi S., Arai K., Yoshida K.-I.: *J. Chromatogr.*, B 764, 445 (2001).
51. Zusman I.: *J. Chromatogr.*, B 715, 297 (1998).
52. Palombo G., De Falco S., Tortora M., Cassani G., Fassina G.: *J. Mol. Recognit.* 11, 243 (1998).
53. Fassina G., Verdoliva A., Palombo G., Ruvo M., Cassani G.: *J. Mol. Recognit.* 11, 128 (1998).
54. Palombo G., Verdoliva A., Fassina G.: *J. Chromatogr.*, B 715, 137 (1998).
55. Maňásková P., Liberda J., Tichá M., Jonáková V.: *J. Chromatogr.*, B 770, 137 (2002).
56. Kraus M., Tichá M., Jonáková V.: *J. Reprod. Immunol.* 51, 131 (2001).
57. Zhou S.: *J. Chromatogr.*, B 797, 63 (2003).
58. Demir Y., Alayli A., Demir N.: *Pharm. Biol.* 42, 434 (2004).
59. Lee W.-Ch., Lee K. L.: *Anal. Biochem.* 324, 1 (2004).
60. Fan X., She Y.-M., Bagshaw R. D., Callahan J. W., Schachter H., Mahuran D. J.: *Anal. Biochem.* 332, 178 (2004).
61. Geng M., Zhang X., Bina M., Regnier F.: *J. Chromatogr.*, B 752, 293 (2001).
62. Winzor D. J.: *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1010 (2003).
63. Hogg P. J., Jackson C., Winzor D. J.: *Anal. Biochem.* 192, 303 (1991).
64. Bergman D., Winzor D. J.: *Anal. Biochem.* 153, 380 (1986).
65. Winzor D. J., Munro P. D.: *J. Chromatogr.*, A 597, 57 (1992).
66. Kučerová Z., Tichá M.: *J. Chromatogr.*, B 770, 121 (2002).
67. Massolini G., Calleri E.: *J. Chromatogr.*, B 797, 255 (2003).
68. Robinson F. D., Moxley R. A., Jarrett H. W.: *J. Chromatogr.*, A 1024, 71 (2004).
69. Hervé F., d'Athis P., Tremblay D., Tillement J.-P., Barré J.: *J. Chromatogr.*, B 798, 283 (2003).
70. Liu Q., Wang H., Ng T. B.: *Peptides* 25, 7 (2004).
71. Geng M., Zhang X., Bina M., Regnier F.: *J. Chromatogr.*, B 752, 293 (2001).
72. Caron M., Sève A.-P., Bladier D., Joubert-Caron R.: *J. Chromatogr.*, B 715, 153 (1998).
73. Chattopadhyay A., Tian T., Kortum L., Hage D. S.: *J. Chromatogr.*, B 715, 183 (1998).
74. Kaliszán R.: *J. Chromatogr.*, B 715, 229 (1998).

**T. Vařilová** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague*): **Stationary Phases for Affinity Chromatography**

Stationary phases for affinity chromatography are reviewed. Attention is paid to the selection of supports (including new materials such as sol-gel derived materials, monolithic disks and imprinted polymers), their activation, method of immobilization and determination of immobilized ligands. Selected applications are summarized.

## STANOVENIE ARZÉNU V BIOLOGICKOM MATERIÁLI A VO VZORKÁCH ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA TECHNIKAMI ATÓMOVEJ ABSORPČNEJ SPEKTROMETRIE

INGRID HAGAROVÁ a MÁRIA ŽEMBERYOVÁ

*Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika  
hagarova@fns.uniba.sk*

Došlo 8.4.04, prijaté 23.6.04.

Kľúčové slová: arzén, technika elektrotermickej atomizácie, technika generovania hydridov, AAS

### Obsah

1. Úvod
2. Stanovenie arzénu technikou elektrotermickej atomizácie (ETAAS)
  - 2.1. Priama analýza tuhých vzoriek v ETAAS
3. Stanovenie arzénu technikou generovania hydridov (HGAAS)
4. Stanovenie arzénu technikou generovania hydridov s následnou atomizáciou hydridov v elektrotermickom atomizátore (HG-ETAAS)

### 1. Úvod

Arzén je toxický prvok, vyskytujúci sa väčšinou v ložiskách niektorých sulfidov kovov. Jeho koncentrácia v zemskej kôre sa odhaduje v priemere na  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  (cit.<sup>1</sup>).

Môže sa vyskytovať vo forme anorganických aj organických zlúčenín. V anorganických zlúčeninách sú prevládajúce oxidačné stupne +III a +V. V organických zlúčeninách ide predovšetkým o metylované formy.

Do životného prostredia sa dostáva jednak z prírodných zdrojov (vulkanická činnosť, zvetrávanie hornín), ale najmä z priemyselných činností (spaľovanie fosílnych palív, ťažba uhlia a nerastných surovín, výroba olova, medi). Koncentrácie arzénu zistené v okolí baní a závodov taviacich olovenú a medenú rudu sú niekoľkonásobne vyššie ako na územiach, kde nedošlo k výraznému zásahu ľudskej činnosti do životného prostredia. Obsah arzénu v prírodných vodách sa pohybuje medzi  $0,15\text{--}0,45 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ , pričom v minerálnych vodách môže byť tento obsah zvýšený až 50násobne a v termálnych vodách až 300násobne. Priemerný obsah arzénu v pôdach sa uvádza okolo  $7 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ . Obsah arzénu v atmosfére závisí od lokality, v ktorej je meraný. V mestách je to okolo  $20 \text{ ng m}^{-3}$  a na vidieku medzi  $1\text{--}10 \text{ ng m}^{-3}$  (cit.<sup>1</sup>). V literatúre možno nájsť tiež priemerný obsah arzénu zis-

tený v ľudských tkanivách a tekutinách, a to v obličkách  $0,01 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , v pečeni  $0,03 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , vo vlasoch  $0,1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , v mlieku  $0,5 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  a v krvnom sére  $1 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  (cit.<sup>2</sup>).

Arzén a jeho zlúčeniny našli značné využitie v mnohých oblastiach priemyslu, v poľnohospodárstve, ale aj v medicíne, či už ľudskej alebo veterinárnej. Treba si však uvedomiť, že aj tieto činnosti sú zdrojom arzénu, ktorý sa dostáva do životného prostredia, a tým aj do potravinového reťazca, čo môže mať v konečnom dôsledku dopad na ľudské zdravie. Toxicita arzénu závisí od chemických foriem a oxidačného stavu, v ktorom sa arzén nachádza. As(III) je toxickejší ako As(V) a metylované formy arzénu sú menej toxické ako anorganické soli<sup>3</sup>. Symptómy, ktoré sa prejavujú pri otrave arzénom možno rozdeliť na počiatkové, ktoré sú: podráždená sliznica, tráviace problémy a črevné poruchy, nespavosť, bolesť hlavy, nevoľnosť a zvracanie, závraty, malátnosť; a symptómy spojené s chronickým štádiom, ktoré sú: zápaly kože, trvalé tráviace problémy, asplatická anémia a poškodenie nervového systému, čo sa prejavuje okrem iného aj trpnutím končatín<sup>3</sup>. Mnohé práce poukazujú na to, že zlúčeniny arzénu pôsobia nielen toxicky, ale vykazujú aj karcinogénne, mutagénne a teratogénne účinky<sup>1</sup>.

Pre stanovenie arzénu možno použiť rôzne analytické metódy<sup>4</sup>, z ktorých k najpoužívanejším patria techniky atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS), a to technika generovania hydridov (HGAAS), technika elektrotermickej atomizácie (ETAAS) a v poslednom období aj spojenie techniky generovania hydridov s následnou atomizáciou hydridov v elektrotermickom atomizátore (HG-ETAAS).

### 2. Stanovenie arzénu technikou elektrotermickej atomizácie (ETAAS)

Elektrotermická atomizácia sa najčastejšie uskutočňuje v grafitovej kyvete. K stratám arzénu z grafitovej kyvety môže dôjsť pri relatívne nízkej teplote. Na jeho zadržanie v atomizátore v priebehu pyrolýzy je potrebná tzv. „modifikácia matrice“. Ide o postup úpravy matrice vzorky, ktorý po prvý krát použil Ediger<sup>5</sup> v roku 1975. Analyt, v tomto prípade arzén, ktorý je pôvodne prchavejší ako matrica, v ktorej sa nachádza, je chemicky a tým aj teplotne stabilizovaný a zadržovaný v atomizátore v priebehu pyrolýzy, pri ktorej dochádza k odstráneniu rušivej matrice. Prvým chemickým modifikátorom pri stanovení As technikou ETAAS použitým v uvedenej práci<sup>5</sup> bol dusičnan nikelnatý. Odvtedy bolo pre termickú stabilizáciu arzénu opísaných mnoho ďalších chemických modifikátorov. V poslednom období patrí k najčastejšie používaným paládium, najbežnejšie vo forme dusičnanu paládnateho<sup>6–8</sup>, ale možno sa stretnúť aj s použitím chloridu paládnateho<sup>8,9</sup>. Koloidné paládium bolo po prvý krát použité

ako modifikátor pri stanovení selénu<sup>10</sup>. Pri stanovení As, ale aj Sb a Pb v morskej vode použili koloidné paládium vo svojej práci Volynsky a spol.<sup>11</sup>. Rýchly teplotný program s konvenčne používaným teplotným programom pri použití paládia ako chemického modifikátora porovnal vo svojej práci Larsen<sup>12</sup>.

Zmesí paládia a niektorých ďalších kovov (Mg, Cu, Ni) patria tiež medzi často používané modifikátory a považujú sa za univerzálne chemické modifikátory pri stabilizácii As v mnohých typoch matric<sup>13,14</sup>. Zmes Pd a Mg umožňuje použiť teplotu termického rozkladu 1300 až 1400 °C (cit.<sup>15-17</sup>). Ďalšie chemické modifikátory, ako napr. Rh (cit.<sup>18</sup>), umožňujú použiť teplotu termického rozkladu 1450 °C. Deaker a Maher<sup>19</sup> zhodnotili vplyv jednoduchých modifikátorov (Pd, Cu a Ni) ako aj zmesných modifikátorov (Pd-Mg, Pd-Cu a Pd-Ni vo forme dusičnanov) na signál arzenu pri jeho stanovení v tkanivách morských živočíchov. Platina a vanád vo forme V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> boli použité ako modifikátory pri stanovení As technikou ETAAS v práci Tsaleva a spol.<sup>20</sup>. Styris a spol.<sup>21</sup> a Hirano a spol.<sup>22</sup> prispeli k objasneniu mechanizmu atomizácie As v prítomnosti paládia. Vplyv modifikátorov na stanovenie As v prostredí HCl bol študovaný v práci Pszonickiho a Dudeka<sup>23</sup>. Zmesný modifikátor Pd-Mg v prostredí vysokých koncentrácií síranu sodného a chloridu sodného použili Bermejo-Barrera a spol.<sup>24</sup>. Účinnosť Pd, Rh a Ru ako modifikátorov v ETAAS pri stanovení As, Se a In v prostredí síranu sodného porovnali Volynsky a Wennrich<sup>25</sup>. Účinnosť Pt a Ir pri tom istom stanovení porovnali uvedení autori v ďalšej práci<sup>26</sup>. Castro a spol.<sup>27</sup> porovnali Th, Zr a V ako chemické modifikátory pri atomizácii arzenu zo steny grafitovej kyvety a z platformy, pričom vzorky dávkovali klasickou kvapkovou metódou ako aj vo forme aerosolu. Mechanistickú štúdiu vplyvu vysokých obsahov Al na stanovenie As pri použití atomizácie zo steny elektrotermického atomizátora ako aj z platformy a dávkovanie vzorky oboma už spomenutými spôsobmi opisali Castro a Aller v ďalšej práci<sup>28</sup>. Zhodnotenie rôznych jednoduchých permanentných modifikátorov (Rh, Ir a Ru) ako aj ich zmesí s wolfrámom (W-Rh, W-Ir a W-Ru) pri stanovení As v pôdach, sedimentoch, kaloch, uhlí, popolčekoch a vodách uviedli vo svojej práci Lima a spol.<sup>29,30</sup>. Pre stanovenie As(III), As(V), Bi(III), Sb(III), Sb(V), Se(IV), Se(VI), Sn(IV) a Te(IV) ako aj pre niektoré alkylované druhy As a Sn testovali Tsalev a spol.<sup>31</sup> platformy upravené zmesou Ir-W a Ir-Zr. Wolfrám, ale aj NaNO<sub>3</sub> použili ako chemické modifikátory Väisänen a spol.<sup>32</sup>. Koncentrácie As vo vzorkách povrchových pôd stanovené po rozklade zmesou kyselín HCl-HNO<sub>3</sub>-HF sledovali Chen a spol.<sup>33</sup>. Rôzne extrakčné postupy pre stanovenie As, ale aj Cd a Cu v kontaminovaných pôdach porovnali Väisänen a Suontamo<sup>34</sup>. Porovnanie dvoch rozkladných postupov vzoriek rastlín s použitím rôznych zmesí kyselín s rozkladom po spopolnení vzoriek pred stanovením As a Se technikou ETAAS opisali vo svojej práci Vassileva a spol.<sup>35</sup>. Koncentrácie As, ale aj Cd, Pb a Ni stanovené vo vzorkách vzduchu po celkovom rozklade filtrov boli uvedené v práci Thomaidisa a spol.<sup>36</sup>. Priame stanovenie As

v moči, krvi a krvnom sére opisali Campillo a spol.<sup>37</sup>. Stanovenie As v tkanivách morských živočíchov uviedli Ybáñez a spol.<sup>38</sup>. V práci Tsaleva a spol.<sup>39</sup> bola študovaná termická stabilita niektorých prchavých prvkov (medzi nimi aj As) v rozkladoch biologických materiálov, v rozložených vlasoch a v zriedenom moči za použitia zmesných modifikátorov obsahujúcich wolfrám. Mikrovlnný rozklad použili pre stanovenie stopových prvkov (As, Hg, Zn, Pb a Se) v moči Horng a Lin<sup>40</sup>. Kildhal a Lund<sup>41</sup> stanovovali As a Sb vo víne analyzovanom priamo aj po rozklade so zmesou HNO<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Vo vodách, ale aj v iných typoch matric sa arzén často nachádza na nízkych koncentračných úrovniach, a preto je potrebné pred samotným stanovením zaradiť stupeň spojený s jeho nakoncentrovaním. Je možné použiť kvapalinovú extrakciu (LE), extrakciu tuhú fázou (SPE), spoluzrážanie alebo flotáciu. Extrakciu tuhú fázou za použitia diitiokarbamátovej polyuretánovej peny použili vo svojej práci Arpadjan a spol.<sup>42</sup> na prekoncentráciu stopových množstiev As, Bi, Hg, Sb, Se a Sn z vodných vzoriek pred ich stanovením ETAAS a atómovou emisnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou (ICP-AES). Meranie ETAAS bolo robené po rozpustení sorbovaných analytov v izobutylmetylketóne. Sella a spol.<sup>43</sup> použili ako prekoncentračnú techniku zrážanie s Fe(OH)<sub>3</sub> pre stanovenie As, Ag, Bi, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb a Tl v morskej vode. Zrážanie so slabokyslým roztokom obsahujúcim Ag<sup>+</sup> ióny použili González a spol.<sup>44</sup> pre nakoncentrovanie As z rozložených vzoriek pšeničnej múky.

## 2.1. Priama analýza tuhých vzoriek v ETAAS

Pri väčšine analytických techník je potrebné pri analýze tuhých vzoriek použiť pred samotným stanovením rozklad. Rozklad vo väčšine prípadov kyselinou alebo určitou zmesou kyselín však vedie k zvýšenému riziku strát analytu počas rozkladu alebo k zvýšenému riziku kontaminácie. Rozklad je častokrát jeden z časovo najnáročnejších stupňov celého analytického postupu. V niektorých prípadoch použitie náročných rozkladných postupov vedie k vysokým hodnotám slepých pokusov.

Techniky umožňujúce stanovenie stopových obsahov priamo v tuhých vzorkách majú niekoľko výhod oproti bežne používaným postupom: 1) zjednodušenie predúpravy vzorky (kratší čas, menej náročný postup); 2) zníženie rizika kontaminácie (malý objem použitých činidiel a krátky čas „pobytu“ vzorky v prostredí laboratória); 3) minimalizácia strát analytu spôsobených postupmi použitými pri predúprave vzorky alebo nedokonalým uvoľnením analytu z matrice vzorky; 4) nepoužívanie nebezpečných a korozívnych činidiel; 5) možnosť analyzovať anorganické aj organické vzorky<sup>45</sup>.

Ak hovoríme o analýze tuhých vzoriek v ETAAS, musíme rozlišovať tzv. „slurry sampling“ (SL-ETAAS), kde ide o dávkovanie suspenzií tuhých vzoriek do elektrotermického atomizátora a „solid sampling“ (SS-ETAAS), kde sa tuhá vzorka navažuje na určitú podložku, ktorá sa vkladá do elektrotermického atomizátora. Výhody aj nevý-

hody obidvoch spôsobov dávkovania sú podrobne opísané v prehľadných článkoch venovaných atómovej spektrometrii<sup>45–48</sup>.

„Solid sampling“ bolo po prvý krát použité v komerčne dostupnom atomizátore v roku 1971 (cit.<sup>49</sup>), odvtedy sa prednostne používa na analýzu materiálov, ktoré nevytvárajú vhodné suspenzie a nie je ich možné dostupnými postupmi rozložiť. Ako príklad možno uviesť zliatiny niklu<sup>50</sup>. S uvedenou technikou sa však možno stretnúť aj pri analýze biologických vzoriek<sup>51,52</sup>, anorganických vzoriek<sup>53</sup>, geologických materiálov<sup>54</sup>, rastlín a pôd<sup>55</sup>, sedimentov<sup>56</sup>, ale aj morskej vody po prekoncentracii As s 8-hydroxychinolínom<sup>57</sup> alebo po vyzrážaní s Ni-pyrolidinditiokarbamátom<sup>58</sup>.

Dávkovanie suspenzie (slurry sampling) bolo po prvý krát uvedené v roku 1974 (cit.<sup>59,60</sup>). Keďže spája výhody priamej analýzy tuhých vzoriek s výhodami kvapalného dávkovania, jej popularita postupne narastá<sup>47</sup>. V poslednom období bola SL-ETAAS použitá pri stanovení As v detskej výžive<sup>61</sup>, pričom sa ako chemické modifikátory porovnali Mg, Ni a Pd. Pri stanovení As v pive<sup>62</sup> bol použitý ako modifikátor dusičnan nikelnatý sám, alebo v kombinácii s kyselinou askorbovou. Rovnaký zmesný modifikátor Pd-Mg použili pri stanovení As technikou SL-ETAAS v rastlinách<sup>63</sup>, v tkanivách morských živočíchov<sup>64</sup>, v riečnych sedimentoch<sup>65</sup>, v morských sedimentoch<sup>66</sup>, ale aj v kontaminovaných sedimentoch a pôdach<sup>67</sup>. Ďalší zmesný modifikátor W-Rh pri stanovení As v sedimentoch a pôdach použili Barbosa a spol.<sup>68</sup>. Skúšku rýchleho teplotného programu pri analýze rovnakých matric uvádzajú Hoeng a Cilissen<sup>69</sup>. Stanovenie As, ale aj Sb v pôdach a sedimentoch použijúc SL-ETAAS opisali aj López-García a spol.<sup>70</sup>. Stanovenie As v prírodných vodách po jeho nakoncentrovaní na aktívnom uhlí opisali Kubota a spol.<sup>71</sup>. Viñas a spol.<sup>72</sup> navrhli postupy pre stanovenie As, Cd a Pb technikou SL-ETAAS v potravinárskych farbivách.

### 3. Stanovenie arzénu technikou generovania hydridov (HGAAS)

Technika generovania hydridov bola prvý krát opísaná Holakom v roku 1969 (cit.<sup>73</sup>). Vyznačuje sa pomerne vysokou citlivosťou a jednoduchou inštrumentáciou. Je založená na tvorbe kovalentného hydridu, ktorý je z roztoku analyzovanej vzorky vedený do atomizátora (najčastejšie kremenná kvveta). Z mnohých techník je pre generovanie prchavých hydridov najpoužívanejšia redukcia s NaBH<sub>4</sub>, o čom svedčia prehľadné články Nakaharu<sup>74</sup>, Campella<sup>75</sup> a Yana a Nia<sup>76</sup>. Hydrid vzniká v zmesi okysleného roztoku analytu s alkalickým roztokom NaBH<sub>4</sub>. Arzenovodík vzniká z obidvoch iónových foriem arzénu (As(III) aj As(V)), avšak z As (III) vzniká rýchlejšie. Preto sa odporúča zredukovať As(V) na As(III), pričom sa používajú rôzne redukčné roztoky ako aj rôzne postupy. K najpoužívanejším patrí redukcia s KI a kyselinou askor-

bovou. Štúdium tvorby hydridov As, ale aj Sb a Se, bolo opísané v práci Narsita a spol.<sup>77</sup>.

Separácia analytu od matrice znižuje riziko interferencií, čo je hlavnou výhodou HGAAS (cit.<sup>78,79</sup>). Problémom v uvedenom systéme však ostávajú interferencie kovov skupín VIII.B a I.B periodického systému<sup>80–83</sup> a vzájomné interferencie hydridotvorných prvkov<sup>84–90</sup>. Štúdium vplyvu kademnatých a zinočnatých solí na stanovenie As, ale aj Sb, Bi, Se, Sn, Te a Hg bolo opísané v práci Alexandrova a spol.<sup>91</sup>.

Existujú dva spôsoby generovania hydridov, a to priamy prenos, alebo kolekcia. Pri priamom prenose, pri ktorom je hydrid uvoľnený z kvapalnej fázy a prúdom nosného plynu je vedený do atomizátora, môže byť usporiadanie kontinuálne prietokové (HG-cont.-AAS), môže ísť o dávkovanie vzorky do prúdu kyseliny alebo NaBH<sub>4</sub> (prútokové injekčné dávkovanie FI-HGAAS), alebo možno použiť zredukované obmedzeného objemu vzorky v dávkovom generátore (HG-batch-AAS). HG-cont.-AAS a HG-batch-AAS porovnali Ay a Henden<sup>92</sup> pri štúdiu interferencií niektorých kovov (Ni, Au, Pd a Cr) ako aj vzájomných interferencií As a Sb pri tvorbe hydridov aj pri ich atomizácii. HG-cont.-AAS použili pre stanovenie As v moči po predchádzajúcom rozklade s HNO<sub>3</sub> v termostatovanom mineralizačnom bloku Ruiz-Navarro a spol.<sup>93</sup>. Tento postup porovnali s mikrovlnným rozkladom. Mikrovlnný rozklad bol použitý pri stanovení As v moči technikou HGAAS aj v ďalšej práci<sup>94</sup>, pri stanovení As v rastlinách<sup>95</sup>, pri stanovení As v tkanivách morských živočíchov<sup>96</sup> aj pri stanovení As v pôdach a sedimentoch<sup>97</sup>. Rôzne rozkladné postupy a rôzne zmesi kyselín pre vzorky vlasov pri stanovení As technikou HG-batch-AAS porovnali de Moraes Flores a spol.<sup>98,99</sup>. Na odstránenie interferencií spôsobených prchavými oxidmi dusíka použili kyselinu amidosírovú. Rôzne rozkladné postupy biologických materiálov pred samotným stanovením As a Se technikou HG-cont.-AAS opísal Rejnek<sup>100</sup>.

V poslednom období k najčastejšie používaným technikám HGAAS patrí dávkovanie vzorky do prúdu kyseliny alebo NaBH<sub>4</sub>, hovoríme o tzv. prietokovej injekčnej analýze (FIA). FI-HGAAS použili pre stanovenie As v kontaminovaných vodách Chatterjee a spol.<sup>101</sup>, v kontaminovaných vodách a v rôznych kontaminovaných biologických materiáloch (vlasy, nechty, moč, koža, krv) Das a spol.<sup>102</sup> a Samanta a spol.<sup>103</sup>. Stanovenie As v prostredí s vysokým obsahom Cu, Pb, Fe a Ni opisali Schmidt a Bahadur<sup>104</sup>. Rôzne rozkladné postupy pre vzorky rastlín pre stanovenie As a Sb porovnali a zhodnotili Krachler a spol.<sup>105–111</sup>. FI-HGAAS použili pre stanovenie As, Sb a Se vo vodách s vysokým obsahom železa Näykki a spol.<sup>112</sup>. Na elimináciu jeho vplyvu použili tiomočovinu, L-cysteín a roztok obsahujúci KI a kyselinu askorbovú. Mikrovlnný rozklad organozlúčenín As, ale aj Se a Hg, nachádzajúcich sa vo vodách použili pred samotným stanovením FI-HGAAS Harzdorf a spol.<sup>113</sup>. Prehľadný článok o používaní mikrovlnného rozkladu v prietokovej injekčnej analýze poskytli Burguerovci<sup>114</sup>. Päť rôznych mikrovlnných rozkladných postupov pre sedimenty použili pri stanovení As a Se

v sedimentoch Zhou a spol.<sup>115</sup>. Ako príklad alkalického rozkladu pôd s NaOBr pre stanovenie As a Se možno uviesť prácu Zhua a Tabatabaia<sup>116</sup>. On-line spojenie mikrovlnného rozkladu s technikou FI-HGAAS opísali pri stanovení As v moči a termálnych vodách Burguera a spol.<sup>117</sup> a v moči López-González a spol.<sup>118</sup>. Pre rozklad organických zlúčenín As a Sn opísali on-line spojenie UV-fotooxidácie a FI-HGAAS Tsalev a spol.<sup>119</sup>. Kremenná kveta potiahnutá volfrámovou fóliou pre stanovenie As vo vodách, sedimentoch aj biologických materiáloch technikou FI-HGAAS bola opísaná v práci Ribeira a spol.<sup>120</sup>. Stanovenie As vo vodách po nakoncentrovaní na aktivovanom Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> opísali Karthikeyan a spol.<sup>121</sup>.

Pri použití kolekcie je hydrid zhromaždený v kolektore, ktorý je súčasťou generátora. Prevedenie hydridu do atomizátora prebehne v jednom stupni až po skončení jeho uvoľňovania z roztoku. Kolekcia môže byť tlaková<sup>122</sup> alebo vymrazovaním<sup>123,124</sup>. On-line spojenie mikrovlnného rozkladu s vymrazovaním (FI-HG-cryo trapping-AAS) pri stanovení As vo vodách opísali Burguera a spol.<sup>125</sup>. Kolekciu vymrazovaním použili pri stanovení As po jeho derivatizácii s rôznymi komplexnými zlúčeninami obsahujúcimi síru aj Howard a Salou<sup>126</sup> a pri stanovení As v moči použili Ng a spol.<sup>127</sup>.

Hlavnou technikou, ktorá využíva dávkovanie suspenzie je ETAAS, no možno sa stretnúť s použitím suspenzie vzoriek aj v HGAAS. Medzi prvých, ktorí použili dávkovanie suspenzie pre stanovenie As technikou HGAAS patria Haswell a spol.<sup>128</sup>. Nerin a spol.<sup>129</sup> stanovovali As v popolčkoch používajúc techniku „SL-HG-batch-AAS“ bez úpravy suspenzie vzoriek. Pri stanovení As v tabaku<sup>130</sup> a v sedimentoch<sup>131</sup> bola použitá SL-HG-batch-AAS, ale s úpravou suspenzie vzoriek mikrovlnným zahrievaním. Hoci sa prednostne používa spojenie prietokovej injekčnej analýzy s HGAAS, doteraz bola opísaná iba jedna práca, ktorá sa venuje stanoveniu As v pôdach používajúc techniku „FI-SL-HGAAS“, pričom aj v tomto prípade boli suspenzie vzorky upravované mikrovlnným zahrievaním<sup>132</sup>.

#### 4. Stanovenie arzénu technikou generovania hydridov s následnou atomizáciou hydridov v elektrotermickom atomizátore (HG-ETAAS)

Elektrotermické atomizátory sú používané pre atomizáciu hydridov takmer od uvedenia hydridovej techniky. Sú tri možnosti ich použitia, a to *in situ* zachytenie hydridov, ktoré využíva elektrotermický atomizátor pre zber hydridu aj pre jeho atomizáciu<sup>133–135</sup>, on-line atomizácia<sup>136–138</sup> a atomizácia z absorpčných roztokov obsahujúcich zachytené hydridy<sup>139</sup>. *In situ* zber a nakoncentrovanie hydridu zlepšuje detekčné limity oproti priamemu zavedeniu hydridu do atomizátora<sup>140</sup>. Podmienky pre simultánne stanovenie As a Se technikou HGAAS s *in situ* zachytením hydridov a ich atomizáciou v grafitovej kvete pokrytej zirkónom opísali Gabros a spol.<sup>141</sup>. Účinnosť tvorby hydridov As, Sb a Se, *in situ* zachytenia uvedených hydridov v grafitovej

kyvete a použitie Pd ako chemického modifikátora je opísané v práci Dočekala a spol.<sup>142</sup>. Tsalev a spol.<sup>143</sup> použili vo svojej práci platformy potiahnuté zmesnými modifikátormi Ir-W a Ir-Zr pri stanovení väčšiny hydridotvorných prvkov pri použití FI-HG-ETAAS ako aj pri ETAAS. Pri stanovení As vo vodách použili tvorbu hydridu a následnú elektrotermickú atomizáciu na paládiom pokrytých platformách Liang a spol.<sup>144</sup>. *In situ* prekoncentráciu a stanovenie As vo vzorkách rastlín technikou HG-ETAAS so zmesným modifikátorom Pd-Zr opísali Yang a Zhang<sup>145</sup>. Stanovenie As, Sb, Se a Sn v pive a slade technikou HG-ETAAS s *in situ* nakoncentrovaním hydridov v Pd pokrytej grafitovej kvete opísali Matusiewicz a Mikołajczak<sup>146</sup>. Stanovenie As vo vodách po jeho nakoncentrovaní používajúc kvapalinovú extrakciu opísali Chamsaz a spol.<sup>147</sup>. Grafitové kyvety pokryté Ir použili Murphy a spol.<sup>148</sup> a pokryté Ir a Rh da Silva a spol.<sup>149</sup>. Mikrovlnný rozklad pre organické zlúčeniny arzénu a následné stanovenie celkového arzénu vo vodách, biologických vzorkách a sedimentoch s použitím FI-HG-ETAAS opísali Ringmann a spol.<sup>150</sup>. Vplyv vysokých koncentrácií chloridu sodného na stanovenie As a Se v HG-ETAAS študovali Ellis a spol.<sup>151</sup>. Optimalizáciu rôznych parametrov pri stanovení As, Cd, Sb a Se vo vodách technikou HG-ETAAS opísali Moreda-Piñeiro a spol.<sup>152</sup>. Dusičnan horečnatý, dusičnan paládnatý a dusičnan nikelnatý porovnali vo svojej práci Niedzelski a spol.<sup>153</sup> pri stanovení As, Sb a Se v ETAAS, ale aj v spojení HG-ETAAS.

K najnovším spojeniam techník AAS patrí tvorba hydridu zo suspenzie vzoriek s následnou atomizáciou hydridov v grafitovej kvete (SL-HG-ETAAS). Zatiaľ bolo opísaných iba pár prác venovaných optimalizácii stanovenia As uvedenou technikou. Moreda-Piñeiro a spol. stanovovali As, Bi, Ge, Hg a Se v popolčkoch<sup>154</sup> a As, Bi, a Se v morských sedimentoch, pôdach a uhlí<sup>155</sup>. Stanovenie As v suspenziách vzoriek sedimentov a popolčkov technikou SL-HG-ETAAS, pričom hydridy boli zachytené v grafitových kvetách potiahnutých Ir opísali aj Vieira a spol.<sup>156</sup>. SL-HG-ETAAS použili tiež Matusiewicz a Mroczkowska pre stanovenie As v rôznych environmentálnych aj biologických vzorkách<sup>157</sup>.

#### LITERATÚRA

1. Léonard A., v knihe: *Metals and Their Compounds in the Environment* (Merian E., ed.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991.
2. Ward N. I., v knihe: *Environmental Analytical Chemistry* (Fifield F. W., Haines P.J., ed). Blackie Academic and Professional, Glasgow 1996.
3. Kafka Z., Punčochářová J.: Chem. Listy 96, 611 (2002).
4. Száková J., Mader P.: Chem. Listy 88, 164 (1994).
5. Ediger R. D.: At. Absorpt. Newslett. 14, 127 (1975).
6. Tsalev D. L., Tserovski E. I., Raitcheva A. G., Barzev A. I., Georgieva R. G., Zaprianov Z. K.: Spectrosc. Lett. 26, 331 (1993).

7. Slaveykova V. I., Rastegar F., Leroy M. J. F.: *J. Anal. At. Spectrom.* *11*, 997 (1996).
8. Cabon J. Y.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* *367*, 714 (2000).
9. Rettberg T. M., Beach L. M.: *J. Anal. At. Spectrom.* *4*, 427 (1989).
10. Volynsky A. B., Krivan V.: *J. Anal. At. Spectrom.* *11*, 159 (1996).
11. Volynsky A. B., Akman S., Dogan C. E., Koklu U.: *Spectrochim. Acta, Part B* *56*, 2361 (2001).
12. Larsen E. H.: *J. Anal. At. Spectrom.* *6*, 375 (1991).
13. Shan X., Ni Z., Zhang L.: *Anal. Chim. Acta* *151*, 179 (1983).
14. Shan X., Ni Z., Zhang L.: *At. Spectrosc.* *5*, 1 (1984).
15. Welz B., Schlemmer G., Mudakavi J. R.: *J. Anal. At. Spectrom.* *3*, 93 (1988).
16. Welz B., Schlemmer G., Mudakavi J. R.: *J. Anal. At. Spectrom.* *3*, 695 (1988).
17. Welz B., Schlemmer G., Mudakavi J. R.: *J. Anal. At. Spectrom.* *7*, 1257 (1992).
18. Bulska E., Jedral W.: *J. Anal. At. Spectrom.* *7*, 1257 (1992).
19. Deaker M., Maher W.: *J. Anal. At. Spectrom.* *14*, 1193 (1999).
20. Tsalev D. L., Dimitrov T. A., Mandjukov P. B.: *J. Anal. At. Spectrom.* *5*, 189 (1990).
21. Styris D. L., Prell L. J., Redfield D. A.: *Anal. Chem.* *63*, 503 (1991).
22. Hirano Y., Yasuda K., Hirorawa K.: *Anal. Sci.* *10*, 481 (1994).
23. Pszonicki L., Dudek J.: *J. Anal. At. Spectrom.* *14*, 1755 (1999).
24. Bermejo-Barrera P., Moreda-Piñeiro J., Moreda-Piñeiro A., Bermejo-Barrera A.: *J. Anal. At. Spectrom.* *13*, 777 (1998).
25. Volynsky B., Wennrich R.: *J. Anal. At. Spectrom.* *16*, 179 (2001).
26. Volynsky B., Wennrich R.: *Talanta* *59*, 277 (2003).
27. Castro M. A., García-Olalla C., Robles L. C., Aller A. J.: *Spectrochim. Acta, Part B* *57*, 1 (2002).
28. Castro M. A., Aller A. J.: *Spectrochim. Acta, Part B* *58*, 901 (2003).
29. Lima É. C., Barbosa R. V., Brasil J. L., Santos A. H. D. P.: *J. Anal. At. Spectrom.* *17*, 1523 (2002).
30. Lima É. C., Brasil J. L., Vaghetti J. C. P.: *Talanta* *60*, 103 (2003).
31. Tsalev D. M., D'Ulivo A., Lampugnani I.: *J. Anal. At. Spectrom.* *11*, 979 (1996).
32. Väisänen A., Suontamo R., Rintala J.: *J. Anal. At. Spectrom.* *16*, 533 (2001).
33. Chen M., Ma L. Q., Harris W. G.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* *66*, 632 (2002).
34. Väisänen A., Suontamo R.: *J. Anal. At. Spectrom.* *17*, 739 (2002).
35. Vassileva E., Dočekalová H., Baeten H., Vanhentenrijk S., Hoenig M.: *Talanta* *54*, 187 (2001).
36. Thomaidis S. N., Bakeas E. B., Siskos P. A.: *Chemosphere* *52*, 959 (2003).
37. Campillo N., Viñas P., López-Garúa I., Hernández-Córdoba M.: *Analyst* *125*, 313 (2000).
38. Ybáñez N., Cervera M. L., Montoro R., de la Guardia M.: *J. Anal. At. Spectrom.* *6*, 379 (1991).
39. Tsalev D. L., Slaveykova V. I., Georgieva R. B.: *Anal. Lett.* *29*, 73 (1996).
40. Horng C. J., Llin S. R.: *Talanta* *45*, 75 (1997).
41. Kildhal B. T., Lund W.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* *345*, 93 (1996).
42. Arpadjan S., Vuchkova L., Kostadinova E.: *Analyst* *122*, 243 (1997).
43. Sella S., Sturgeon R. E., Willie S. N., Campos R. C.: *J. Anal. At. Spectrom.* *12*, 1281 (1997).
44. González M. M., Gallego M., Varcácel M.: *Talanta* *55*, 135 (2001).
45. Cal-Prieto M. J., Felipe-Sotelo M., Carlosena A., Andrade J. M., López-Mahía P., Muniategui S., Prada D.: *Talanta* *56*, 1 (2002).
46. de Benzo Z. A., Velosa M., Ceccarelli C., de la Guardia M., Salvador A.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* *339*, 235 (1991).
47. Bendicho C., de Loos-Vollebregt M. T. C.: *J. Anal. At. Spectrom.* *6*, 353 (1991).
48. Hill S. J., Chenery S., Dawson J. B., Evans E. H., Fisher A., Price W. J., Smith C. M. M., Sutton K. L., Tyson J. F.: *J. Anal. At. Spectrom.* *15*, 769 (2000).
49. Kerber J. D.: *At. Spectrosc.* *10*, 104 (1971).
50. Headridge J. B., Riddington I. M.: *Analyst* *109*, 113 (1984).
51. Atsuya I., Itoh K., Akatsuka K.: *Fresenius' Z. Anal. Chem.* *328*, 338 (1987).
52. Atsuya I., Itoh K., Akatsuka K., Jin K.: *Fresenius' Z. Anal. Chem.* *326*, 53 (1987).
53. Esser P.: *Fresenius' Z. Anal. Chem.* *322*, 677 (1985).
54. de Kersabiec A. M., Benedetti M. F.: *Fresenius' Z. Anal. Chem.* *328*, 342 (1987).
55. Völlkopf U., Grobowski Z., Tamm R., Welz B.: *Analyst* *110*, 573 (1985).
56. Sahuquillo A., Rauret G., Rehnert A., Muntau H.: *Anal. Chim. Acta* *476*, 15 (2003).
57. Akatsuka K., Atsuya I.: *Fresenius' Z. Anal. Chem.* *329*, 453 (1987).
58. Zhang Q., Minami H., Inoue S., Atsuya I.: *Anal. Chim. Acta* *508*, 99 (2004).
59. Brady D. V., Montalvo J. G., Jung J., Curran R. A.: *At. Absorpt. Newslett.* *13*, 118 (1974).
60. Brady D. V., Montalvo J. G., Glowacki G., Pisciotta A.: *Anal. Chim. Acta* *70*, 448 (1974).
61. Viñas P., Pardo-Martínez M., Hernández-Córdoba M.: *J. Anal. At. Spectrom.* *14*, 1215 (1999).
62. Cervera M. L., Navarro A., Montoro R., de la Guardia M., Salvador A.: *J. Anal. At. Spectrom.* *6*, 477 (1991).
63. Kukier U., Summer M. E., Miller W. P.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* *25*, 1149 (1994).
64. Santos C., Alava-Moreno F., Lavilla I., Bendicho C.: *J. Anal. At. Spectrom.* *15*, 987 (2000).
65. van den Akker A. H., van den Heuvel H.: *At.*

- Spectrosc. 13, 72 (1992).
66. Bermejo-Barrera P., Barciela-Alonso M. C., Moreda-Piñeiro A., González-Sixto C., Bermejo-Barrera A.: Spectrochim. Acta, Part B 51, 1235 (1996).
  67. Klemm W., Bombach G.: Fresenius' J. Anal. Chem. 353, 12 (1995).
  68. Barbosa F., Lima É. C., Krug F. J.: Analyst 125, 2079 (2000).
  69. Hoenig M., Cilissen A.: Spectrochim. Acta, Part B 48, 1003 (1993).
  70. López-García I., Sánchez-Merlos M., Hernández-Córdoba M.: Spectrochim. Acta, Part B 52, 437 (1997).
  71. Kubota T., Yamaguchi T., Okutani T.: Talanta 46, 1311 (1998).
  72. Viñas P., Pardo-Martínez M., López-García I., Hernández-Córdoba M.: J. Anal. At. Spectrom. 16, 1202 (2001).
  73. Holak W.: Anal. Chem. 41, 1712 (1969).
  74. Nakahara T.: Anal. At. Spectrosc. 6, 163 (1983).
  75. Campbell A. D.: Pure Appl. Chem. 64, 227 (1992).
  76. Yan X. P., Ni Z. M.: Anal. Chim. Acta 291, 89 (1994).
  77. Narsito X., Agterdenbos J., Santosa S.: Anal. Chim. Acta 237, 189 (1990).
  78. Tsalev D. L.: Spectrochim. Acta, Part B 55, 917 (2000).
  79. Smichowski P., Fariás S.: Microchem. J. 67, 147 (2000).
  80. Welz B., Melcher M.: Analyst 109, 569 (1984).
  81. Welz B., Melcher M.: Anal. Chim. Acta 153, 297 (1983).
  82. Welz B., Schubert-Jacobs M.: J. Anal. At. Spectrom. 1, 23 (1986).
  83. Bax D., Agterdenbos J., Worrell E., Beneken-Kolmer J.: Spectrochim. Acta, Part B 43, 1349 (1988).
  84. Verlinden M., Deelstra H.: Fresenius' J. Anal. Chem. 296, 253 (1979).
  85. Dédina J.: Anal. Chem. 54, 2059 (1982).
  86. Walcerz M., Bulska E., Hulanicki A.: Fresenius' J. Anal. Chem. 346, 622 (1993).
  87. Krakovská E., Mackových D.: Chem. Pap. 50, 121 (1996).
  88. de la Calle-Guntiñas M. B., Torralba R., Madrid Y., Palacios M. A., Bonilla M., Cámara C.: Spectrochim. Acta, Part B 47, 1165 (1992).
  89. Welz B., Melcher M.: Anal. Chim. Acta 131, 17 (1981).
  90. Erdem N., Henden E.: Anal. Chim. Acta 505, 59 (2004).
  91. Alexandrov S., Gafur I., Mandjukov P., Nedeltchev O.: Fresenius' J. Anal. Chem. 347, 303 (1993).
  92. Ay Ü., Henden E.: Spectrochim. Acta, Part B 55, 951 (2000).
  93. Ruiz-Navarro M. L., Navarro-Alarcón M., Lopez H., de la Serrana G., Pérez-Valero V., López-Martínez M. C.: Sci. Total Environ. 216, 55 (1998).
  94. López-González M. A., Gómez M. M., Cámara C., Palacios M. A.: Mikrochim. Acta 120, 301 (1995).
  95. Navarro M., López M. C., López H., Sánchez M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 75, 1029 (1992).
  96. Navarro M., López H., Sánchez M., López M. C.: J. Anal. Toxicol. 16, 169 (1992).
  97. Navarro M., Sánchez M., López H., López M. C.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50, 356 (1993).
  98. de Moraes Flores É. M., Cirne da Silva L. L., Barin J. S., Fleig Saidelles P. F., Zanella R., Dressler V. L., Paniz J. N. G.: Spectrochim. Acta, Part B 56, 1883 (2001).
  99. de Moraes Flores É. M., Fleig Saidelles A. P., Barin J. S., Mortari S. R., Martins A. F.: J. Anal. At. Spectrom. 16, 1419 (2001).
  100. Rejnek J.: Chem. Listy 96, 1010 (2002).
  101. Chatterjee A., Das D., Mandal B. K., Chowdhury T. R., Samanta G., Chakraborti D.: Analyst 120, 643 (1995).
  102. Das D., Chatterjee A., Mandal B. K., Samanta G., Chakraborti D., Chana B.: Analyst 120, 917 (1995).
  103. Samanta G., Chowdhury T. R., Mandal B. K., Biswas B. K., Chowdhury U. K., Basu G. K., Chanda C. R., Lodh D., Chakraborti D.: Microchem. J. 62, 174 (1999).
  104. Schmidt C., Bahadir M.: Fresenius' J. Anal. Chem. 346, 683 (1993).
  105. Krachler M., Burow M., Emons H.: Analyst 124, 777 (1999).
  106. Krachler M., Burow M., Emons H.: Analyst 124, 923 (1999).
  107. Krachler M., Burow M., Emons H.: J. Environ. Monit. 1, 477 (1999).
  108. Krachler M., Emons H.: Fresenius' J. Anal. Chem. 368, 702 (2000).
  109. Krachler M., Emons H.: J. Anal. At. Spectrom. 15, 281 (2000).
  110. Krachler M., Shotyk W., Emons H.: Anal. Chim. Acta 432, 303 (2001).
  111. Krachler M., Emons H., Barbante C., Cozzi G., Cescon P., Shotyk W.: Anal. Chim. Acta 458, 387 (2002).
  112. Näykki T., Perämäki P., Kujala J., Mikkonen A.: Anal. Chim. Acta 439, 229 (2001).
  113. Harzdorf C., Jansen G., Rinne D., Rogge M.: Anal. Chim. Acta 374, 209 (1998).
  114. Burguera M., Burguera J. L.: Anal. Chim. Acta 366, 63 (1998).
  115. Zhou C. Y., Wong M. K., Koh L. L., Wee Y. C.: Mikrochim. Acta 127, 77 (1997).
  116. Zhu B., Tabatabai M. A.: Soil Sci. Soc. Am. J. 59, 1564 (1995).
  117. Burguera J. L., Burguera M., Danet A. F.: Rev. Roum. Chim. 43, 301 (1998).
  118. López-González M. A., Gómez M. M., Cámara C., Palacios M. A.: Mikrochim. Acta 120, 301 (1995).
  119. Tsalev D. L., Sperling M., Welz B.: Spectrochim. Acta, Part B 55, 339 (2000).
  120. Ribeiro A. S., Zezii Aruda M. A., Cadore S.: J. Anal.

- At. Spectrom. 17, 1516 (2002).
121. Karthikeyan S., Prasada R. T., Iyer C. S. P.: *Talanta* 49, 523 (1999).
  122. Zhang B. G., Wang Y., Wang X. S., Chen X. L., Feng J. X.: *Talanta* 42, 1095 (1995).
  123. Masscheleyn P. H., Delaune R. D., Patrick W. H.: *J. Environ. Qual.* 20, 96 (1991).
  124. Howard A. G., Comber S. D. W.: *Mikrochim. Acta* 109, 27 (1992).
  125. Burguera J. L., Burguera M., Rivas C., Carrero P.: *Talanta* 45, 431 (1998).
  126. Howard A. G., Salou C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 13, 683 (1998).
  127. Ng J. C., Johnson D., Imray P., Chiswell B., Moore M. R.: *Analyst* 123, 929 (1998).
  128. Haswell S. J., Mendham J., Blutler M. J., Smith D. C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 3, 731 (1988).
  129. Nerin C., Zufiaurre R., Cacho J.: *Mikrochim. Acta* 108, 241 (1992).
  130. Mierzwa J., Adeloju S. B., Dhinsda H. S.: *Analyst* 122, 539 (1997).
  131. Mierzwa J., Dobrowolski R.: *Spectrochim. Acta, Part B* 53, 117 (1998).
  132. Gürleyük H., Tyson J. F., Uden P. C.: *Spectrochim. Acta, Part B* 55, 935 (2000).
  133. Dědina J.: *Prog. Anal. Spectrosc.* 11, 251 (1988).
  134. Branch C. H., Hutchinson D.: *Analyst* 110, 163 (1985).
  135. Sturgeon R. E., Willie S. N., Sproule G. I., Berman S. S.: *J. Anal. At. Spectrom.* 2, 719 (1987).
  136. Dittrich K., Mandry R.: *Analyst* 111, 269 (1986).
  137. Dittrich K., Mandry R.: *Analyst* 111, 277 (1986).
  138. Sperling M., Yin X. F., Welz B.: *Spectrochim. Acta, Part B* 46, 1789 (1991).
  139. Fišera M., Hladký Z., Ríšová J.: *Chem. Pap.* 50, 8 (1996).
  140. Matusiewicz H., Sturgeon R. E.: *Spectrochim. Acta, Part B* 51, 377 (1996).
  141. Gabros S., Walcerz M., Bulska E., Hulanicki A.: *Spectrochim. Acta, Part B* 50, 1669 (1995).
  142. Dočekal B., Dědina J., Krivan V.: *Spectrochim. Acta, Part B* 52, 787, (1997).
  143. Tsalev D. L., D'Ulivo A., Lampugnani L., di Marco M., Zamboni R.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 979 (1996).
  144. Liang L., Lazoff S., Chan C., Horvat M., Woods J. S.: *Talanta* 47, 569 (1998).
  145. Yang L. L., Zhang D. Q.: *Anal. Chim. Acta* 491, 91 (2003).
  146. Matusiewicz H., Mikołajczak M.: *J. Anal. At. Spectrom.* 16, 652 (2001).
  147. Chamsaz M., Arbab-Zavar M. H., Nazari S.: *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 1279 (2003).
  148. Murphy J., Schlemmer G., Shuttler I., Hill S. J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 1593 (1999).
  149. da Silva J. B. B., Giacomelli M. B., de Souza I. G., Curtius A. J.: *Microchem. J.* 60, 249 (1998).
  150. Ringmann S., Boch K., Marquardt W., Schuster M., Schlemmer G., Kainrath P.: *Anal. Chim. Acta* 425, 207 (2002).
  151. Ellis R. I., Sundin N. G., Tyson J. F., McInthosh S. A., Hanna C. P., Carnrick G.: *Analyst* 123, 1697 (1998).
  152. Moreda-Piñeiro J., Moscoso-Pérez C., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Fernández-Fernández E., Prada-Rodríguez D.: *Talanta* 53, 871 (2001).
  153. Niedzelski P., Siepak M., Siepak J.: *Microchem. J.* 72, 137 (2002).
  154. Moreda-Piñeiro J., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Fernández-Fernández E.: *Spectrochim. Acta, Part B* 57, 883 (2002).
  155. Moreda-Piñeiro J., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Fernández-Fernández E., Prada-Rodríguez D.: *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 721 (2002).
  156. Vieira M. A., Welz B., Curtius A.J.: *Spectrochim. Acta, Part B* 57, 2057 (2002).
  157. Matusiewicz H., Mroczkowska M.: *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 751 (2003).

**I. Hagarová and M. Žemberyová** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Determination of Arsenic in Biological and Environmental Samples by AAS techniques**

The highly toxic nature of arsenic has increased the importance of reliable determination of this element in biological and environmental samples. Electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) and hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS) are the most powerful and well-established techniques for these determinations. In the present article, both the AAS techniques are reviewed.



## ALTERNATIVNÍ VÝKLAD VLIVU BAZICITY PROSTŘEDÍ V KONCEPCI KYSELIN A ZÁSAD

PETR PAVLÁT<sup>a</sup>, JAN HLAVÁČ<sup>b</sup> a VOJTĚCH BEKÁREK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra chemie, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, tř. 17. listopadu, 708 33 Ostrava, <sup>b</sup>Katedra organické chemie, Univerzita Palackého, Tř. Svobody, 8, 771 46 Olomouc  
bekarek@prfnw.upol.cz

Došlo 22.9.04, přepracováno 5.5.05, přijato 19.5.05.

Klíčová slova: vliv prostředí, bazicita, IČ spektra, rovnovážné konstanty

### Obsah

1. Úvod
2. Taftova-Abrahamova koncepce kyselin a zásad jako donoru a akceptoru vodíkové vazby
3. Bazicita v této koncepci kyselin a zásad a výklad jejího vlivu na základě výsledků multivariační analýzy
4. Alternativní výklad vlivu bazicity v Taftově-Abrahamově koncepci kyselin a zásad
5. Vztah předloženého výkladu vlivu bazicity a stanovených faktorů multivariační analýzy
6. Závěr

### 1. Úvod

Pojmy báze (česky často zásada), bazický a bazicita patří v chemii nesporně k těm nejfrekventovanějším. Na otázku po obsahu slova báze se obvykle odkazuje na tři koncepce kyselin a zásad, vyvinuté S. Arrheniem v roce 1887, J. N. Brønstedem a T. M. Lowrym v roce 1923 a G. N. Lewisem v roce 1930. Ovšem první označení báze – a tím vlastně první koncepce kyselin a zásad – pochází z doby kolem roku 1750, kdy Francouz Rouelle použil označení báze (zásady) pro látky, které s kyselinami poskytovaly ve vodě rozpustné soli (za bázi byl považován např. i  $\text{CaCO}_3$ ) a to v tom smyslu, že jde o látky, které mají „zásadní“ význam pro vznik solí z kyselin. Za nejnovější koncepci kyselin a zásad je pak možno považovat práci Tafta, Abrahama a jejich četných spolupracovníků vyvinutou v posledních třiceti letech, přehled viz např. <sup>1-4</sup>.

### 2. Taftova-Abrahamova koncepce kyselin a zásad jako donoru a akceptoru vodíkové vazby

V této koncepci jsou za báze považovány látky, které jsou akceptorem vodíku – donorem elektronů – při vzniku vodíkové vazby (HBA – Hydrogen Bond Acceptor) a za kyseliny jsou považovány látky, které jsou donorem vodíku pro vznik vodíkové vazby (HBD – Hydrogen Bond Donor).

Vztah této HBD-HBA koncepce k dřívějším, tedy Brønstedově-Lowryho a Lewisově teoriím lze stručně vyjádřit následovně. Na rozdíl od Brønstedovy-Lowryho koncepce nejde zde o přenos protonu z kyseliny na bázi a vytvoření nové kovalentní vazby mezi bázi a tímto protonem, ale o vytvoření energeticky chudší vodíkové vazby. Z pohledu Lewisovy koncepce je zde báze považována za nukleofil vůči elektrofilnímu vodíku kyselých skupin pro vytvoření vodíkové vazby.

Taft a spolupracovníci zdůvodňovali oprávněnost a užitečnost svého pojetí řadou skutečností. Patří k nim např. to, že reakce protonu s bázemi probíhá přes stadium vytvoření vodíkové vazby a že existuje obrovské množství případů, kdy se kyselý či bazický charakter sloučeniny projevuje na vlastnostech, které nesouvisí s přenosem protonu, jako jsou např. trojrozměrná struktura vody, sekundární struktura proteinů v prostoru a četné interakce v roztocích významné pro chemické, fyzikální a biologické procesy.

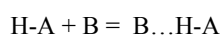
Jeví se proto dnes zcela oprávněně rozlišovat mezi třemi typy bází:

- a) báze jako donor elektronů k vytvoření kovalentní vazby mezi touto bází a protonem
- b) báze jako donor elektronů pro vytvoření kovalentní vazby mezi touto bází a Lewisovou kyselinou – elektrofilem
- c) báze jako donor elektronů pro vytvoření vodíkové vazby mezi touto bází a vodíkem HBD kyseliny.

Kždé z těchto pojetí báze pracuje i s pojmem bazicita, a to jako s kvalitativní nebo kvantitativní charakteristikou báze. Jde obvykle o charakteristiku rozsahu interakce báze se zvolenou standardní kyselinou (např. voda, elektrofil) a tak se setkáváme s kvalitativním dělením bází na silné, slabé a velmi slabé, a to jak ve smyslu Brønstedovy-Lowryho koncepce, tak ve smyslu koncepce Lewisovy – silné a slabé nukleofily. Kvantitativními charakteristikami bazicity jsou pak např. konstanty bazicity bází, popř. konstanty acidity jejich konjugovaných kyselin, nebo různé charakteristiky nukleofilnosti. Oprávněnost zavedení koncepce HBD-HBA zdůvodňuje i skutečnost, že mezi kvantitativními charakteristikami bází v jednotlivých koncepcích existují jen velmi hrubé souvislosti, a to často jen v rámci určitých typů bází.

### 3. Bazicitá v Taftově-Abrahamově koncepci kyselin a zásad a výklad jejího vlivu na základě výsledků multivariační analýzy

HBD-HBA koncepce kyselin a zásad nabídlá ve srovnání s předchozími teoriemi pestřejší, jemnější a často jednodušší způsob charakterizace bází. Podobně jako u předchozích koncepcí i zde se usuzovalo na bazicitu z rozsahu interakce mezi bázemi HBA a standardními kyselinami HBD. Protože však vytvoření vodíkové vazby ovlivňuje (a to často velmi výrazně a charakteristicky) četné vlastnosti HBD kyselin (např. IČ, UV-VIS a NMR spektra), byly v průběhu minulých let navrženy i jiné charakteristiky bazicity, které nejsou založeny na rovnovážných konstantách rovnováh:



S přibývajícím počtem navržených a doporučovaných charakteristik bazicity se však začaly objevovat i vzájemné nesrovnalosti a to především v relativních velikostech těchto charakteristik i v pořadí bází vzhledem k jejich proklamované bazicitě. Dále vyvstala např. i problém, nakolik je bazicita látky odlišná v případech, kdy je báze rozpouštědlem a kdy je rozpouštěnou látkou spolu s interagující kyselinou HBD v nějakém prostředí. Problematickým se jevílo chování některých bází, především trialkylaminů, pyridinů a někdy i nitrilů a vyvstala i otázka počtu charakteristik, které jsou třeba ke kvantitativnímu zhodnocení vlivu HBA bazicity. Tyto otázky vyplynuly z dřívějších studií a snah Tafta a spol. (přehled viz např.<sup>2-4</sup>) o obecném zhodnocení vlivu prostředí na chemické a fyzikální vlastnosti a procesy v roztocích. Na základě hodnocení obrovského počtu experimentálních dat o vlivu prostředí došli tito autoři k závěru, že na změny vyvolané ve studovaných vlastnostech mají rozhodující vliv polarita a polarizovatelnost molekul prostředí, jejich bazicita a acidita a někdy i další vlastnosti jako např. kohezivní energie rozpouštědla a velikost rozpouštěných molekul. Pro kvantitativní zhodnocení vlivu těchto vlastností prostředí na studovanou vlastnost (XYZ) navrhli rovnici

$$\text{XYZ} = (\text{XYZ})_0 + s \cdot \pi + a \cdot \alpha + b \cdot \beta \quad (1)$$

$(\text{XYZ})_0$  značí studovanou vlastnost ve zvoleném standardním stavu (cyklohexan),  $\pi$  je charakteristikou polarity-polarizovatelnosti (někdy s korekcí na typ rozpouštědla charakterizovaného parametrem  $\delta$ ) charakterizující vliv tzv. nespecifických interakcí a  $\alpha$  a  $\beta$  jsou charakteristiky HBD acidity a HBA bazicity prostředí jako charakteristiky tzv. specifických interakcí. Některá selhání a výše uvedené problémy i výsledky zhodnocení vlivu prostředí metodami multivariační analýzy rozsáhlých souborů dat (např.<sup>5,6</sup>) vyvolaly snahu o revizi rovnice (1) a tím i otázky účinku a počtu charakteristik nutných k zhodnocení jednotlivých typů interakcí v roztocích. Tak metodou hlavních komponent aplikovanou na vlastnosti souboru deseti HBD kyselin v přítomnosti 22 bází<sup>7</sup> bylo zjištěno, že 95 % variability ve studovaných, na bazicitě závislých vlastnostech (BDP),

vysvětlují dva faktory  $F_1$  a  $F_2$  vlastní každé bázi, takže k zhodnocení vlivu bazicity byla navržena rovnice:

$$\text{BDP} = \text{BDP}_0 + S_1 F_1 + S_2 F_2 \quad (2)$$

Autoři této studie<sup>7</sup> interpretovali faktory  $F_1$  a  $F_2$  tak, že  $F_2$  zahrnuje elektrostatické efekty při vzniku vodíkové vazby a  $F_1$  je složen z příspěvku elektrostatického a kovalentního. Regresní parametry  $S_1$  a  $S_2$  jsou pak mírou účinku těchto efektů na BDP a autoři dále doporučili jejich poměr, resp. úhel  $\Theta = \arctg S_2/S_1$  jako kritérium použitelnosti pouze jediné charakteristiky bazicity při hodnocení celkového vlivu prostředí, např. rovnicí (1). Tento úhel  $\Theta$  nabýval ve studovaných souborech hodnot v širokém rozmezí od 86 ° do -69 °. V dalších rozsáhlých studiích vlivu bazicity na velké množství rovnovážných a spektrálních dat se zjistilo, že pro většinu studovaných vlastností se  $\Theta$  pohyboval v rozmezí 64–73 ° a pro zhodnocení vlivu bazicity byla dostačující jediná charakteristika. Pro systémy, u nichž byl  $\Theta$  vzdálen této oblasti, vykazoval vliv bazicity závislost na typu bází<sup>8</sup>. Autoři ovšem dále výslovně upozornili, že některé báze, hlavně trialkylaminy a pyridiny vykazují často i v rámci této interpretace nevysvětlitelné odchylky. Dosud známé faktory  $F_1$  a  $F_2$  dvaceti dvou bází jsou uvedeny v tabulce IV.

### 4. Alternativní výklad vlivu bazicity v Taftově-Abrahamově koncepci kyselin a zásad

V této práci navrhuje jinou interpretaci vlivu bazicity na bazicitou ovlivňované vlastnosti (BDP), která vysvětluje i některé přetrvávající nesnáze. Tato interpretace vychází z představy, že studovaná HBD kyselina H-A vytvoří s bázemi  $B_1, B_2, \dots, B_n$  v plynném stavu (ideální plyn) komplexy A-H... $B_1$ , A-H... $B_2, \dots$ , A-H... $B_n$ , jejichž konstanty HBA bazicity  $K = [\text{A-H} \dots \text{B}] / [\text{A-H}][\text{B}]$ , stejně jako jiné, na bazicitě závislé vlastnosti komplexu A-H...B, jsou ovlivňovány pouze bazicitou bází  $B_1, B_2, \dots, B_n$ . Avšak v roztoku, a to i v roztoku této báze (báze jako rozpouštědlo), jsou vlastnosti tohoto komplexu dále ovlivňovány nespecifickými interakcemi s molekulami prostředí – přirozeně za předpokladu, že nejde o rozpouštědlo o větší nebo srovnatelné bazicitě než jakou vykazuje studovaná báze a že nejde o rozpouštědlo amfiprotní. Pro BDP<sup>S</sup> stanovenou v takovém roztoku a pro BDP v plynném stavu BDP<sup>g</sup> pak lze psát ve smyslu principu lineárních vztahů Gibbových energií (LFER) rovnici:

$$\text{BDP}^S = \text{BDP}^g + p \cdot P \quad (3)$$

$P$  je charakteristika prostředí z hlediska jeho nespecifických interakcí a  $p$  je míra citlivosti vlastnosti tohoto komplexu vůči nespecifickým interakcím.

Hodnotu BDP<sup>g</sup> obvykle není možno stanovit, ale na její velikost se usuzuje extrapolací z rovnice (3). BDP<sup>g</sup> se tak jeví jako ideální charakteristika bazicity, a to pouze z hlediska bazického centra molekuly a nikoliv celé molekuly, jak je tomu u charakteristik získávaných v plynném

Tabulka I

Vliv rozpouštědla na rovnovážné konstanty  $K$  tvorby komplexu mezi 4-fluorfenolem a bázemi I až X a výsledky regresní analýzy těchto dat rovnicí (3)

Rozpouštědlo	log $K$										$W_B$
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
Cyklohexan	1,99	2,03	–	2,30	2,56	3,80	0,83	1,00	3,15	1,42	0,49
Tetrachlormethan	1,93	1,88	1,32	2,06	2,53	3,56	0,71	0,79	2,81	–	0,58
Chlorbenzen	1,84	1,60	–	1,74	2,20	3,06	0,55	0,48	2,38	1,06	0,76
1,2-Dichlorbenzen	1,93	1,63	1,02	1,70	2,18	3,06	0,45	0,39	2,61	0,95	0,80
1,2-Dichlorethan	1,70	1,29	0,52	1,27	1,65	2,55	0,09	0,15	2,14	0,72	0,93
Dichlormethan	1,67	1,26	0,50	1,18	1,44	2,37	0,14	–	2,10	–	0,92
$BDP^g = \log K^g$	2,33	2,88	2,75	3,49	3,87	5,33	1,67	2,23	4,16	2,21	0,00
$-p = -d(\log K) / dW_B$	0,65	1,69	2,37	2,38	2,38	3,03	1,62	2,43	2,18	1,57	
Korelační koeficient $R$	0,879	0,983	0,962	0,982	0,928	0,981	0,969	0,976	0,959	0,994	

Báze: I – triethylamin, II – pyridin, III – cyklohexanon, IV –  $N,N$ -dimethylformamid, V – dimethylsulfoxid, VI – hexamethylfosfortriamid, VII – 1,4-dioxan, VIII – benzonitril, IX – 4–(dimethylamino)pyridin, X – 4-brompyridin

stavu interakcí molekul s  $H^+$  např. metodou cyklotronové hmotnostní spektrometrie.

Tento přístup odpovídá i na otázku o počtu charakteristik bazicity nutných k zhodnocení vlivu bazicity na studovanou vlastnost. K tomu, aby v rovnici (1) stačil k zhodnocení vlivu bazicity jediný člen, je třeba, aby hodnoty směrnice  $p$  byly pro studované báze blízké a aby bylo použito stejné prostředí. Pro báze, které pro studovanou BDP mají  $P$  rozdílné (např. trialkylaminy v souboru s bázemi o vysokém  $P$ ) pak bude vliv jejich bazicity rozdílný pro případ, kdy budou použity jako rozpouštědlo, nebo jako rozpuštěné látky ve shodném rozpouštědle, a to i tehdy, když by citlivost studované vlastnosti  $p$  vůči  $P$  byla pro tato prostředí blízká.

Různá hloubka ovlivnění BDP polaritou prostředí pro různé báze, tedy  $p$ , se pak projeví i různým pořadím relativní bazicity studovaných bází zjištěných v různých prostředích o rozdílných  $P$ . V tabulce I jsou uvedeny log  $K$  rovnováhy mezi 4-fluorfenolem a deseti bázemi v šesti prostředích (data převzata z literatury<sup>9,10</sup>), spolu s hodnotami log  $K^g$  odhadnutými rovnicí (3), kdy BDP resp.  $BDP^g$  značí log  $K$  resp. log  $K^g$ , regresním parametrem  $p$  a korelačním koeficientem regresní analýzy těchto dat rovnicí (3). V tabulce jsou uvedeny i použité charakteristiky polaritativy prostředí  $W_B$  (cit.<sup>4</sup>). Jde o empirické charakteristiky označované jako efektivní Bornovy funkce relativní permitivity, které byly odvozeny z elektronových spekter a které jsou co do svých hodnot pro řadu rozpouštědel blízké Bornovým funkcím relativní permitivity ( $\epsilon_r$ ),  $f(\epsilon_r) = (\epsilon_r - 1) / \epsilon_r$  a jsou definovány i pro plynný stav, kdy  $W_B = (\epsilon_r - 1) / \epsilon_r = 0$ . Z tabulky je patrné, že pro deset studovaných bází se velmi liší jak log  $K^g$ , tak citlivost log  $K$  vůči prostředí. Pro komplex 4-fluorfenolu s triethylaminem je skoro šestkrát nižší než pro komplex s hexamethylfosfortriamidem. Velmi názorným příkladem ovlivnění pořadí HBA bazicity jednotlivých bází prostře-

dím je srovnání log  $K$  pro interakci 4-fluorfenolu s pěti bázemi tohoto souboru, totiž dimethylsulfoxidem (DMSO),  $N,N$ -dimethylformamidem (DMF), cyklohexanonem (CHX), pyridinem (Py) a triethylaminem ( $NEt_3$ ):

Plynný stav DMSO > DMF > Py > CHX >  $NEt_3$   
 Tetrachlormethan DMSO > DMF >  $NEt_3$  > Py > CHX  
 1,2-Dichlorbenzen DMSO >  $NEt_3$  > DMF > Py > CHX  
 1,2-Dichlorethan  $NEt_3$  > DMSO > Py > DMF > CHX

S ohledem na polaritu těchto pěti bází je možno očekávat identické pořadí jako v 1,2-dichlorethanu i pro log  $K$  zjištěné v roztocích čistých bází.

Podobně rozdílnou citlivost vůči prostředí vykazují i vlnočty valenčních vibrací vazby O-H fenolu ( $\nu_{O-H}$ ) s různými bázemi stanovené v různých rozpouštědlech. Pro jedenáct těchto komplexů jsou  $\nu_{O-H}$  stanovené v osmi různých prostředích uvedeny v tabulce II. Vedle těchto experimentálních dat<sup>11</sup> jsou v tabulce uvedeny i charakteristiky  $G$  použitých prostředí Allerhanda a Schleyera<sup>12</sup>, které tito autoři odvodili z vlivu prostředí na IČ spektra pěti sloučenin změřených v souboru rozpouštědel i v plynném stavu a které jsme použili jako charakteristiky polaritativy – polarizovatelnosti prostředí  $P$  v rovnici (3). Tyto  $G$  charakteristiky jsou definovány i pro plynný stav,  $G^g = 0$ . V tabulce II jsou dále uvedeny i regresní parametry rovnice (3), kdy  $BDP^g$  má význam vlnočtu valenční vibrace O-H vazby fenolu v komplexu s bází v plynném stavu. Z uvedených hodnot  $p = d(\nu_{O-H})/dG$  je patrná, podobně jako tomu bylo u rovnovážných konstant, rozdílná citlivost  $\nu_{O-H}$  komplexů vůči  $G$  pro různé báze, pro tetrahydrofuran a dibutylether je např. pětkrát vyšší, než pro hexamethylbenzen.

Ovlivnění infračervených spekter, resp. vibrací některých skupin prostředím se jeví výhodné pro posouzení otázky o vlivu báze jako rozpuštěné látky a jako prostředí. Tak  $\nu_{O-H}$  fenolu stanovené v určitém prostředí se ve smyslu předloženého modelu skládá ze dvou příspěvků: z vlivu

Tabulka II

Vliv rozpouštědla na vlnočety valenční vibrace vazby O-H fenolu v jeho komplexech s  $\pi$  a n elektrony bázi I až XI ( $\nu_{\text{O-H...B}}$ ) ( $\text{cm}^{-1}$ ), charakteristiky  $G$  použitých rozpouštědel Allerhanda a Schleyera<sup>12</sup> a výsledky regresní analýzy  $\nu_{\text{O-H...B}}$  s faktory  $G$  rovnicí (3)

Rozpouštědlo	$\nu_{\text{O-H...B}} / \text{cm}^{-1}$											$G^{12}$
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
Hexan	3546	3524	3520	3570	3564	3563	3505	3463	3394	3351	3355	44
Cyklohexan	3545	3522	3515	3566	3562	3556	3502	3461	3387	3348	3346	49
Tetrachlorethen	3538	3516	3512	3563	3557	3554	3498	3448	3376	3342	3331	64
Tetrachlormethan	3534	3513	3507	3557	3555	3553	3492	3448	3374	3324	3323	69
Sirouhlík	3532	3507	3506	3553	3554	3549	3491	3441	3370	3319	3317	74
Dichlormethan	3528	–	3505	–	–	–	3480	3347	–	3281	3276	100
Chloroform	3519	3495	3503	3545	3541	3535	3476	3425	3340	3272	3264	106
Bromoform	–	–	3496	3542	–	–	3471	3415	3336	3265	3257	118
$(\nu_{\text{O-H}})^g$	3563	3545	3528	3584	3580	3580	3525	3490	3428	3412	3417	0
$p \equiv -d\nu_{\text{O-H}}/dG$	0,39	0,48	0,25	0,37	0,37	0,41	0,46	0,80	0,64	1,28	1,39	
Korel. koeficient $R$	0,969	0,991	0,940	0,977	0,998	0,978	0,996	0,996	0,995	0,988	0,996	

Báze: I –mesitylen, II –cyklohexen, III –hexamethylbenzen, IV – difenylether ( $\pi$ ), V – dibenzylether ( $\pi$ ), VI –ethoxybenzen ( $\pi$ ), VII – difenylether (n), VIII – dibenzylether (n), IX –ethoxybenzen (n), X –dibutylether, XI – tetrahydrofuran

Tabulka III

Regresní koeficienty  $S_1$ ,  $S_2$  a  $\text{BDP}_0$  ( $\log K_0$ ) rovnice (2), korelační koeficient  $R$  a  $\Theta = \arctg S_2/S_1$  závislosti  $\log K$  asociace 4-fluorfenolu s bázemi I až VI stanovenými v různých rozpouštědlech na faktorech  $F_1$  a  $F_2$  těchto bází

Rozpouštědlo	$\log K_0$	$S_1$	$S_2$	$R$	$S_2/S_1$	$\Theta$
Plynná fáze <sup>b</sup>	2,876	0,914	5,104	0,997	5,58	76
Cyklohexan	1,724	1,418	3,603	0,997	2,54	69
Tetrachlormethan	1,683	1,200	3,347	0,998	2,79	70
Chlorbenzen	1,337	1,401	2,839	0,993	2,03	64
1,2-Dichlorbenzen	1,395	1,353	2,832	0,993	1,95	63
1,2-Dichlorethan	0,957	1,491	2,258	0,995	1,51	57
Dichlormethan	0,901	1,430	1,918	0,994	1,34	53

<sup>a</sup>Báze I – VI tab. I, <sup>b</sup> výpočet  $\log K^g = \text{BDP}^g$  rovnicí (3)

bazicity, který je roven  $\nu_{\text{O-H...B}}^g - \nu_{\text{O-H}}^g$  a z vlivu nespecifických interakcí prostředí na  $\nu_{\text{O-H...B}}^g$ . Z bází uvedených v tab. II jsou např. známy faktor  $G$  i  $\nu_{\text{O-H...B}}$  pro komplex fenolu s dibutyletherem stanovené v čistém dibutyletheru, totiž  $G = 61$  a  $\nu_{\text{O-H...B}} = 3336 \text{ cm}^{-1}$ . Konfrontací se sloupcem X tab. II je patrná velmi dobrá shoda s vlivem ostatních prostředí na tuto  $\nu_{\text{O-H...B}}$ , kdy 61 i 3336  $\text{cm}^{-1}$  spadá výtečně mezi tyto hodnoty pro cyklohexan a tetrachlorethen.

Uvažované  $\log K$  a  $\nu_{\text{O-H}}$  jsou zajímavé ještě i z hlediska směru vlivu bazicity a nespecifických interakcí na vlastnosti těchto komplexů. Zatímco v případě  $\log K$  působí proti sobě –  $\log K$  roste s bazicitou báze a klesá

s polaritou prostředí – v případě  $\nu_{\text{O-H}}$  jak bazicita, tak nespecifické interakce prostředí s komplexem působí stejným směrem – snižují  $\nu_{\text{O-H}}$ . Nespecifické interakce tak zde působí jako zesilovač účinku bazicity na  $\nu_{\text{O-H}}$ .

## 5. Vztah předloženého výkladu vlivu bazicity a stanovených faktorů multivariační analýzy

Abraham a spol.<sup>10</sup> provedli zhodnocení rovnovážných konstant tvorby komplexu mezi 4-fluorfenolem a šesti bázemi v šesti různých prostředích rovnicí (2). Jejich výsledky jsou uvedeny v tab. III spolu s výsledky korelace

Tabulka IV

Rovnovážné konstanty asociace 4-fluorfenolu s dvacetidvěma bázemi v plynném stavu ( $K^g$ ) a v tetrachlormethanu ( $K^{CCl_4}$ ), faktory  $F_1$  a  $F_2$  (cit.<sup>7</sup>) těchto bází a citlivost rovnovážných konstant asociace vůči nespécifickým interakcím s prostředím ( $p$ ) odhadnuté pomocí rovnic (6) a (7) z faktorů  $F_1$  a  $F_2$  a publikovaných  $\log K^{CCl_4}$

Báze	$F_1$	$F_2$	$\log K^{CCl_4}$	$\log K^g$		$p$	
1. Nitrobenzen	-0,89	0,01	0,073	2,11		2,54	
2. Acetonitril	-0,57	-0,01	0,90	2,15		2,19	
3. Diethylkarbonát	-0,52	-0,02	1,00	2,30		2,24	
4. Ethylacetát	-0,44	-0,02	1,09	2,37		2,32	
5. Aceton	-0,37	-0,02	1,18	2,44		2,16	
6. 1,4-Dioxan	-0,37	-0,16	0,71	1,72		1,71	
7. Cyklohexanon	-0,34	0,01	1,32	2,75	(2,75) <sup>a</sup>	2,24	(2,37)
8. Diethylether	-0,29	-0,11	1,01	2,05		1,82	
9. Trimethylfosfát	-0,08	0,24	2,45	4,03		2,84	
10. Tetrahydrofuran	-0,21	-0,04	1,26	2,48		2,01	
11. Dimethylsulfoxid	0,15	0,20	2,53	4,03	(3,87)	2,58	(2,38)
12. Tetramethylmočovina	0,20	0,11	2,30	3,62		2,28	
13. 4-Methylpyridin	0,49	-0,05	2,03	3,07		1,59	
14. 2,6-Dimethylpyridin	0,47	-0,10	2,13	2,80		1,43	
15. 2,4,6-Trimethylpyridin	0,53	-0,07	2,29	3,00		1,50	
16. Pyridin	0,42	-0,08	1,88	2,85	(2,88)	1,53	(1,69)
17. 1-Methyl-2-pyrrolidon	0,15	0,16	2,37	3,83		2,45	
18. <i>N,N</i> -Dimethylformamid	0,05	0,12	2,06	3,53	(3,49)	2,38	(2,38)
19. <i>N,N</i> -Dimethylacetamid	0,18	0,15	2,38	3,81		2,40	
20. Hexamethylfosfortriamid	0,48	0,38	3,56	5,25	(5,33)	2,98	(3,03)
21. <i>N,N</i> -Dimethylanilin	0,11	-0,40	0,45	0,93		0,67	
22. Triethylamin	0,85	-0,28	1,93	2,33	(2,33)	0,71	(0,65)

<sup>a</sup> Hodnoty v závorkách jsou výsledky získané z rovnice (3)

hodnot  $\log K^g$ , které jsme získali extrapolací pro sedm bází rovnic (3) – viz tab. I. Z tabulky je patrný narůstající podíl vlivu faktoru  $F_2$  s klesající polaritou prostředí, přičemž pro plynný stav již vliv  $F_2$  šestkrát převažuje nad vlivem  $F_1$ . Ve smyslu interpretace těchto  $F$  faktorů by tedy vodíková vazba mezi 4-fluorfenolem a těmito bázemi měla mít v plynném stavu převážně elektrostatickou povahu a podíl kovalentního charakteru této vazby by měl narůstat s rostoucí polaritou prostředí.

Pro sedm bází z deseti, pro které existují data o vlivu prostředí na jejich  $\log K$ , jsou známy faktory  $F_1$  a  $F_2$ . Pro soubor těchto sedmi bází jsou mezi těmito faktory  $F$  a  $\log K^g$  a  $d(\log K)/dW_B$  těsné vztahy, jak dokumentují vysoké hodnoty korelačního koeficientu násobné korelace  $R$ :

$$F_1 = 0,156 + 0,549 \log K^g + 0,857 d(\log K)/dW_B \quad (4)$$

$$R = 0,986$$

$$F_2 = -0,586 + 0,0991 \log K^g - 0,149 d(\log K)/dW_B \quad (5)$$

$$R = 0,992$$

$$\log K^g = 2,876 + 0,914 F_1 + 5,10 F_2 \quad (6)$$

$$R = 0,997$$

$$p^\circ d(\log K)/dW_B = -2,02 + 0,552 F_1 - 3,223 F_2 \quad (7)$$

$$R = 0,986$$

Tyto vztahy je přirozeně možné použít pro odhad  $\log K^g$  a  $p$  pro zhodnocení interakce 4-fluorfenolu i s jinými bázemi o známých faktorech  $F$ . Naopak by jistě ze stanovených závislostí vlastností komplexů na prostředí bylo možno odhadovat faktory  $F$  dalších bází.

Publikované faktory  $F_1$  a  $F_2$  všech dvaceti dvou bází jsme použili pro odhad  $\log K^g$  a  $p = d(\log K)/dW_B$  těchto bází pro jejich interakci s 4-fluorfenolem. Získané hodnoty jsou v tabulce IV. Pro srovnání s  $\log K^g$  jsou v tabulce uvedeny i  $\log K$  asociace 4-fluorfenolu s uvedenými bázemi stanovené v roztoku v tetrachlormethanu (tyto  $\log K^{CCl_4}$  jsou dodnes známy pro stovky bází a byly doporučeny jako charakteristiky HBA bazicity bází).

Z tabulky IV jsou patrné rozdíly v  $p$  pro jednotlivé

báze v jejich interakci s 4-fluorfenolem. Pro hexamethylfosfortriamid je maximální a čtyřikrát vyšší než pro triethylamin. Všechny 22 bází je možné z hlediska  $p$  pro tuto interakci rozdělit např. do čtyř skupin, pro  $p = 0,6-1,0$  (triethylamin, *N,N*-dimethylanilin),  $p = 1,4-1,6$  (pyridiny),  $p = 1,8-2,5$  (většina bází souboru) a  $p = 2,5-3,1$  (nitrobenzen, fosfáty).

## 6. Závěr

Zhodnocení vlivu nesespecifických interakcí na rovnovážnou konstantu asociace 4-fluorfenolu s deseti bázemi a na valenční vibraci vazby O-H tohoto fenolu v komplexech s jedenácti bázemi ukázalo, že nesespecifické interakce mají výrazný vliv na obě studované vlastnosti, přičemž tento vliv může být pro jednotlivé asociáty velmi rozdílný, u studovaných systémů jde až o pětinašobné rozdíly. Provedené zhodnocení vlivu nesespecifických interakcí rovnicí (3) umožnilo získat hodnoty rovnovážné konstanty asociace 4-fluorfenolu s bázemi i vlnové valenční vibrace vazby O-H fenolu s bázemi v plynném stavu (BDP<sup>g</sup>) jako veličin, jejichž hodnota není ovlivněna prostředím a je určena pouze bazicitou příslušné báze HBA. Tyto BDP<sup>g</sup> spolu s citlivostí vlastností komplexů HBD-HBA vůči nesespecifickým interakcím charakterizovanou směrnici  $p$  rovnice (3) mají rozhodující význam pro vlastnosti komplexů HBD-HBA v roztocích a dovolují i vysvětlit dosud konstatované nesnáze v problematice hodnocení vlivu HBA bazicity<sup>8,10</sup>, totiž problém vlivu báze jako rozpouštědla a jako rozpuštěné látky a často pozorované anomální chování některých bází HBA, především trialkylaminů a pyridinů. BDP<sup>g</sup> a  $p$  stanovené pro asociaci 4-fluorfenolu s deseti bázemi korelují velmi dobře s faktory  $F_1$  a  $F_2$  těchto bází stanovenými multivariační analýzou<sup>7</sup>. Z této korelace (rovnice 6 a 7) bylo možno odhadnout i BDP<sup>g</sup> a  $p$  asociace 4-fluorfenolu s dalšími bázemi, takže rozdílná citlivost komplexů 4-fluorfenolu s bázemi HBA vůči nesespecifickým interakcím mohla být zhodnocena pro soubor dvacetidvou bazických rozpouštědel.

*Práce byla vypracována v rámci projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky MSM 6198959216.*

## LITERATURA

1. Abraham M. H., Doherty R. M., Kamlet M. J., Taft R. W.: Chem. Br. 22, 555 (1986).
2. Reichardt C.: Chem. Rev. 94, 2319 (1994).
3. Reichardt C.: *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Verlag Chemie, Weinheim 1988.
4. Bekárek V., Nevěčná T.: *Rozpouštědlové vlivy v chemii a jejich hodnocení*. Academia, Praha 1992.
5. Pytela O.: Collect. Czech. Chem. Commun. 53, 1333 (1988).
6. Pytela O.: Collect. Czech. Chem. Commun. 55, 634 (1990).
7. Maria P.-C., Gal J.-F., de Franchesi J., Fargin E.: J. Am. Chem. Soc. 109, 483 (1987).
8. Abraham M. H., Buist G. J., Grellier P. I., McGill R. A., Prior D. V., Oliver S., Turner E., Morris J. J., Taylor P. J., Nicolet P., Maria P.-C., Gal J.-F., Aboud J.-L. M., Doherty R. M., Kamlet M. J., Shuely W. J., Taft R. W.: J. Phys. Org. Chem. 2, 540 (1989).
9. Gurka D., Taft R. W.: J. Am. Chem. Soc. 91, 4794 (1969).
10. Abraham M. H., Grellier P. L., Prior D. V., Morris J. J., Taylor P. J., Maria P.-C., Gal J.-F.: J. Phys. Org. Chem. 2, 243 (1989).
11. Osawa E., Yoshida Z.: Spectrochim. Acta 23A, 2029 (1967).
12. Allerhand A., Schleyer H.: J. Am. Chem. Soc. 85, 371 (1963).
13. Abraham M. H., Grellier P. L., Prior D. V., Morris J. J., Taylor P. J.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1990, 521.

**P. Pavlát<sup>a</sup>, J. Hlaváč<sup>b</sup>, and V. Bekárek<sup>b</sup>**  
<sup>a</sup>Department of Chemistry, Mining School, Technical University, Ostrava, <sup>b</sup>Department of Organic Chemistry, Palacký University, Olomouc): **An Alternative Explanation of the Influence of Medium Basicity in the Acid-Base Concept**

A model of influencing chemical and physical properties (equilibria and spectral parameters) of HBD (Hydrogen Bond Donor) acids by HBA (Hydrogen Bond Acceptor) bases, based on the influence of HBD-HBA complexes by nonspecific interactions with the medium, is proposed. The model interprets also current difficulties associated with evaluation of basicity effects, namely (i) the problem of the number of characteristics of bases necessary for interpretation of experiment, (ii) the problem of the effect of base as solvent and solute, (iii) problematic effects of some bases such as trialkylamines and pyridines and (iv) LFER dependences observed only for chemically related bases. The model is applied to evaluation of the basicity effect on the HBD-HBA equilibrium between bases and 4-fluorophenol and on the wavenumbers of OH stretching vibration of complexes of phenol with eleven bases. Relationships are given between basicity factors  $F^1$ ,  $F^2$  and decadic logarithms of equilibrium constants of association of 4-fluorophenol with the bases in the gas state ( $\log K^g$ ) and sensitivity of the latter parameter to nonspecific interactions with the medium ( $p$ ).

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### URČENÍ DOSTUPNOSTI AMIDOVA- NÝCH PEKTINŮ PRO MIKROORGA- NISMY TRAČNÍKU

MILAN MAROUNEK<sup>a,b</sup>, ANDRIY SYNYTSYA<sup>c</sup>,  
JANA ČOPÍKOVÁ<sup>c</sup> a KAMIL SIROTEK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4, <sup>b</sup>Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 01 Praha 10, <sup>c</sup>Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
marounek@iapg.cas.cz

Došlo 5.1.05, přijato 10.3.05.

Klíčová slova: pektin, pektinamid, tračník, fermentace, mikroorganismy

#### Úvod

Pektin je polymer kyseliny D-galakturonové, z větší části esterifikované methanolem. Obsahuje i menší množství neutrálních sacharidů a necukerných složek. Tím, že je obsažen v zelenině a ovoci, je běžnou součástí naší stravy. Pektin má v organismu řadu významných účinků daných okolností, že v trávicím traktu zvyšuje viskozitu střevního obsahu a je dobře fermentován mikroorganismy terminálního ilea a tračníku. Zvýšení viskozity střevního obsahu ztěžuje vstřebání cholesterolu, žlučových kyselin a lipidů. V pokuse s potkany pektin snížil cholesterolémii a obsah cholesterolu a lipidů v játrech<sup>1</sup>. U prasat pektin snížil aktivitu pankreatické amylasy a zvýšil přestup proteinu a organické hmoty krmiva do tlustého střeva<sup>2</sup>. Další autoři upozorňují, že pektin rovněž snižuje aktivitu pankreatické lipasy<sup>3</sup>. Ve fermentačních oddílech trávicího traktu je pektin přeměněn na směs těkavých mastných kyselin (TMK) a další metabolity<sup>4</sup>. Ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu je role pektinu dvojnásobná. Na jedné straně je zdrojem energie pro bakteriální proteosyntézu, která vede ke snížení koncentrace toxického amoniaku. Na druhé straně rozpustné polysacharidy, ke kterým pektin patří, ztěžují sorpci kancerogenních látek hydrofobní povahy na nerozpustnou vlákninu a jejich následné vyloučení výkaly<sup>5</sup>. Fyziologické účinky pektinu jsou ovlivněny jeho fyzikálně-chemickými vlastnostmi. U potkanů byl hypocholesterolemický účinek významný jen při použití preparátu o vysoké molekulové hmotnosti a stupni esterifikace<sup>1</sup>. Dá se očekávat, že hydro-

fobní deriváty pektinu budou mít v trávicím traktu jiné účinky než výchozí pektin, který má značnou afinitu k vodě, vytváří gel a zvyšuje viskozitu. Molekulu pektinu dokáží v trávicím traktu štěpit pouze mikrobiální enzymy. První zkouškou modifikovaných pektinů by proto mělo být zjištění dostupnosti pro mikroorganismy tračníku. V této práci popisujeme zkoušky dostupnosti amidovaných pektinů pro mikroorganismy tračníku prasat. Způsobem trávení se prasata a primáti zásadně neliší a k podobným zkouškám jsou vhodnější než laboratorní potkani. Stejný model použili pro srovnání amidovaného pektinu s pektinem o vysokém a nízkém stupni esterifikace methanolem Denis a spol.<sup>6</sup>

#### Experimentální část

##### Příprava amidovaných pektinů

Amidované pektiny byly připraveny z citrusového pektinu o vysokém stupni esterifikace (73 %) pomocí heterogenní amidace s *n*-butylaminem, *n*-hexylaminem, *n*-oktylaminem, *n*-dodecylaminem a *n*-oktadecylaminem<sup>7</sup>. Byly připraveny pektinamidy o nízkém (6,2 až 9,1 %) i vysokém (24,3–53,0 %) stupni substituce. Derivatizace změnila fyzikálně-chemické vlastnosti pektinu, zejména snížila rozpustnost a zvýšila schopnost vázat nepolární molekuly.

##### Inkubace amidovaných pektinů s obsahem tračníku prasat

Prasata krmená komerční směsí na bázi cereálií a extrahovaného sójového šrotu byla poražena v experimentálních jatkách VÚ živočišné výroby. Obsahy prvních třetin dvou tračníků byly smíchány a ředěny puftrem v poměru 4 g zažitiny + 36 ml pufru s hydrogenuhličitánem sodným a dihydrogenfosforečnanem draselným<sup>8</sup>. Substrát byl přidán v množství 0,6 g. Inkubace probíhala ve 100 ml NTS lahvích s gumovými zátkami pod atmosférou CO<sub>2</sub>, 24 h na vodní lázni při 39 °C. V kontrolních kulturách bylo 0,6 g pektinu použitého k syntéze pektinamidů doplněno 20 mg močoviny. Každé uspořádání bylo inkubováno ve 4 kulturách. Po ukončení inkubace byl v lahvích změněn tlak a v inkubační tekutině změřeno pH, stanoveny TMK (titračně, po vydestilování vodní parou) a laktát mikrodifusní metodou. Mikrodifusní metoda byla použita i pro stanovení amoniaku<sup>9</sup> (v dalším pokuse).

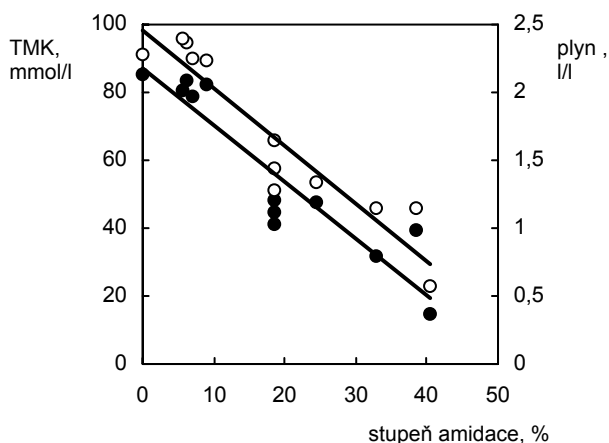
##### Růst bakterií tračníku na amidovaných pektinech

Obsah tračníku z celkem tří prasat byl příslušně zředěn a rozlit na Petriho misky s agarem Wilkins-Chalgren (Oxoid). Do půdy byl přidán pektin či oktadecylpektinamid o stupni substituce 30 a 53 % v množství 5 g l<sup>-1</sup>. Petri-

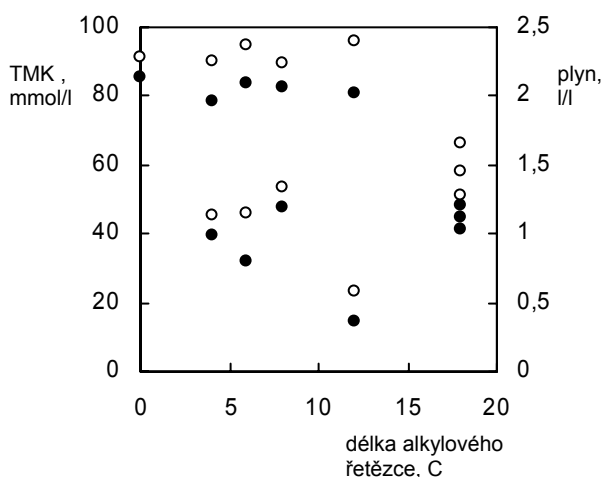
ho misky byly kultivovány 2 dny při 39 °C v anaerostatech (Anaerobic Plus System, Oxoid) pod atmosférou CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (9:1). Pak byly narostlé kolonie spočítány a u náhodně zvolených zjištěna morfologie buněk po barvení podle Grama.

## Výsledky a diskuse

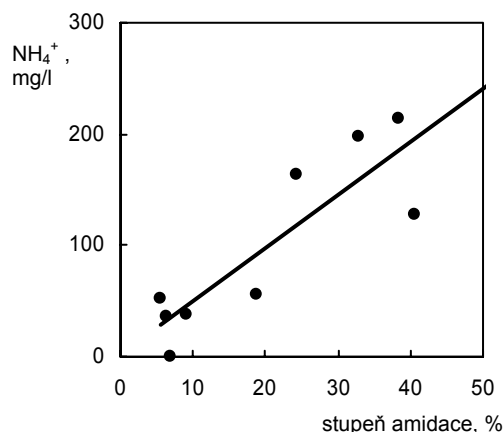
Produkce TMK i plynu v kulturách s amidovanými pektiny byla nižší než v kontrolních kulturách s výchozím preparátem pektinu. Produkce TMK a fermentačního plynu v kulturách s pektinem spolu korelovaly ( $r = 0,92$ ;  $P < 10^{-3}$ ). Nižší produkci metabolitů z amidovaného pektinu (vyjma amoniaku) pozorovali i Denis a spol.<sup>6</sup>, kteří však zkoušeli jediný pektinamid a neuvádí povahu jeho



Obr. 1. Tvorba těkavých mastných kyselin • a fermentačního plynu ○ z pektinamidů o různém stupni amidace



Obr. 2. Tvorba těkavých mastných kyselin • a fermentačního plynu ○ z pektinamidů s různou délkou alkylového řetězce



Obr. 3. Tvorba amoniaku z pektinamidů o různém stupni amidace

alkylového řetězce. Jak ukazuje obr. 1, produkce TMK i plynu negativně korelovaly se stupněm amidace molekul pektinu ( $r = -0,93$  a  $-0,88$ ;  $P < 10^{-3}$ ). Při stupni amidace cca 20 % klesala fermentační rychlost na polovinu. Délka uhlikatého řetězce alkylových substituentů neměla na fermentaci modifikovaných pektinů vliv (obr. 2). Z obr. 3 vyplývá, že s vyšším stupněm amidace se v kulturách s pektinem zvýšila i tvorba amoniaku ( $r = 0,87$ ;  $P < 10^{-3}$ ). Použitá analytická metoda však neumožňuje rozlišit mezi amoniakem a těkavými aminy uvolněnými hydrolyzou amidové vazby. Produkce kyseliny mléčné byla zanedbatelná, menší než 1 mmol l<sup>-1</sup>.

Střední počet bakterií tračnicku prasat, schopných růstu na agaru s pektinem, byl 7,9.10<sup>8</sup>/g. Jiní autoři<sup>10</sup> našli počty pektinolytických bakterií v tračnicku prasat poněkud vyšší, 4,7.10<sup>9</sup>/g. Byl-li pektin nahrazen oktadecylpektinamidem o stupni amidace 30 %, klesl počet bakterií schopných růstu na tomto substrátu na 7,7.10<sup>7</sup>/g, při stupni amidace 53 % až na 4,9.10<sup>7</sup>/g. Mikroskopickým pozorováním bylo zjištěno, že bez ohledu na typ pektinu, byly hlavní morfologickou skupinou bakterií gramnegativní tyčinky (až 42 %), následované grampositivními koky (až 25 %) a tyčinkami (až 17 %). Další skupiny bakterií byly u různých zvířat zastoupeny velmi rozdílně.

*Práce vznikla s podporou grantu GA ČR č. 525/03/0358.*

## LITERATURA

- Judd P. A., Truswell A. S.: Br. J. Nutr. 53, 409 (1985).
- Mosenthin R., Sauer W. C., Ahrens F.: J. Nutr. 124, 1222 (1994).
- Tsujita T., Sumiyoshi M., Han L.-K., Fujiwara T., Tsujita J., Okuda H.: J. Nutr. Sci. Vitaminol. 49, 340 (2003).



4. Bourquin L. D., Titgemeyer E. C., Fahey G. C., Jr.: *Nutr. Res.* 16, 1119 (1996).
5. Ferguson L. R., Robertson A. M., Watson M. E., Triggs C. M., Harris P. J.: *Chem. Biol. Interact.* 95, 245 (1995).
6. Denis I., Durand M., Stevani J., Hannequart G., Dumay C.: *Sci. Aliments* 10, 265 (1990).
7. Synytsya A., Čopíková J., Marounek M., Mlčochová P., Sihelníková L., Blafková P., Tkadlecová M., Havlíček J.: *Czech J. Food Sci.* 21, 162 (2003).
8. Burroughs W. N., Frank A., Gerlaugh P., Bethke R. M.: *J. Nutr.* 40, 9 (1950).
9. Conway E. J.: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, 4. vydání. Crosby Lockwood & Son, London 1957.
10. Butine T. J., Leedle J. A. Z.: *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1112 (1989).

**M. Marounek<sup>a,b</sup>, A. Synytsya<sup>c</sup>, J. Čopíková<sup>c</sup>, and K. Sirotek<sup>a,b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Animal Physiology and Genetics, Prague*, <sup>b</sup>*Research Institute of Animal Production, Prague*, <sup>c</sup>*Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Assay of Availability of Amidated Pectins for Colon Microorganisms**

Amidated pectins were tested in cultures of the pig colon content. The cultures were incubated under CO<sub>2</sub> at 39 °C for 24 h and then production of volatile fatty acids (VFA), gas and ammonia were measured. Citrus pectin used for syntheses of amidated derivatives served as a control. Production of VFA and gas were significantly lower in cultures with amidated pectins than in control cultures. Production of VFA and gas correlated negatively and that of ammonia positively with the degree of amidation. The length of the carbon chain of alkyls had no effect on fermentability of modified pectins. Amidation of pectin reduced the number of colon bacteria capable of growing on the pectins by one order of magnitude. Gramnegative rods were the most numerous pectinolytic isolates.

#### 40. konference

### POKROKY V ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ A FARMACEUTICKÉ CHEMII – „LIBLICE 2005“

Sportovní Centrum Nymburk, 18.–20. listopadu 2005

Vážení kolegové,

Odborná skupina organické, bioorganické a farmaceutické chemie České společnosti chemické si Vás dovoluje pozvat na tradiční fórum českých a slovenských chemiků. Vedle zvaných hlavních přednášek (40+5 min) a (25+5 min) budou tvořit náplň konference krátká původní sdělení (10+5 min) a postery (0,85 × 0,85 m). Tématika těchto příspěvků nemusí navazovat na výše uvedené referáty. Vítána jsou sdělení z oblastí, které leží na hranici okruhu témat vytčených názvem konference. Podrobnosti a formuláře naleznete na webové stránce naší odborné skupiny, <http://uoch.vscht.cz/orbifachos/>. **Uzávěrka přihlášek a abstraktů je 5. září 2005.** V případě, že nemáte přístup k e-mailu nebo budete potřebovat další informace, kontaktujte, prosím, organizátory konference, prof. Pavla Drašara, tel. 220 444 283, fax 233 339 990, e-mail [Pavel.Drasar@vscht.cz](mailto:Pavel.Drasar@vscht.cz), nebo doc. Jaroslava Kvíčalu, tel. 220 444 242, fax 220 444 278, e-mail [kvicalaj@vscht.cz](mailto:kvicalaj@vscht.cz).

## POUŽITÍ TECHNIKY DIFUZNÍHO GRADIENTU V TENKÉM FILMU PŘI CHARAKTERIZACI PŮD

VERONIKA ŘEZÁČOVÁ-SMETKOVÁ<sup>a</sup>,  
BOHUMIL DOČEKAL<sup>b</sup> a HANA DOČEKALOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická VUT v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, <sup>b</sup> Ústav analytické chemie, Akademie věd ČR, Veveří 97, 611 42 Brno  
rezacova@fch.vutbr.cz

Došlo 2.8.04, přepracováno 27.1.05, přijato 18.2.05.

Klíčová slova: technika difuzního gradientu v tenkém filmu, kovy, půdy

### Úvod

Půda je jedním z přírodních ekosystémů, ve kterém probíhají složité procesy výměny látek mezi její abiotickou a biotickou složkou. Látky, které se do půdy dostávají antropogenní činností, často vstupují do procesů látkové výměny a nepříznivě tyto přírodní procesy ovlivňují. Přítomnost určitých látek však může být pro správnou funkci ekosystému nezbytná. Mezi takové látky patří např. některé kovy, které jsou pro biotu životně důležité. Působení kovů na živé organismy a jejich dostupnost v půdách souvisí s řadou faktorů, mezi které patří jak vlastnosti půdního systému, tak koncentrace kovů a jejich forma. Stanovení obsahu kovů v půdě je proto významným kritériem pro hodnocení kvality půdy.

Pro stanovení obsahu kovů v půdách se v dnešní době nejčastěji používají standardizované vyluhovací postupy. Velmi často jsou aplikovány postupy využívající lučavku královskou<sup>1</sup>, kyselinu dusičnou<sup>2</sup>, octovou<sup>3</sup>, ethylendiamin-tetraoctovou (EDTA)<sup>3</sup>, dusičnan sodný<sup>4</sup>, aj. Tyto metody stanovení kovů v půdách umožňují odhadnout podíl kovů vázaný v různých formách a fázích. Jak vyplývá z velmi dobrých korelací obsahu kovů stanovených v některých vyluzích (např. při použití dusičnanu sodného) a obsahu kovů v některých částech rostlin, mohou vyluhovací postupy dobře charakterizovat biologicky dostupný podíl kovů v půdě<sup>4</sup>.

Během vyluhování se vzorek půdy mechanicky zpracovává, a tím se narušují fyzikálně-chemické rovnováhy, které mohou ovlivňovat rozdělení kovů a jejich forem v půdním systému. Vyluhovací postupy tedy poskytují spíše informace o celkovém využitelném obsahu kovů, než o podílu kovů, který je skutečně přístupný kořenovému systému rostlin.

V roce 1994 byla popsána<sup>5</sup> nová vzorkovací technika – technika DGT (Diffusive Gradients in Thin films tech-

nique, Technika difuzního gradientu v tenkém filmu) – umožňující měření koncentrace látek *in situ* ve vodných systémech<sup>6–12</sup> a měření hmotnostních toků látek *in situ* v sedimentech<sup>13–18</sup> a půdách<sup>19–22</sup>. Technika DGT se v dnešní době používá díky své prekoncentrační schopnosti především pro měření obsahu stopových kovů<sup>6,9–13</sup>. Výsledky měření technikou DGT mohou poskytnout informace o formách kovů přítomných ve sledovaných systémech a o kinetice procesů probíhajících v sedimentech a půdách.

Technika DGT využívá dva typy polyakrylamidových gelů – difuzní a sorpční. Oba typy gelů jsou společně s membránovým filtrem utěsněny ve vzorkovací jednotce ve tvaru pístu (viz obr. 1). Ionty kovů, jejich mobilní a labilní formy, difundují kruhovým okénkem vzorkovací jednotky DGT o ploše  $A$  (cm<sup>2</sup>) difuzní vrstvou známé tloušťky  $\Delta g$  (cm) a vážou se na vhodný sorbent zakotvený v sorpčním gelu. Množství kovu  $M$  (ng) vázaného během doby expozice  $t$  (s) v sorpčním gelu se obvykle stanovuje po eluci sorpčního gelu kyselinou dusičnou metodami atomové absorpční nebo emisní spektrometrie.

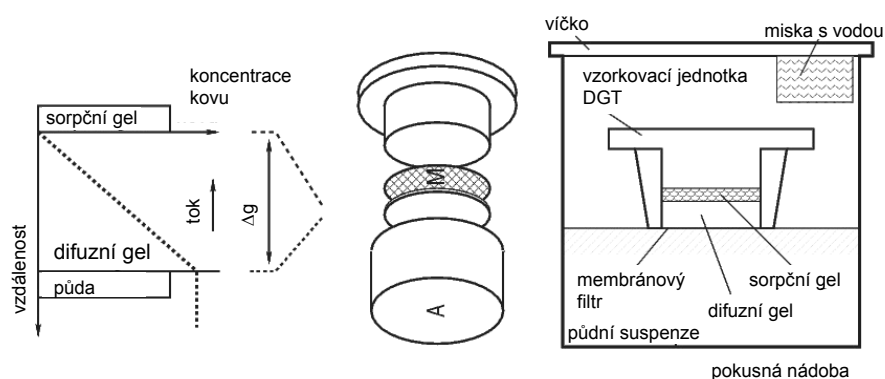
Tato práce přináší výsledky aplikace techniky DGT ve trojici dobře definovaných půdních vzorků odebraných na dlouhodobě monitorovaných místech v České republice. Pozornost je zaměřena na stanovení obsahu Cd, Cr, Cu, Ni a Pb. Výsledky jsou srovnány s výsledky získanými obvyklými vyluhovacími postupy. Rovněž jsou ukázány možnosti využití techniky DGT k odhadu dostupnosti kovů v půdách.

### Experimentální část

#### Chemikálie a půdní vzorky

Pro přípravu difuzních a sorpčních gelů byl použit akrylamid (Boehringer), patentované síťovadlo (DGT Research, Lancaster, UK), peroxosíran amonný (Lachema) a tetramethylethylenediamin (TEMED; Sigma-Aldrich). Pro přípravu sorpčních gelů byl dále použit Chelex-100 (Na-forma, 200–400 mesh, Bio-Rad).

Půdní vzorky, které byly charakterizovány technikou DGT, byly podrobně studovány v rámci mezinárodního projektu INCO Copernicus – FERTILIA (“*Cycling trace metals in sustainable management of agricultural soils. Fertility requires the inventory of input metals*” IC15-CT98-0124). Vzorky lehkých až středních neutrálních půd (pH 6,9–7,4) byly odebrány na jaře 1998 na třech monitorovaných místech v České republice, a to ve třech hloubkových horizontech 0–10, 40–60 a 90–110 cm, z pravidelně obdělávaných polí ošetřovaných opakovaně v letech 1980 až 1987 čistírenskými kaly. Vzorkovací místa se nacházela v katastrech č. 7901, 25360 a 7902 v blízkosti Zlína a předměstí Brna (Chrlice, Tuřany). Každý vzorek reprezentoval směs 4 × 8 podvzorků odebraných Edelmanovou vzorkovací tyčí na ploše 1000 m<sup>2</sup> (25 × 40 m). Po usušení vzorků půd volně na vzduchu byla získána přesátím přes plastové síto jemná frakce o velikosti zrn menší než 2 mm. Homogenizované suché vzorky byly uschovány v plastových kontejnerech při tep-



Obr. 1. Princip techniky DGT a experimentální uspořádání při její aplikaci v půdách

lotě 25 °C. Obsah sušiny v těchto vzorcích dosahoval hodnot  $98,5 \pm 0,5$  hm. % .

Při základní charakterizaci půd byl obsah kovů v půdách stanoven některými běžnými postupy vyluhování. Vyluhování lučavkou královskou bylo provedeno podle ISO normy 11466:1995 za varu po dobu 2 h (cit.<sup>1</sup>), vyluhování  $0,05 \text{ mol l}^{-1}$  EDTA (pH 7, po dobu 1 h s poměrem fází 1/10) a  $0,43 \text{ mol l}^{-1}$  kyselinou octovou (po dobu 16 h s poměrem fází 1/40) podle doporučení BCR (cit.<sup>3</sup>) a vyluhování  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  dusičnanem sodným (po dobu 16 h s poměrem fází 4/10) dle<sup>4</sup>.

#### Použití přístroje

Obsah kovů ve výluzích, jakož i v eluátech sorpčních gelů, byl stanoven metodami plamenové a bezplamenové atomové absorpční spektrometrie (FAAS, ETAAS) na přístrojích Perkin-Elmer 3110 a 4110 ZL za běžně doporučených podmínek. Obsah kovů byl výsledně vztahován na suchou hmotnost vzorku půdy.

#### Pracovní postup

Difuzní gel i sorpční gel, tj. gel se zakomponovaným sorbentem, byl připravován dle postupů přejatých od DGT Research, Lancaster, Velká Británie<sup>23</sup>. Před aplikací byl difuzní gel ekvilibrován a uchovávan v  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$ , sorpční gel pak v deionizované vodě.

Vzorkovací jednotky DGT byly sestaveny těsně před aplikací tak, že na cylindrickou část pístu byl umístěn disk sorpčního gelu, který byl překryt diskem difuzního gelu a následně ochranným membránovým hydrofilním polyethersulfonovým filtrem Supor®-450 s velikostí pórů  $0,45 \mu\text{m}$  a tloušťce  $100 \mu\text{m}$  (Gelman Laboratory, USA). Vrstvy byly nakonec sevřeny druhou, prstencovitou, uzavírací částí vzorkovací jednotky.

Sestavené vzorkovací jednotky DGT byly ponořeny do vodních suspenzí půd tak, aby na styčné ploše nezůstaly vzduchové bubliny a celá plocha byla se suspenzí v přímém kontaktu. Pro zajištění konstantních vlhkostních poměrů byl do uzavřených plastových nádobek se suspenzí umístěna miska s vodou. Schematicky je aplikace jednotek do půdních suspenzí znázorněna společně s principem techniky DGT na obr. 1. Z připravených půd-

ních suspenzí byly před začátkem a po ukončení aplikace vzorkovacích jednotek odebrány půdní roztoky (vodné výluhy). Po uplynutí expoziční doby byly jednotky opláchnuty, rozebrány a sorpční gel eluován v  $1 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{HNO}_3$ .

#### Výsledky a diskuse

Srovnání výsledků získaných standardními vyluhovacími postupy a technikou DGT

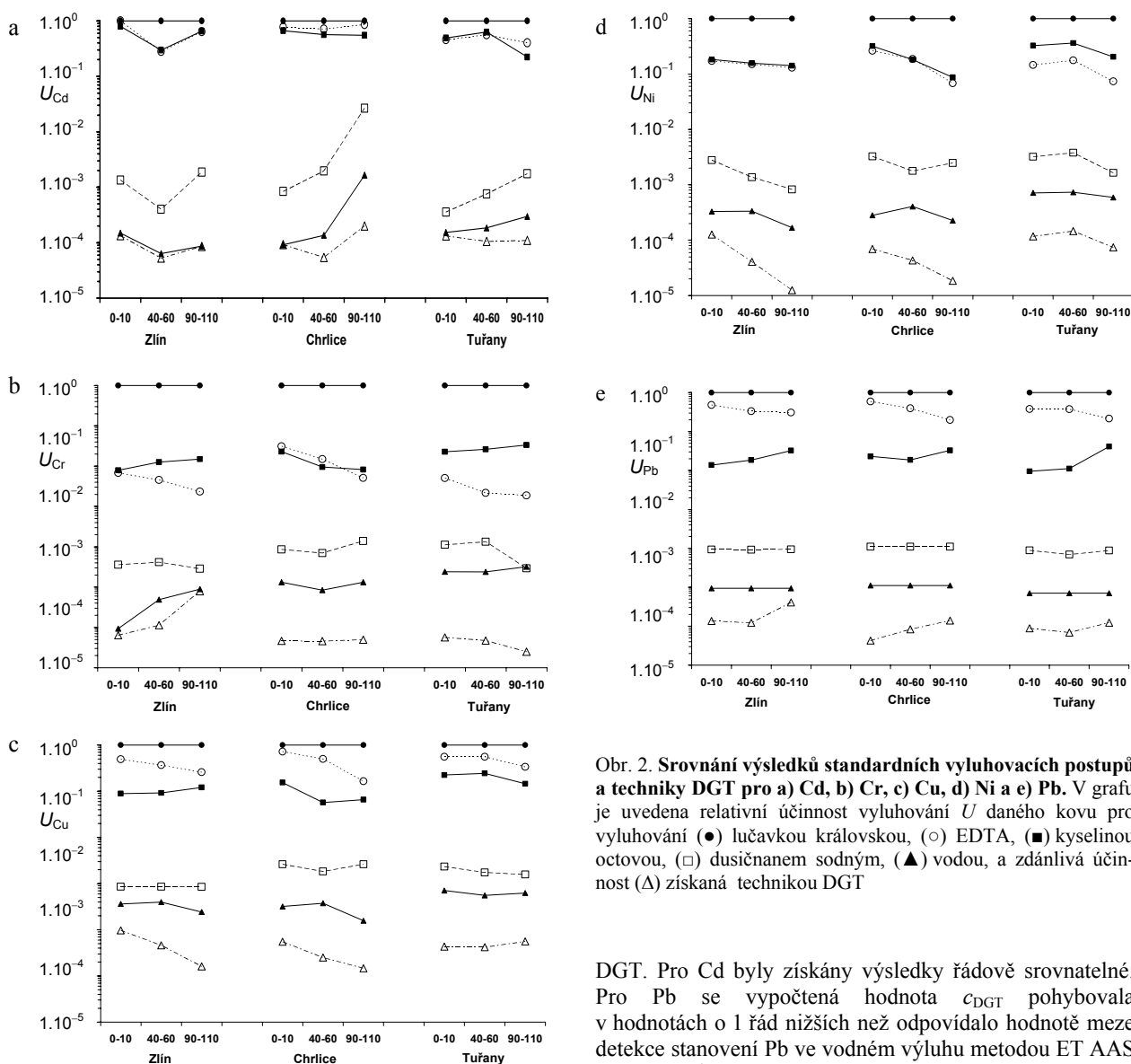
V rámci projektu FERTILIA byly charakterizovány tři půdní hloubkové horizonty 0–10 cm, 40–60 cm a 90–110 cm na sledovaných polích (Zlín, Chrlice a Tuřany) vyluhováním kovů lučavkou královskou,  $0,05 \text{ mol l}^{-1}$  EDTA,  $0,43 \text{ mol l}^{-1}$  kyselinou octovou a  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$ .

Pro srovnání byla k charakterizaci půd použita také technika DGT. Vzorkovací jednotky s tloušťkou difuzní vrstvy  $0,82 \text{ mm}$  byly aplikovány při teplotě  $28 \pm 1$  °C po dobu 48 h do půdních suspenzí o vlhkosti 56 % pro vzorkovací místo Zlín, 37,5 % pro Chrlice a 50 % pro Tuřany, tj. vlhkosti, která odpovídala 1,5násobku maximální kapilární vodní kapacity studované půdy. Výsledky stanovené technikou DGT představují průměrné hodnoty toku kovů difuzním gelem během doby expozice vzorkovací jednotky. Byly vypočteny za předpokladu, že uvolňování a transport kovů je během vzorkování konstantní (viz obr. 1), jako zdánlivé koncentrace kovů  $c_{\text{DGT}}$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) v blízkosti vzorkovací jednotky dle vztahu

$$c_{\text{DGT}} = (F \cdot \Delta g) / D$$

Odpovídají mobilním formám kovů uvolněným z pevné fáze půdy a formám transportovaným difuzí půdním roztokem z blízkého okolí vzorkovací jednotky.

Srovnání výsledků standardních vyluhovacích postupů a techniky DGT je shrnuto graficky na obr. 2. Výsledky jsou v uvedených grafech prezentovány jako účinnost vyluhování  $U$  v logaritmickém měřítku a jsou vztahy k pseudototálnímu obsahu kovů, který byl získán použitím lučavky královské jako vyluhovacího činidla (viz tabulka I). Z výsledků vyplývá, že množství kovů stanovené technikou DGT je o několik řádů nižší v porovnání



Obr. 2. Srovnání výsledků standardních vyluhovacích postupů a techniky DGT pro a) Cd, b) Cr, c) Cu, d) Ni a e) Pb. V grafu je uvedena relativní účinnost vyluhování  $U$  daného kovu pro vyluhování (●) lučavkou královskou, (○) EDTA, (■) kyselinou octovou, (□) dusičnanem sodným, (▲) vodou, a zdánlivá účinnost (Δ) získaná technikou DGT

s celkovým obsahem kovů stanoveným vyluhováním lučavkou královskou. Při použití EDTA a kyseliny octové byly rovněž získány o několik řádů vyšší výsledky než při aplikaci techniky DGT.

Pro posuzování dostupnosti kovů v půdách bývá doporučováno použití dusičnanu sodného jako vyluhovacího činidla<sup>4</sup>. Z obr. 2 je však patrné, že se výsledky získané technikou DGT liší od výsledků získaných výluhem dusičnanem pro Cd a Cu o 1–2 řády a pro Cr, Ni a Pb o 2–3 řády. Je tedy zřejmé, že obsah kovů stanovený vyluhováním dusičnanem sodným poskytuje spíše informace o celkovém využitelném obsahu kovů než o frakci, která by byla okamžitě přístupná kořenovému systému rostlin.

Také mezi koncentrací kovů stanovenou analýzou vodného výluhu a technikou DGT ( $c_{DGT}$ ) byly nalezeny rozdíly. Ve vodném výluhu byla koncentrace Cu a Ni o jeden a Cr až o dva řády vyšší než stanovená technikou

DGT. Pro Cd byly získány výsledky řádově srovnatelné. Pro Pb se vypočtená hodnota  $c_{DGT}$  pohybovala v hodnotách o 1 řád nižších než odpovídalo hodnotě meze detekce stanovení Pb ve vodném výluhu metodou ET AAS ( $0,4 \text{ ng ml}^{-1}$ ). Tak nízké obsahy Pb bylo možné stanovit jen díky překoncentračnímu efektu techniky DGT.

Srovnáním koncentrace kovů ve vodném výluhu a  $c_{DGT}$  je možno posoudit dle<sup>13</sup> schopnost půdy doplňovat úbytek kovů v půdním roztoku v důsledku jejich odčerpání vazbou ve vzorkovací jednotce a tak odhadnout množství labilních a mobilních forem kovů v půdním systému.

Na základě výsledků měření DGT pro studovanou trojici půdních vzorků lze konstatovat, že Cd je v těchto půdách přítomno ve formě labilních a dostatečně mobilních sloučenin, např. jako hydratovaný ion či hydroxokomplex, a jeho úbytek z půdního roztoku je dostatečně rychle doplňován uvolňováním z půdy. Pro Cu a Ni je podíl koncentrace stanovené technikou DGT a přímou analýzou půdního roztoku relativně stálý a lze proto předpokládat, že Cu a Ni jsou v analyzovaných půdních vzorcích přítomny ve velmi podobných formách. Pravděpodobně jde o komplexy s organickými látkami jakými mohou

Tabulka I

Pseudototální obsah kovů ve sledovaných půdách stanovený výluhem lučavkou královskou

Půdní vzorek		Koncentrace prvku v půdě [mg kg <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>				
místo	půdní horizont [cm]	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb
Zlín	0–10	4,70±1,12	601±8	58,4±1,3	53,0±0,9	42,4±1,9
	40–60	5,03±0,55	194±25	41,0±1,1	54,1±0,8	27,1±0,9
	90–110	0,75±0,01	101±11	38,8±0,2	59,2±0,8	19,1±1,5
Chrlice	0–10	3,15±0,12	63,6±2,0	93,5±3,0	31,6±1,6	36,0±1,5
	40–60	0,55±0,01	34,4±0,7	27,3±1,0	22,5±0,7	15,0±0,8
	90–110	0,029±0,002	24,5±1,0	9,1±0,4	16,1±1,5	7,0±0,6
Tuřany	0–10	5,68±2,39	99,1±2,3	163±4	44,7±0,8	56,4±0,6
	40–60	4,94±0,90	90,7±4,0	143±8	46,6±2,3	57,5±4,9
	90–110	0,72±0,04	34,2±0,8	31,6±0,5	24,4±1,9	28,4±1,3

<sup>a</sup> Průměr (n = 4) ± kombinovaná nejistota (k = 2)

být huminové kyseliny. Chrom je pak, s výjimkou vzorku z oblasti Zlína, v půdě vázán ve formě stabilních sloučenin a je velmi málo dostupný, patrně ve formě koloidů. Odlišné chování Cr v půdním vzorku z oblasti Zlína je možné vysvětlit na základě poznatků o historii půdního vzorku. Zdrojem dostupných forem Cr byly pravděpodobně čistírenské kaly použité v 80. letech ke hnojení dotyčných polí.

Rozdíly mezi obsahy kovů zjištěnými vyluhovacími postupy a technikou DGT vyplývají z odlišných přístupů stanovení. Technika DGT na rozdíl od vyluhovacích postupů umožňuje nedestruktivní *in situ* způsob stanovení kovů v půdách a je tedy blíže odhadu skutečného obsahu dostupných forem kovů přítomných v půdě.

Uvolnitelnost kovu z půdy do půdního roztoku měřená technikou DGT

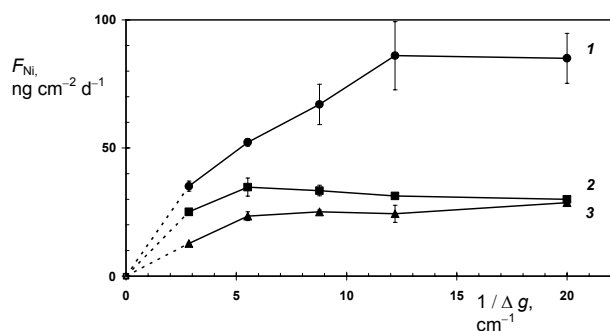
Aplikace vzorkovacích jednotek DGT s rozdílnou tloušťkou difuzní vrstvy umožňuje odčerpávat v blízkosti jednotky sledované kovy odlišnou měrou a současně sledovat přímou odezvu půdy na takto definované odčerpávání uvolňováním dalších iontů kovů. Takto může být zjednodušeně simulována funkce kořenových systémů rostlin. Rozdílná tloušťka difuzní vrstvy totiž podmiňuje ustavení různých koncentračních gradientů ve vzorkovací jednotce DGT během doby její aplikace. Kovy jsou v důsledku toho z okolí jednotky odčerpávány různou rychlostí. Při větší tloušťce difuzního gelu se v něm vytváří mírnější koncentračních gradient. Za této situace je více pravděpodobné, že půdní systém je schopen úbytek kovů z půdního roztoku dostatečně rychle doplňovat. Malé tloušťky difuzních gelů vedou k ustavení strmějších koncentračních gradientů, takže rychlost odčerpání kovů z půdního roztoku v okolí vzorkovací jednotky DGT je vyšší. Půdní systém pak nemusí mít schopnost tento úbytek dostatečně rychle vyrovnávat a koncentrace kovů v půdním roztoku v okolí jednot-

ky tak začne klesat.

Odezva půdy na rozdílné požadavky jednotek DGT byla sledována aplikací vzorkovacích jednotek s tloušťkou difuzní vrstvy 0,50–3,51 mm ve svrchním horizontu (0–10 cm) všech tří půdních vzorků. Vlhkost připravených půdních suspenzí odpovídala přibližně 1,5násobku maximální kapilární kapacity, u vzorků ze Zlína činila 60 %, z Chrlice 37,5 % a z Tuřan 50 %. Jednotky byly exponovány po dobu 48 h při teplotě 30 ± 1 °C.

Výsledky aplikace jednotek DGT s odlišnou tloušťkou difuzní vrstvy, zpracované jako závislosti toku kovu jednotkou DGT na reciproké hodnotě tloušťky difuzní vrstvy, vykazovaly obdobný průběh pro všechny sledované kovy. Jako příklad je uvedena na obr. 3 závislost pro Ni. Ve quasi-lineární části závislosti, odpovídající větším tloušťkám difuzní vrstvy, má půda schopnost pufovat úbytek kovů spjatý s jejich vazbou v sorpčním gelu dostatečně rychle uvolňováním labilních forem kovů. Naproti tomu pro tenčí vrstvy, tloušťku difuzní vrstvy 0,51–1,81 mm pro půdní vzorky Zlína a Chrlice a 0,51–0,82 mm pro vzorky z Tuřan, půda již nestačí doplňovat odčerpané ionty kovů a závislost se zakřivuje k limitní hodnotě toku. Tu je možné považovat za maximální hodnotu toku doplňování dostupných forem iontů kovů z půdních částic do půdního roztoku. Tyto hodnoty jsou přehledně shrnuty pro všechny sledované kovy v tabulce II.

Údaje toků v předchozích závislostech je možné přepočítat na zdánlivé koncentrace kovů  $c_{DGT}$  stanovené technikou DGT (viz výše) a srovnat je s koncentracemi kovů ve vodných výluzech. Příklad tohoto srovnání uvádí pro Ni a půdní vzorek Chrlice obr. 4, přičemž procentický údaj udává podíl  $c_{DGT}$  vzhledem ke koncentraci Ni stanovené ve vodném výluhu. Nižší hodnoty  $c_{DGT}$  ve srovnání s koncentracemi v půdním roztoku mohou být způsobeny



Obr. 3. Závislost toku niklu  $F_{Ni}$  jednotkou DGT na recipročné hodnotě tloušťky difuzní vrstvy  $\Delta g$  pro oblast 1 – Tuřany, 2 – Chrlice, 3 – Zlín

#### Tabulka II

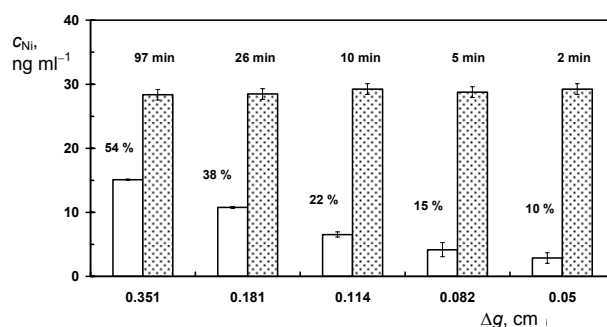
Maximální toky uvolnitelných forem kovů v půdě stanovené technikou DGT

Místo	Maximální tok [ $\text{ng cm}^{-2} \text{den}^{-1}$ ]				
	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb
Zlín	45	2,0	110	23	0,36
Chrlice	12	0,68	62	34	0,77
Tuřany	7	1,3	31	85	0,45

odlišnou pohyblivostí různých chemických forem v gelu, neboť hodnoty difuzních koeficientů větších molekul, např. komplexů s huminovými látkami, jsou menší než hydratovaných iontů. Pro malé tloušťky difuzních gelů, kdy jsou požadavky na uvolňování kovů z půdy vyšší, odráží procenticky vyjádřené údaje rovněž nedostatečnou schopnost půdního systému vyrovnávat úbytek kovů spjatý s vazbou v sorpčním gelu. Dále se v rozdílech může projevit přítomnost různých stabilních chemických forem kovů. Pouze labilní formy přispívají k množství kovů stanovenému technikou DGT. Během doby difuze gelem však může dojít k transformaci některých chemických forem na labilnější. Dobu difuze, dobu možné transformace, uvádějí pro jednotlivé tloušťky difuzních gelů časové údaje v obr. 4. Právě delší doba difuze, která umožňuje transformaci relativně stabilnějších forem Ni, pak může vysvětlit vyšší hodnotu podílu uvedenou pro tloušťku difuzní vrstvy 3,51 mm oproti 1,81 mm, kdy má půdní systém schopnost úbytek kovů dostatečně rychle vyrovnávat.

#### LITERATURA

- ISO 11466:1995 – *Soil quality: Extraction of trace elements soluble in aqua regia.*
- Vyhláška ministerstva životního prostředí ČR č. 13/1994 Sb. Metodika je popsána v publikaci: Zbiral J., Analýza půd II, Jednotné pracovní postupy, ÚKZÚZ Brno, 1996.
- Ure A.M., Quevauviller Ph., Muntau H., Griepink B.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51, 135 (1993).
- Gupta S. K., Aten C.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51, 25 (1993).



Obr. 4. Srovnání koncentrace niklu  $C_{Ni}$  měřené technikou DGT a koncentrace ve vodném výluhu pro půdní vzorek z Chrlice v závislosti na tloušťce gelu  $\Delta g$  za podmínek popsaných v textu k obr. 3 (hodnoty v % udávají podíl zjištěný technikou DGT, časové údaje dobu difuze);

□ technika DGT, ▨ vodný výluh

- Dawison W., Zhang H.: *Nature* 367, 546 (1994).
- Torre M. C. A., Beaulieu P. Y., Tessier A.: *Anal. Chim. Acta* 418, 53 (2000).
- Zhang H., Davison W.: *Anal. Chem.* 72, 4447 (2000).
- Denney S., Sherwood J., Leyden J.: *Sci. Tot. Environ.* 239, 71 (1999).
- Gimpel J., Zhang H., Hutchinson W., Davison W.: *Anal. Chim. Acta* 448, 93 (2001).
- Webb J. A., Keough M. J.: *Marine Pol. Bull.* 44, 222 (2002).
- Zhang H., Davison W.: *Anal. Chem.* 67, 3391 (1995).
- Ernstberger H., Zhang H., Davison W.: *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 873 (2002).
- Zhang H., Davison W., Knight B., McGrath S. P.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 704 (1998).
- Zhang H., Davison W., Tych W.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 4181 (1995).
- Teasdale P. R., Hayward S., Davison W.: *Anal. Chem.* 71, 2186 (1999).
- Krom M. D., Mortimer R. J. G., Poulton S. W., Hayes P. J.: *Aquat. Sci.* 64, 282 (2002).
- Zhang H., Davison W., Mortimer R. J. G., Krom M. D., Hayers P. J., Davies I. M.: *Sci. Tot. Environ.* 296, 175 (2002).
- Diviš P., Dočekalová H., Smetková V.: *Chem. Listy* 97, 1184 (2003).
- Dočekal B., Smetková V., Dočekalová H.: *Chem. Papers* 57, 161 (2003).
- Hooda P. S., Zhang H., Davison W., Edwards A. C.: *Europ. J. Soil Sci.* 50, 285 (1999).
- Davison W., Hooda P. S., Zhang H., Edwards A. C.: *Advances Environ. Res.* 3, 550 (2000).
- Zhang H., Zhao F. J., Sun B., Davison W., McGrath S. P.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 2602 (2001).
- DGT measurements in waters, soils and sediments; DGT Research Lancaster, Velká Británie, <http://www.dgtresearch.com>, staženo 29. ledna 2002.

**V. Řezáčová-Smetková<sup>a</sup>, B. Dočekal<sup>b</sup>, and H. Dočekalová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno,* <sup>b</sup> *Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*): **Application of Diffusive Gradients in Thin Film Technique to Soil Characterization**

Technique of diffusive gradients in thin films (DGT) was applied to estimation of available Cd, Cr, Cu, Ni and

Pb in soil samples taken from three representative contaminated sites in the Czech Republic, investigated in long-term monitoring studies. The results obtained by the DGT technique and conventional leaching procedures are compared and discussed. Availability of the metals was also assessed by evaluation of resupply fluxes of metals from the soil solid matrix.

## EXTRAKČNĚ-POLAROGRAFICKÉ STANOVENÍ STOPOVÝCH MNOŽSTVÍ 2-METHYL-4,6-DINITROFENOLU

PAVEL JIŘÍK<sup>a\*</sup>, JAN FISCHER<sup>b</sup>  
a JIŘÍ BAREK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Masarykova střední průmyslová škola chemická, Křemencova 12, 116 28 Praha 1, <sup>b</sup> UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2

barek@natur.cuni.cz

Došlo 8.12.04, přijato 10.1.05.

Klíčová slova: 2-methyl-4,6-dinitrofenol, polarografie, rtuťová kapková elektroda, extrakce tuhou fází

### Úvod

2-Methyl-4,6-dinitrofenol (MDNF) patří mezi poměrně nebezpečné pesticidy, jehož toxicita byla detailně prostudována. Jsou potvrzeny jeho genotoxické účinky, i když jeho karcinogenita není dosud prokázána. Používá se i jako meziprodukt při syntézách fungicidů a bioaktivních sloučenin, barviv a léčiv a také jako inhibitor radikálových polymerací vinylaromatických sloučenin. I když dnes není 2-methyl-4,6-dinitrofenol zařazen mezi povolené pesticidy v České republice, je vzhledem k jeho nebezpečnosti poptávka po citlivých a selektivních metodách jeho stanovení v environmentálních matricích. Polarografickému a voltmetrickému chování této látky byla již věnována značná pozornost, přičemž z analytického hlediska se pro její stanovení v environmentálních vzorcích osvědčila předběžná separace a prekoncentrace kapalinovou extrakcí<sup>5</sup>. V předchozím sdělení byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení stopových množství této látky pomocí moderních polarografických a voltmetrických metod na rtuťových elektrodách. V návaznosti na toto sdělení byla v předkládané práci věnována pozornost kombinaci diferenční pulsní polarografie s předběžnou separací a prekoncentrací pomocí extrakce tuhou fází (SPE), která se již dříve osvědčila při stanovení submikromolárních koncentrací 9-nitroanthracenu. Byla dána přednost klasické rtuťové kapkové elektrodě s periodicky obnovovaným povrchem, která je méně náchylná k pasivaci a přitom ve spojení s pulsními technikami a prekoncentrací pomocí extrakce tuhou fází zajišťuje dostatečnou citlivost měření.

\* Pavel Jiřík s touto prací obsadil 4. místo v Soutěži středoškolské odborné činnosti na Masarykově střední škole chemické v roce 2003.

### Experimentální část

#### Reagencie

Zásobní roztok 2-methyl-4,6-dinitrofenolu (C. A. S. Name: Phenol, 2-methyl-4,6-dinitro-; C. A. S. Registry Number: [534-52-1]) ve vodě o koncentraci  $1.10^{-4}$  mol  $l^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 0,0099 g čisté látky (99,4%, Supelco, Bellefonte, USA) v 500 ml deionizované vody. Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě za laboratorní teploty. Spektrofotometricky bylo ověřeno, že zásobní roztok je stálý minimálně 100 dní. Další použité chemikálie: kyselina boritá, kyselina octová, kyselina fosforečná, hydroxid sodný, methanol, chlorid draselný – čistota p.a., Lachema Brno, ČR. Brittonovy-Robinsonovy tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny smísením 0,2 mol  $l^{-1}$  NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci 0,04 mol  $l^{-1}$ . Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH metrem se skleněnou kombinovanou elektrodou. Pro přípravu vodných roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Milli-Q plus systém, Millipore, USA). Používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách. Kyslík byl z polarografovaných roztoků odstraňován pětiminutovým probuláním dusíkem čistoty 4.0 (Linde, Praha). Pro přípravu modelových vzorků byla použita pitná voda z Pražské vodovodní sítě a říční voda odebraná z Vltavy v centru Prahy. Odebrané vzorky vody byly prosáté přes fritu S4 a uchovávány potmě v chladničce při teplotě 5 °C. Pro předběžnou separaci a prekoncentraci studované látky byly použity kolonky Lichrolut EN (200 mg), katalogové číslo K 92622470 (Merck, Darmstadt, Německo) vhodné pro separaci slabě polárních látek z vodného prostředí. Tyto kolonky jsou naplněny 200 mg sorbentu na bázi kopolymeru ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu.

#### Apparatura

Při polarografických měřeních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 4, fy Polaro-Sensors, spol. s r.o., Praha. Software pracoval v operačním systému Windows 98 (Microsoft Corp.). Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení s referenční argentochloridovou elektrodou (1 M-KCl) typu RAE 113 (Monokrystaly, Turnov). Jako pomocná elektroda byl použit platinový plíšek. Jako pracovní sloužila klasická rtuťová kapková elektroda (DME). Při výšce rezervoáru 64 cm byla přirozená doba kapky  $t = 4,1$  s (měřeno v 0,1 M-KCl při vloženém nulovém napětí) a průtoková rychlost rtuti  $m = 1,18$  mg  $s^{-1}$ . Byla použita rychlost polarizace 4 mV  $s^{-1}$  a elektronicky řízená doba kapky 1 s. Na elektrodu byly vkládány pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě – 50 mV.



Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH metrem (typ 4330) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005) (vše Jenway, Velká Británie). pH metr byl kalibrován standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty. V textu je dále často používána hodnota výsledného  $\text{pH}^{\text{f}}$  vodně – methanolickeho roztoku. Jedná se o hodnotu získanou měřením těchto roztoků pomocí skleněné elektrody kalibrované standardními roztoky vodných pufrů. Tato hodnota není termodynamická veličina, ale pomocný parametr zavedený za účelem co nejstručnější charakterizace měřených roztoků.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Pye – Unicam PU8800 UV/VIS spectrophotometer (Cambridge, Velká Británie) v křemenných květách měrné tloušťky 10 mm.

### Pracovní postupy

Stálost zásobního roztoku byla kontrolována spektrofotometricky, referenční květa byla naplněna methanolem. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce 270 nm, kde měla studovaná látka absorpční maximum.

Modelové roztoky byly připraveny přidáním známého množství zásobního roztoku 2-methyl-4,6-dinitrofenolu ( $c = 1.10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) k odebranému vzorku pitné či říční vody. Při vlastním stanovení bylo 10 ml polarografovaného roztoku zbaveno kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Všechny křivky byly registrovány třikrát. Před vstupem dusíku do polarografické nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs vody a methanolu ve stejném poměru jako analyzovaný roztok.

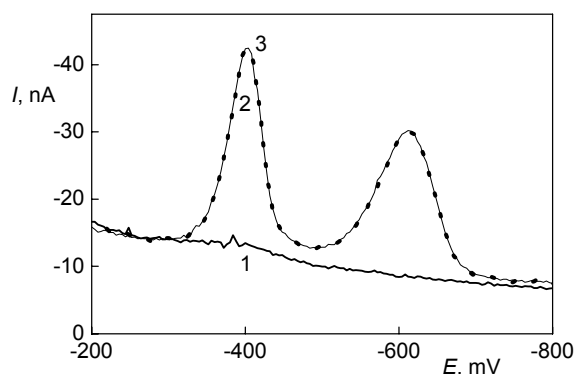
Extrakce tuhou fází byly prováděny následujícím postupem: kolonka SPE napojená na vývěvu byla před vlastní extrakcí aktivována promytím 3 ml methanolu, který byl následně vymyt 3 ml deionizované vody. Poté byl na kolonku nanesen modelový vzorek 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v pitné či říční vodě a po jeho prosátí byl kolonkou 10 min prosáván vzduch. Zachycený 2-methyl-4,6-dinitrofenol byl eluován dvakrát 3 ml elučního činidla do srdcové baňky a poté odpařen na vakuově rotační odparce. Odparek byl rozpuštěn v 10 ml Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7 na vibračním míchadle. Poté byl roztok převeden do polarografické nádoby a po odstranění kyslíku byl zaznamenán DP polarogram. Shodným postupem byl připraven slepý pokus. K němu bylo po zaznamenání DP polarogramu přidáno množství  $1.10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  2-methyl-4,6-dinitrofenolu, které odpovídalo koncentraci ve vzorku a znovu byl zaznamenán DP polarogram. Výtěžek extrakce byl určen z poměru  $I_p / I_p^{\circ}$ , kde  $I_p$  značí výšku píku po provedené extrakci 2-methyl-4,6-dinitrofenolu z vodného roztoku a  $I_p^{\circ}$  je výška píku 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v roztoku připraveném přidáním potřebného objemu standardního roztoku 2-methyl-4,6-dinitrofenolu k roztoku po extrakci slepého vzorku. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. Výšky píků byly měřeny od spojnice minim po jeho stranách. Případný signál, který poskytoval základní elektrolyt, byl od kalibračních závislostí odečten. Mez stanovitelnosti ( $L_Q$ ) byla

počítána v programu ADSTAT, který ji počítá jako nejmenší hodnotu signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního grafu dostatečně malá a rovná číslu 0,1 (cit.<sup>11</sup>).

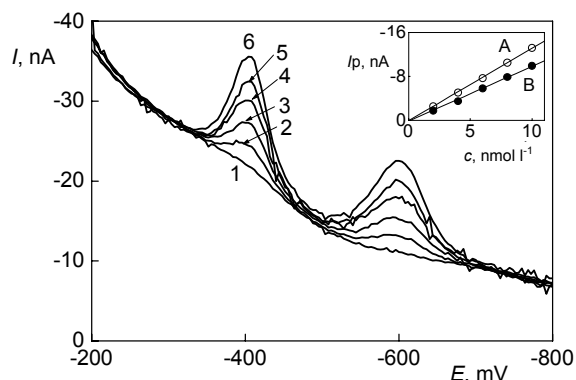
## Výsledky a diskuse

### Určení výtěžku extrakce

Pro předběžné experimenty byla zvolena deionizovaná voda jako ideálně jednoduchá matrice. Byla ověřena možnost využití ethylacetátu, směsi ethylacetát-methanol (1:1) a methanolu jako elučních činidel. Výtěžnost extrak-



Obr. 1. DP polarogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7,0 po SPE ze 100 ml deionizované vody ( $c = 1.10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ ), eluci methanolem a následném odpaření; Slepý vzorek (1), extrakt z vodného roztoku (2, —), přímý přídavek 2-methyl-4,6-dinitrofenolu ke slepému vzorku (3, . . . )



Obr. 2. DP polarogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu odpovídající koncentraci 0 (1),  $2.10^{-9}$  (2),  $4.10^{-9}$  (3),  $6.10^{-9}$  (4),  $8.10^{-9}$  (5),  $1.10^{-8}$  (6)  $\text{mol.l}^{-1}$  této látky v deionizované vodě; SPE z 500 ml deionizované vody, eluce dvakrát 3 ml MeOH, odpaření a rozpuštění v 10 ml Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7,0. Vložena je závislost proudu prvního (A) a druhého (B) píku na koncentraci 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v deionizované vodě

Tabulka I

Parametry kalibračních přímků pro stanovení 2-methyl-4,6-dinitrofenolu technikou DPP po SPE z deionizované vody, eluce dvakrát 3 ml MeOH, odpaření a rozpuštění v 10 ml Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7,0

Objem vzorku [ml]	Pík	$c$ [mol l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [nA mol <sup>-1</sup> l]	Úsek [nA]	Koeficient korelace	L <sub>Q</sub> [mol l <sup>-1</sup> ]
100	1.	(2–10)·10 <sup>-8</sup>	-2,47·10 <sup>8</sup>	0,05	0,9999	0,4·10 <sup>-8</sup>
100	2.	(2–10)·10 <sup>-8</sup>	-1,94·10 <sup>8</sup>	0,14	0,9997	0,9·10 <sup>-8</sup>
500	1.	(2–10)·10 <sup>-9</sup>	-1,32·10 <sup>8</sup>	0,08	0,9998	0,6·10 <sup>-9</sup>
500	2.	(2–10)·10 <sup>-9</sup>	-9,98·10 <sup>7</sup>	0,18	0,9985	3,1·10 <sup>-9</sup>

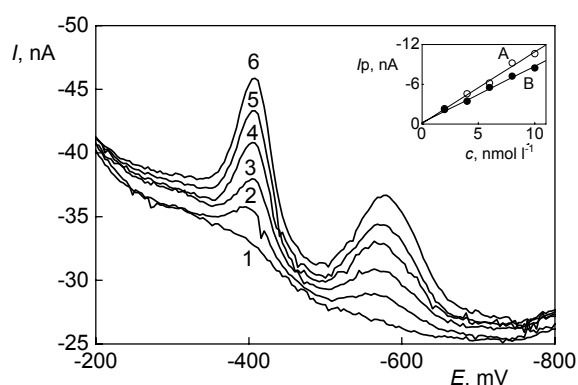
ce se pohybovala od 53 % při použití ethylacetátu, přes 81 % při eluci směsí ethylacetát-methanol (1:1) až po 97 % při eluci samotným methanolem. Na obr. 1 jsou pro ilustraci uvedeny DP polarogramy po eluci methanolem.

Pro urychlení celého postupu byla ověřena možnost eluce methanolem bez následného odpařování. V tomto případě byl 2-methyl-4,6-dinitrofenol z kolony vymyt dvakrát 3 ml methanolu, byly přidány 4 ml Brittonova-Robinsonova pufru, roztok byl doplněn methanolem na 10 ml, probublán dusíkem a zaznamenán jeho DP polarogram. V tomto případě byla účinnost extrakce 98 %, avšak přítomnost 60% methanolu v polarografovaném roztoku snižovala výšku píku 2-methyl-4,6-dinitrofenolu a tudíž i citlivost stanovení. Proto byla jako optimální zvolena eluce 2-methyl-4,6-dinitrofenolu čistým methanolem s následným odpařením, která poskytuje prakticky stejný výtěžek, avšak výrazně vyšší citlivost. Použitelnost zvoleného postupu byla ověřena změřením kalibračních závislostí na modelových vzorcích o objemu 100 ml v koncentračním rozmezí 1.10<sup>-7</sup> až 2.10<sup>-8</sup> mol l<sup>-1</sup> a o objemu 500 ml v rozmezí 1.10<sup>-8</sup> až 2.10<sup>-9</sup> mol l<sup>-1</sup> (odpovídající DP polarogramy

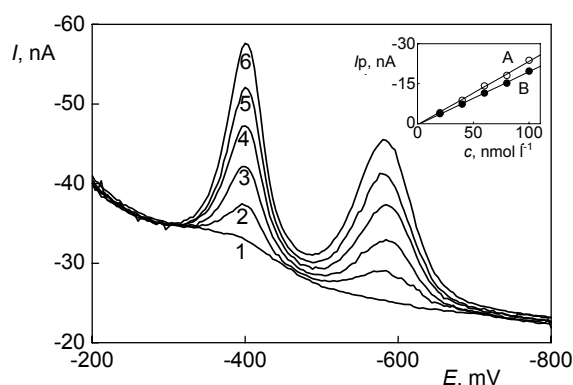
jsou pro ilustraci na obr. 2). Účinnost extrakce 1.10<sup>-8</sup> mol l<sup>-1</sup> 2-methyl-4,6-dinitrofenolu z 500 ml byla o něco nižší (95 %). Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tabulce I, která potvrzuje použitelnost tohoto postupu, popsaného v experimentální části.

#### Extrakce tuhou fází z pitné vody

Výtěžnost byla o něco nižší než v případě deionizované vody (97 % při SPE ze 100 ml 1.10<sup>-7</sup> mol l<sup>-1</sup> a 94 % při SPE z 500 ml 1.10<sup>-8</sup> mol l<sup>-1</sup> 2-methyl-4,6-dinitrofenolu. Proto byly kalibrační křivky proměřeny v koncentrační oblasti 2.10<sup>-8</sup> až 1.10<sup>-7</sup> mol l<sup>-1</sup> při extrakci ze 100 ml a 2.10<sup>-9</sup> až 1.10<sup>-8</sup> mol l<sup>-1</sup> při extrakci z 500 ml. Parametry těchto lineárních kalibračních závislostí jsou shrnuty v tabulce II a odpovídající DP polarogramy jsou pro ilustraci znázorněny na obr. 3 a 4. Lineární charakter získaných závislostí spolu s nízkými hodnotami detekčních limitů potvrzují praktickou použitelnost takto prováděného extrakčně-polarografického stanovení 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v oblasti jeho nanomolárních koncentrací v pitné vodě.



Obr. 3. DP polarogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu odpovídající koncentraci 0 (1), 2.10<sup>-8</sup> (2), 4.10<sup>-8</sup> (3), 6.10<sup>-8</sup> (4), 8.10<sup>-8</sup> (5), 1.10<sup>-7</sup> (6) mol.l<sup>-1</sup> této látky v pitné vodě; SPE ze 100 ml pitné vody, eluce dvakrát 3 ml MeOH, odpaření a rozpuštění v 10 ml Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7,0. Vložena je závislost proudu prvního (A) a druhého (B) píku na koncentraci 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v pitné vodě



Obr. 4. DP polarogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu odpovídající koncentraci 0 (1), 2.10<sup>-9</sup> (2), 4.10<sup>-9</sup> (3), 6.10<sup>-9</sup> (4), 8.10<sup>-9</sup> (5), 1.10<sup>-8</sup> (6) mol.l<sup>-1</sup> této látky v pitné vodě; SPE z 500 ml pitné vody, eluce dvakrát 3 ml MeOH, odpaření a rozpuštění v 10 ml Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7,0. Vložena je závislost proudu prvního (A) a druhého (B) píku na koncentraci 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v pitné vodě

Tabulka II

Parametry kalibračních přímk stanovení 2-methyl-4,6-dinitrofenolu technikou DPP po SPE z pitné vody, eluce dvakrát 3 ml MeOH, odpaření a rozpuštění v 10 ml Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7,0

Objem vzorku [ml]	Pík	$c$ [mol l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [nA mol <sup>-1</sup> l]	Úsek [nA]	Koeficient korelace	L <sub>Q</sub> [mol l <sup>-1</sup> ]
100	1.	(2–10)·10 <sup>-8</sup>	-2,37·10 <sup>8</sup>	0,4	0,9990	1,6·10 <sup>-8</sup>
100	2.	(2–10)·10 <sup>-8</sup>	-1,98·10 <sup>8</sup>	0,2	0,9995	1,8·10 <sup>-8</sup>
500	1.	(2–10)·10 <sup>-9</sup>	-1,08·10 <sup>9</sup>	-0,1	0,9972	2,1·10 <sup>-9</sup>
500	2.	(2–10)·10 <sup>-9</sup>	-8,52·10 <sup>8</sup>	-0,2	0,9972	3,3·10 <sup>-9</sup>

Tabulka III

Parametry kalibračních přímk stanovení MDNF technikou DPP v BR pufru o pH 7 po SPE z říční vody, eluováno dvakrát 3 ml MeOH, odpařeno, rozpuštěno v 10 ml BR pufru o pH 7

Objem vzorku [ml]	Pík	$c$ [mol l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [nA mol <sup>-1</sup> l]	Úsek [nA]	Koeficient korelace	L <sub>Q</sub> [mol l <sup>-1</sup> ]
100	1.	(2–10)·10 <sup>-8</sup>	-2,24·10 <sup>8</sup>	0,4	0,9980	2,0·10 <sup>-8</sup>
100	2.	(2–10)·10 <sup>-8</sup>	-2,03·10 <sup>8</sup>	0,2	0,9994	1,9·10 <sup>-8</sup>
500	1.	(2–10)·10 <sup>-9</sup>	-8,13·10 <sup>8</sup>	0,1	0,9959	1,8·10 <sup>-9</sup>
500	2.	(2–10)·10 <sup>-9</sup>	-7,60·10 <sup>8</sup>	0,1	0,9943	4,1·10 <sup>-9</sup>

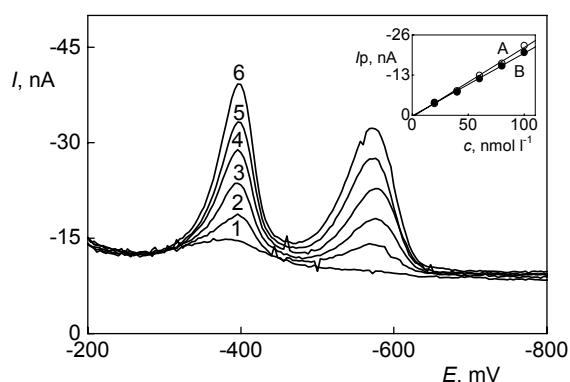
#### Extrakce tuhou fází z říční vody

Výtěžek SPE z říční vody, která představuje podstatně složitější matici nežli voda pitná, byl 97 % při extrakci 1.10<sup>-7</sup> mol l<sup>-1</sup> a 73 % při extrakci z 500 ml 1.10<sup>-8</sup> mol l<sup>-1</sup> 2-methyl-4,6-dinitrofenolu. Odpovídající DP polarogramy jsou na obr. 5 a 6 a parametry takto získaných kalibračních přímk jsou uvedeny v tabulce III, která dokumentuje praktickou použitelnost této techniky ke stanovení nano-

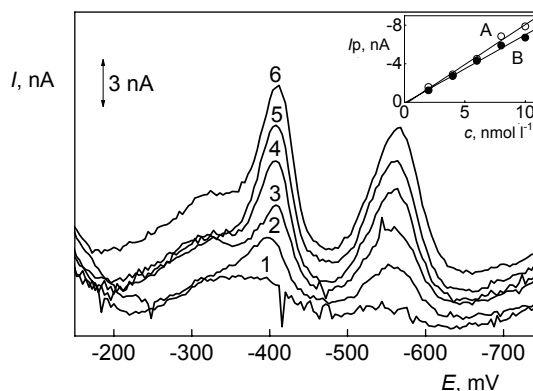
molárních koncentrací 2-methyl-4,6-dinitrofenolu i v poměrně komplikované matici reprezentované vltavskou vodou.

#### Závěr

Byly nalezeny podmínky umožňující rychlé a citlivé stanovení nanomolárních koncentrací genotoxického



Obr. 5. DP polarogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu odpovídající koncentraci 0 (1), 2.10<sup>-8</sup> (2), 4.10<sup>-8</sup> (3), 6.10<sup>-8</sup> (4), 8.10<sup>-8</sup> (5), 1.10<sup>-7</sup> (6) mol.l<sup>-1</sup> této látky v pitné vodě; SPE ze 100 ml říční vody, eluce dvakrát 3 ml MeOH, odpaření a rozpuštění v 10 ml Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7,0. Vložena je závislost proudu prvního (A) a druhého (B) píku na koncentraci 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v říční vodě



Obr. 6. DP polarogramy 2-methyl-4,6-dinitrofenolu odpovídající koncentraci 0 (1), 2.10<sup>-9</sup> (2), 4.10<sup>-9</sup> (3), 6.10<sup>-9</sup> (4), 8.10<sup>-9</sup> (5), 1.10<sup>-8</sup> (6) mol.l<sup>-1</sup> této látky v pitné vodě; SPE z 500 ml pitné vody, eluce dvakrát 3 ml MeOH, odpaření a rozpuštění v 10 ml Brittonova-Robinsonova pufru o pH 7,0. Vložena je závislost proudu prvního (A) a druhého (B) píku na koncentraci 2-methyl-4,6-dinitrofenolu v říční vodě

2-methyl-4,6-dinitrofenolu v pitné či říční vodě pomocí diferenční pulsní polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě po jeho předběžné separaci a prekoncentraci extrakcí tuhou fází.

*Tento výzkum byl finančně podporován Fondem rozvoje vysokých škol (grant G4/1865/2004).*

#### LITERATURA

1. Brown M. A, Chessin R. L.: Dinitroresols. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta 1995, str. 8.
2. Hrelia P., Morotti M., Scotti M.: Pharmacol. Res. Commun. 22, 93 (1990).
3. EPA: Health and Environmental Effects Profile for Dinitroresols. Environmental Protection Agency, Cincinnati 1988.
4. Kolektiv autorů SRS: Seznam registrovaných přípravků na ochranu rostlin 2000. Státní rostlinolékařská správa, Praha 2000.
5. Polák J.: Chem. Listy 77, 306 (1983).
6. Beňadiková H., Kalvoda R.: Anal. Lett. 17, 196 (1984).
7. Kotouček M., Halata M., Růžička J.: Acta Universita-  
tis Palackiana Olomucensis, Chemica XXXIII 117, 31(1994).
8. Fischer J., Berek J., Zima J.: Chem. Listy 97, 114 (2003).
9. Berek J., Kadeřábková M., Moreira J. C., Zima J.: Chem. Anal. (Warsaw) 50, 37 (2005).
10. Sýkora V., Zátka V.: Příruční tabulky pro chemiky. str. 149. SNTL, Praha 1967.
11. Meloun M., Militký J.: Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači. FINISH, Pardubice 1992.

**P. Jiřík, J. Fischer, and J. Berek** (*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Charles University, Prague*): **Extraction Polarographic Determination of Trace Amounts of 2-Methyl-4,6-dinitrophenol**

Optimum conditions are described for the determination of the toxic pesticide 2-methyl-4,6-dinitrophenol using differential pulse polarography at a classical dropping mercury electrode after preliminary separation and pre-concentration using solid phase extraction in Lichrolut EN (200 mg) SPE column. The limit of determination is around  $2 \cdot 10^{-9}$  mol l<sup>-1</sup> both for drinking and river water.

## Česká společnost chemická

vypisuje výběrové řízení na místo tajemníka společnosti

Požadujeme:

- VŠ chemického nebo přírodovědného směru,
- dobré organizační a komunikační schopnosti,
- znalost práce s PC,
- znalost jazyků (především angličtiny) nutná.

Nabízíme zajímavou, různorodou práci v příjemném pracovním prostředí v centru Prahy, nástup 1.10.2005.

Příhlášky spolu s životopisem a přehledem dosavadní praxe zašlete prosím obratem na adresu sekretariátu (ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1). Příhlášku je možné podat i elektronicky na e-mailovou adresu: mblahova@csvts.cz . Případné bližší informace lze získat na tel. číslo 222 220 184.

---

## VÝUKA CHEMIE

---

### Mimoškolní odborná činnost studentů Masarykovy střední školy chemické v Praze

MSSČH podporuje zájem studentů o odbornou činnost nad rámec školní výuky. V tom nám pomáhají tradičně velmi dobré vztahy s vysokými školami stejného zaměření – s Vysokou školou chemicko-technologickou a s Přírodovědeckou fakultou Univerzity Karlovy. Na těchto vysokých školách působí řada pedagogů, kteří začínali s chemií u nás v „Křemencárně“. Máme i kontakty s ústavu AV ČR i jinými odbornými pracovišti. Je třeba na tomto místě poděkovat všem lidem z těchto institucí, kteří se zcela nezištně věnují našim studentům jako jejich školiťel.

S odbornou činností mimo školu začínají studenti ve třetím, někdy již ve druhém ročníku. Ve svém volném čase docházejí na domluvené pracoviště. Musí se v principu seznámit s problematikou, o které často ještě ve škole neslyšeli (např. instrumentální analytické metody se probírají až ve 4. ročníku) a zvládnout nové laboratorní techniky. Používání výpočetní techniky je už pro ně samozřejmostí. Studenti se po závěru podílejí na řešení různých výzkumných úkolů příslušného pracoviště a jejich výsledky se mohou stát součástí odborných publikací. Výsledkem dlouhodobé práce studentů je sepsání práce a její předložení v tištěné a elektronické podobě.

Práci pak studenti prezentují na studentské odborné konferenci (dále SOK), která se koná obvykle v polovině listopadu a je velkou společenskou událostí školy. Svůj konferenční sál s veškerou technikou nám pro tuto událost propůjčuje Ústav makromolekulární chemie AV ČR.

SOK je zároveň školním kolem soutěže SOČ – středoškolské odborné činnosti v oboru chemie. Úroveň jednotlivých prací (v r. 2004 jich bylo 9) posuzuje odborná porota složená převážně z pedagogů VŠ, pracovníků AV nebo chemických podniků. Posuzuje se nejen obsah, forma a náročnost práce, ale i způsob prezentace a schopnost obhajoby. Pro každého účastníka soutěže je toto první veřejné vystoupení na tak velkém fóru cennou zkušeností. Obecenstvo tvoří studenti druhých až čtvrtých ročníků a pozvaní hosté. Tato konference je bezesporu motivujícím činitelem pro mladší studenty, neboť bezprostředně po ní se hlásí u učitelů zájemci o „sočku“. V posledních dvou letech se podařilo získat sponzora, kterým je ZENTIVA, a.s., a tak je možno studentům předat i zajímavou odměnu.

Naši studenti se svými pracemi zúčastňují soutěží pořádaných pro středoškoláky. Je to soutěž v rámci už zmíněné SOČ pořádaná MŠMT ČR (garantem je Institut dětí a mládeže) a soutěž vědecké a technické tvořivosti

mládeže pořádaná sdružením AMAVET.

V SOČ se soutěží v jednotlivých oborech a práce je prezentována před porotou stejně jako na naší SOK. Soutěž je tříkolová: školní – regionální – celostátní kolo. Do dalšího kola mohou postoupit vždy jen dvě práce, takže z našich devíti prací postupují dvě z oboru chemie do pražského kola, právě tak jako z jiné střední školy, kde více chemických prací není. Přesto nebo snad právě proto se naši žáci pravidelně umísťují v celostátním kole na předních místech. Výsledky od r. 2000 jsou na internetových stránkách školy [www.mssch.cz/dalši\\_aktivit/odborna\\_cinnost/SOČ](http://www.mssch.cz/dalši_aktivit/odborna_cinnost/SOČ). Nejúspěšnější řešitelé jsou navrhováni k ocenění Cenou Nadačního fondu Jaroslava Heyrovského, kterou loni mezi jinými získal náš student František Vlasák (nyní již student VŠCHT) za práci „Polarografické stanovení Dinocapu“.

Zcela jinak probíhá soutěž pod patronací Amavetu, které jsme se v r. 2004 zúčastnili poprvé. Je to soutěž multidisciplinární, takže se porovnávají práce ze všech přírodovědných a technických oborů. Student má k dispozici výstavní minitánek s panely, svou výšečnost a případně svůj počítač. Koná se přímo kolo regionální (jedno české v Příbrami, jedno moravské v Brně), z každého postupuje deset prací do národního kola v Praze (v prostorách AV ČR). Nejlepší práce pak mají možnost účasti na různých mezinárodních akcích. V r. 2004 se naši studenti zúčastnili mezinárodní výstavy vědeckých a technických projektů v SRN se dvěma pracemi. Práce našeho studenta Jakuba Višňáka (nyní již studenta MFF UK a současně jaderné chemie na FJFI) „Avoided crossing singletových stavů molekuly C<sub>2</sub> multireferenční metodou Coupled Clusters“ získala v soutěži Amavetu první místo. Proto ho také Amavet i škola nominovaly do soutěže Česká hlava v kategorii středoškolských studentů. Škola ho nominovala hlavně proto, že se jednalo o zcela výjimečný talent. Porota ho však k ocenění nevybrala.

V r. 2005 byly vybrány dvě práce našich studentů pro účast v zahraničí – jeden student se zúčastnil přehlídky vědeckých a technických projektů v Bruselu a jedna studentka má zajištěnu účast na nejprestižnější přehlídce INTEL ISEF v USA v r. 2006.

Účast v mimoškolní odborné činnosti a v soutěžích je zcela dobrovolná a přesto je o ni mezi studenty rostoucí zájem. Studenti navštěvují odborná pracoviště rádi, setkávají se tam se vstřícným přístupem, jsou tam zkrátka bráni jako partneři. Proto doufáme, že spolupráce se všemi partnery na VŠ a jiných pracovištích bude i nadále úspěšná.

*Jana Dudrová,  
Masarykova střední škola chemická*

## PRAKTICKÉ ÚLOHY Z KOLOIDNÍ CHEMIE

ALEŠ PANÁČEK a LIBOR KVÍTEK

*Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc  
panacek@prfnw.upol.cz*

Došlo 5.1.05, přijato 7.4.05.

Klíčová slova: školní úlohy, koloidní chemie

### Úvod

Tento příspěvek je volným pokračováním první části úloh zaměřených na koloidní chemii publikované v Chemických listech<sup>1</sup> a společně tak tvoří celek, jehož cílem je zaplnění mezery ve výuce koloidní chemie na základních a středních školách. Na rozdíl od prvního příspěvku, který byl svým obsahem určen zejména pro žáky základních škol (osvojení základních pojmů z koloidní chemie, příprava koloidních soustav a pozorování jejich typických vlastností), je tento článek svým teoretickým a praktickým zaměřením koncipován spíše pro žáky středních škol. Po hlubší diskusi vlastností koloidních soustav v teoretické části předkládá praktická část článku úlohy semikvantitativního charakteru, v nichž se sleduje stabilita koloidů za určitých fyzikálně-chemických podmínek. Teoretická a praktická část pak společně vytváří učební text, který lze přímo použít ve výuce chemie. I přes pokročilejší téma jsou v tomto textu opět předloženy pro žáky zajímavé a pro školu materiálově nenáročné praktické úlohy z koloidní chemie, které lze bez větších problémů realizovat ve středoškolských laboratořích.

### Koloidní soustavy

#### Teoretická část

Význam koloidní chemie vyplývá z širokého využití jejích poznatků jak v samotném chemickém výzkumu, tak i v chemickém průmyslu (odstranění průmyslových exhalací, čištění odpadních vod aj.). S koloidy se však také setkáváme běžně v životě, aniž bychom si to uvědomovali. Mléko, saponáty, mýdlo, masérské emulze, stavební hmoty, roztok škrobu, mlha, kouř, rozvířený prach, pěna – to je jen krátký výčet z ohromné skupiny koloidů v našem každodenním životě. Připomeňme si však nejprve, co slovíčko koloid vůbec znamená.

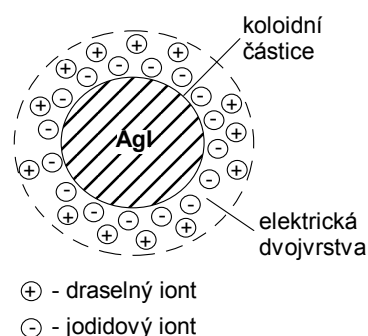
Koloid, přesněji koloidní soustava, obsahuje částičky určité chemické látky o velikosti přibližně 1–1000 nm rozptýlené v prostředí jiné chemické látky. Částice můžeme označit jako tzv. disperzní podíl (disperzní fáze) roz-

ptýlený v disperzním prostředí. Podle skupenského stavu disperzního podílu a disperzního prostředí (za normálních laboratorních podmínek) lze koloidní soustavy členit celkem do osmi skupin. Z nich jsou z hlediska použití v praxi významné soustavy, kde je disperzní prostředí tvořeno kapalnou látkou a disperzní podíl pevnou látkou. Tyto koloidní soustavy se nazývají soly. Jsou-li koloidní částice rozptýleny ve vodě, můžeme pak tyto soustavy označit jako hydrosoly (hydro = voda).

Koloidní soustavy lze dále podle chování koloidních částic k vodnému prostředí, v němž jsou rozptýleny, rozdělit na hydrofobní a hydrofilní.

Hydrofobní koloidní soustavy (-fobní je odvozeno od slova fobia = bát se) jsou většinou tvořeny částicemi anorganických látek (např. AgI, Fe(OH)<sub>3</sub>, Sb<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, stříbro, síra aj.) rozptýlenými ve vodném prostředí. Hydrofobní koloidní částice mají svou určitou stavbu, kterou můžeme jednoduše popsat např. na koloidní částici AgI (obr. 1). Koloidní jodid stříbrný lze připravit např. reakcí několika kapek roztoku dusičnanu stříbrného v nadbytku roztoku jodidu draselného. Koloidní částice AgI je tvořena určitým počtem neutrálních molekul (nemají elektrický náboj) jodidu stříbrného. Toto jádro je pak obklopeno naadsorbovanými jodidovými ionty, které jsou v roztoku v nadbytku. Díky této vrstvě naadsorbovaných iontů má částice AgI záporný náboj. Kolem vrstvy naadsorbovaných jodidových iontů se vytváří další vrstva iontů s opačným (kladným) nábojem a tvoří další vrstvu, tzv. kompenzující vrstvu (částečně kompenzuje, vyrovnává náboj částice – viz obr. 1). V případě naší koloidní částice AgI jsou to solvatované draselné ionty. Obě tyto vrstvy iontů a protiiontů tvoří tzv. elektrickou dvojvrstvu, která umožňuje vznik a stabilitu koloidních částic a ovlivňuje jejich chování v soustavě. Pokud by se nevytvořila elektrická dvojvrstva kolem částice AgI, nedošlo by ke vzniku stabilního koloidu, ale vznikla by sraženina AgI.

Koloidní částice AgI s kladným nábojem lze připravit rovněž smícháním několika kapek roztoku KI s nadbytkem roztoku AgNO<sub>3</sub>. Vrstvu naadsorbovaných iontů pak v tomto případě tvoří ionty stříbrné (jsou v roztoku v nadbytku) a kompenzující vrstvu tvoří solvato-

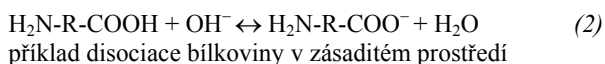
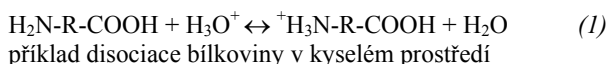


Obr. 1. Koloidní částice AgI se záporným elektrickým nábojem, který vytváří naadsorbované jodidové ionty. Kompenzující vrstvu vytváří solvatované draselné ionty K<sup>+</sup>

vané dusičnanové ionty ( $\text{NO}_3^-$ ).

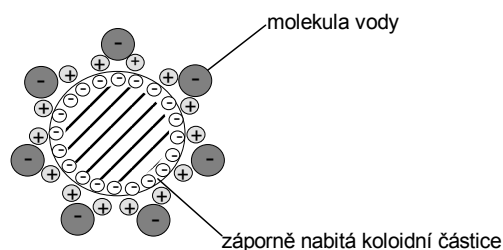
Většina vysoce koncentrovaných hydrofobních koloidních soustav se neudrží v koloidní formě nekonečně dlouhou dobu a jejich stabilitu lze počítat na hodiny až dny. Stabilitu těchto částic můžeme zcela zrušit, odstraníme-li existující elektrickou dvojvrstvu. Toho lze dosáhnout např. přidávkem dostatečného množství látky, jejíž kation nebo anion svým nábojem vykompenzuje náboj adsorbovaných iontů. Čím větší náboj nese, tím snadněji kompenzuje náboj iontů naadsorbovaných na koloidní částici. V případě záporně nabitých koloidních částic AgI se elektrická dvojvrstva snadněji zruší ionty  $\text{Zn}^{2+}$  než ionty  $\text{K}^+$ . Koloidní částice se pak vzájemně neodpužují a mohou se spojovat. Následně pak vznikají velké částice, které jsou vidět okem (sraženina). Tento proces se nazývá koagulace a velké částice postupně klesají na dno (sedimentují).

Hydrofilní koloidní soustavy (-filní je odvozeno od slova filé = mít rád) jsou tvořeny částicemi, u nichž jsou patrné přitažlivé interakce s molekulami vody (viz níže uvedený solvátový obal). Tyto koloidní soustavy jsou většinou tvořeny z makromolekul (látky obsahující vysoký počet vázaných atomů v molekule) a jsou vlastně jejich pravými roztoky. Příkladem mohou být bílkoviny, které se skládají z velkého počtu aminokyselin (stovky až tisíce). Molekuly bílkovin tedy tvoří ve vodě hydrofilní koloidní částice. Stavba těchto částic je jiná, než jak tomu bylo u částic hydrofobních. Molekula bílkoviny může mít v závislosti na pH prostředí buď kladný nebo záporný náboj. Zjednodušeně lze říci, že v kyselém prostředí ( $\text{pH} < 7$ ) dochází k disociaci zásaditých skupin v molekule bílkoviny a částice (bílkovin) budou mít náboj kladný (viz rovnice (1)). V prostředí zásaditém ( $\text{pH} > 7$ ) dochází k disociaci kyselých skupin v molekule bílkoviny a částice budou mít náboj záporný, jak ukazuje vztah (2). Takto se tedy vytvoří elektrický náboj částice tvořené makromolekulou bílkoviny.



Při určité hodnotě pH dochází k disociaci stejného počtu kyselých i zásaditých skupin v molekule bílkoviny, celkový elektrický náboj částice je pak nulový, a proto se koloid stává za těchto podmínek málo stabilním a jen malý podnět, jako je třeba přidavek méně polárního organického rozpouštědla (např. acetonu), vede k jeho vysrážení. Tato hodnota pH je specifická pro každou bílkovinu a nazývá se izoelektrický bod.

Na rozdíl od hydrofobních koloidních soustav jsou hydrofilní soustavy stabilní. Tento rozdíl ve stabilitě je dán tvorbou tzv. solvátového (hydrátového) obalu, který tvoří molekuly vody poutané na povrchu hydrofilních koloidních částic. Tvorba hydrátového obalu je umožněna polaritou vazby a tudíž existencí dipólu v molekule vody, který je způsoben různou elektronegativitou atomu vodíku



Obr. 2. Tvorba hydrátového obalu kolem záporně nabitých koloidních částic

a kyslíku. Koloidní částice se záporným nebo kladným nábojem obklopují molekuly vody orientované opačným nábojem k této koloidní částici (obr. 2). Hydrátový obal zvyšuje stabilitu hydrofilních koloidních částic, které se tak udrží v koloidní formě prakticky neomezeně dlouhou dobu, pokud nedojde ke změně podmínek. Proto lze hydrofilní koloidy využívat ke stabilizaci hydrofobních koloidních soustav. Hydrofilní částice se naadsorbují na částice hydrofobní a udělí jim tak hydrofilní vlastnosti. Koloidní roztoky s takovýmto účinkem nazýváme ochranné koloidy.

Přestože je stabilita hydrofilních koloidních částic poměrně vysoká, lze ji pomocí chemických nebo fyzikálních pochodů narušit nebo zcela zrušit. Příkladem může být srážení bílkovin roztoky obsahující ionty kovů (tzv. vysolování) nebo některými organickými látkami (ethanol, aceton). Stabilitu koloidního roztoku lze také zrušit např. účinkem vysoké teploty (vaječný bílek).

## Návody k praktickým úlohám z koloidní chemie

Níže uvedené úlohy nelze všechny zrealizovat v rámci jednoho laboratorního cvičení. Dvouhodinové laboratorní cvičení dovoluje provést pouze dvě praktické úlohy (doporučuji zařadit do cvičení společně úlohy 1 a 2 a nebo úlohy 3 a 4). Všechny úlohy jsou sestaveny jako úlohy žákovské.

### Koagulace hydrofobních koloidů

#### 1. Koagulace hydrofobního koloidu AgI

Pomůcky a chemikálie

Zkumavky, 10 ml pipety, odměrný válec,  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  roztok  $\text{AgNO}_3$ ,  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  roztok KI, roztoky elektrolytů –  $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  roztok citranu sodného a  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  roztok  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ , destilovaná voda.

Postup

Do stojanu si nachystáme devět zkumavek označených písmeny A až I pro přípravu koloidů AgI. Do zkumavek odpipetujeme množství roztoků  $\text{AgNO}_3$  a KI dle tabulky I. Roztoky pipetujeme do zkumavek tak, abychom vždy

roztok menšího objemu přidávali do roztoku v nadbytku. Nejprve provedeme koagulaci AgI (vznik sraženiny) pomocí citranu sodného. Elektrolyt přidáváme ke koloidu AgI, který je stabilizován nadbytkem buď jodidových nebo stříbrných iontů, postupně po 0,5 ml až do konečného objemu 3 ml. Do tabulky II symbolem „+“ zapíšeme vznik sraženiny ve vybrané zkumavce pro dané množství elektrolytu. Celý postup opakujeme i pro elektrolyt  $Zn(NO_3)_2$ .

## Závěr

Na základě vzniku sraženiny ve zkumavkách pro daný elektrolyt určíme znaménko náboje koloidních částic.

## Otázky

Vysvětlete princip koagulace pomocí elektrolytů. Popište stavbu koloidní částice AgI se záporným nábojem.

## Tabulka I

Množství roztoků  $AgNO_3$  a KI ve zkumavkách

Zkumavka	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Roztok $AgNO_3$ , ml	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Roztok KI, ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9

## Tabulka II

Výsledky koagulace

Elektrolyt	Objem [ml]	Zkumavka								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
Citran sodný	0,5									
Citran sodný	1									
Citran sodný	1,5									
Citran sodný	2									
Citran sodný	2,5									
Citran sodný	3									
$Zn(NO_3)_2$	0,5									
$Zn(NO_3)_2$	1									
$Zn(NO_3)_2$	1,5									
$Zn(NO_3)_2$	2									
$Zn(NO_3)_2$	2,5									
$Zn(NO_3)_2$	3									

## 2. Vliv želatiny a bílku na koagulaci hydrofobního koloidu AgI

## Pomůcky a chemikálie

Kádinka (200 ml), zkumavky, pipety, stojan, filtrační kruh, filtrační nálevka, vata,  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  roztok  $AgNO_3$ ,  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  roztok KI,  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  roztok citranu sodného, 1% roztok želatiny, vaječný bílek, destilovaná voda.

## Postup

Nejprve si připravíme roztok vaječného bílku z jednoho vejce ve 150 ml destilované vody, který přefiltrujeme přes vatu. Do třech zkumavek pak odměříme 9 ml roztoku dusičnanu stříbrného. Do první zkumavky odpipejeme 1 ml roztoku želatiny a do druhé 1 ml roztoku bílku. Třetí zkumavka je srovnávací, a proto do ní bílek či želatinu nepřidáváme. Potom přidáme do zkumavek 1 ml roztoku jodidu draselného. Takto připravené roztoky se snažíme koagulovat přidávkem 3 ml roztoku citranu sodného.

## Závěr

Určete, ve kterých zkumavkách došlo a ve kterých nedošlo ke koagulaci koloidu AgI a proč.

## Otázky

Vysvětlete pojem ochranný koloid. Která skupina koloidů se vyznačuje tímto ochranným účinkem?

## Koagulace hydrofilních koloidů

### 3. Určení izoelektrického bodu želatiny

## Pomůcky a chemikálie

Zkumavky, kádinky ( $2 \times 50 \text{ ml}$ ), aceton,  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  octan sodný,  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  kyselina octová,  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  kyselina octová, 1% želatina, destilovaná voda.

## Postup

Připravíme si sadu devíti zkumavek, do kterých odměříme objem příslušných roztoků dle tabulky III. Máme-li k dispozici pH-metr, překontrolujeme pH v jednotlivých zkumavkách. Poté začneme k jednotlivým zkumavkám

## Tabulka III

Objemy roztoků ve zkumavkách

Roztok	Zkumavka								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ octan sodný, ml	2	2	2	2	2	2	2	2	2
$0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselina octová, ml	0,12	0,25	0,5	1	2	4	–	–	–
$1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselina octová, ml	–	–	–	–	–	–	0,8	1,6	3,2
destilovaná voda, ml	3,88	3,75	3,5	3	2	–	3,2	2,4	0,8
1% želatina, ml	2	2	2	2	2	2	2	2	2
pH	6	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8	3,5



Tabulka IV  
Tabulka pro určení izoelektrického bodu

Objem přidávaného acetonu, ml	Zkumavka								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2									
4									
5									
6									
6,5									
7									
7,5									
8									
8,5									
9									
9,5									
10									
<i>pH</i>	6,0	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8	3,5

postupně přidávat množství acetonu podle tabulky IV a pozorujeme vznik nejprve zákalu a následně sraženiny ve zkumavkách. Vznik zákalu (označíme symbolem „\*“) a vznik sraženiny (označíme symbolem „+“) zapisujeme do tabulky IV.

#### Závěr

Z tabulky určíme izoelektrický bod želatiny, kterému odpovídá nejmenší spotřeba acetonu vedoucí ke vzniku sraženiny.

#### Otázky

Vysvětlete pojem izoelektrický bod. Jaký náboj budou mít koloidní částice bílkoviny v prostředí jehož  $pH = 11$ ?

#### 4. Koagulace roztoku vaječného bílku

##### Pomůcky a chemikálie

Zkumavky, kádinka (200 ml), stojan, filtrační kruh, filtrační nálevka, vata, aceton, vaječný bílek.

##### Postup

Vaječný bílek z jednoho vejce rozmícháme ve 150 ml destilované vody a roztok přefiltrujeme přes vatu. Do zkumavky pak odměříme 3 ml acetonu, ke kterému přikápneme

me 1 až 2 kapky roztoku bílku. Vznikne sraženina, kterou lze převést zpět do roztoku přidávkem 5 ml destilované vody.

#### Otázky

Uveďte jiné možnosti koagulace hydrofilních koloidů.

### Metodické poznámky

#### Úkol č. 1

- Koagulaci nelze provádět elektrolyty jako je síran sodný nebo fosforečnan draselný, protože by došlo k jejich reakci se stříbrnými ionty, které jsou v koloidu AgI s kladným nábojem v nadbytku. Stejně tak nelze provádět koagulaci elektrolyty jako je chlorid vápenatý nebo chlorid hlinitý.
- Ve zkumavce E dojde ihned po smíchání obou reagenčních ke vzniku sraženiny. Při ekvimolárním množství obou výchozích látek nedochází ke vzniku koloidního AgI. Ten je pouze silně žlutě zakalen bez viditelných částí sraženiny.

#### Úkol č. 3

- Jednotlivá množství kyseliny octové mohou žáci odměřit pomocí byrety. Množství destilované vody je možno zaokrouhlit na jedno desetinné místo.
- Ke koagulaci želatiny lze použít i ethanol, ale jeho spotřeba se pohybuje v rozmezí 20–22 ml v izoelektrickém bodě želatiny a nelze tak úkol provádět ve zkumavkách.
- Aceton patří mezi látky vysoce hořlavé F, rizikovost podle vět R 11-66-67, bezpečnost práce podle vět S (2-)9-16-26.

#### LITERATURA

1. Panáček A., Kvítek L., Klečková M.: Chem. Listy 98, 39 (2004).

**A. Panáček and L. Kvítek** (*Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*): **Colloid Chemistry in Laboratory Practice**

The aim of the article is to supply a current missing field of chemistry in grammar schools by project of simple practical problems from colloid chemistry. It contains theoretical part and practical problems focusing on physical and chemical properties of colloid chemistry.

## NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE

### KLASIFIKAČNÍ SYSTÉM LIPIDŮ

#### ARNOŠT KOTYK

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4  
kotyk@biomed.cas.cz

Došlo 13.5.05, přijato 30.5.05.

Klíčová slova: mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy, polyketidy

Kolektiv 17 autorů z různých severoamerických univerzit spolu s jednou holandskou, jednou rakouskou a dvěma japonskými připravil v dubnu 2005 souborný přehled všech známých lipidů, jemuž se dostalo pozhánání i na letošním zasedání komise IUBMB (Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii) a IUPAC (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii) pro biochemickou nomenklaturu. Jde o podklad pro systemizaci lipidů srovnatelnou s dalšími, již existujícími, databázemi makromolekul. A budeme mít základ pro lipidomiku!

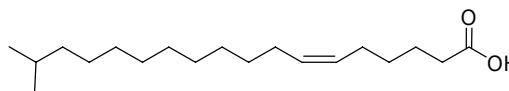
Dosavadní definice lipidů byly poměrně vágní – jsou to biologické látky většinou hydrofobního charakteru. Ve snaze o přístup rigoróznější byly lipidy definovány jako hydrofobní nebo amfipatické (či amfifilní) molekuly, vznikající buď karbaniontovou kondenzací thioesterů (mastné kyseliny, polyketidy, atp.) nebo karbokationtovou kondenzací isoprenových jednotek (prenoly, steroly, atp.). Zde navrhované kategorie lipidů zahrnují acylové deriváty mastných kyselin (v angličtině jsou to *fatty acyls*, tedy mastné acyly), dále glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy a polyketidy. V tomto systému se nevyskytují často uváděné glykolipidy, protože glykosylované lipidy jsou zařazeny do příslušných kategorií podle charakteru základního lipidu. Byla však zařazena kategorie sacharolipidů pro takové molekuly, v nichž je acylová skupina vázána přímo na cukernou kostru. Tento systém nezahrnuje ani lipoproteiny (konjugáty proteinů rozpustných ve vodě a lipidů) a proteolipidy (volně užívaný termín pro hydrofobní membránové lipidy s lipidovou částí kovalentně vázanou na některou z aminokyselin). Následuje stručný popis jednotlivých kategorií.

### 1. Acyly mastných kyselin (FA)

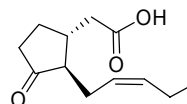
Jde o jednu ze základních a nejrozšířenějších kategorií, kterou lze rozdělit na 13 tříd a 43 podtříd. Třídy jsou tyto:

- FA01 Mastné kyseliny a jejich konjugáty
- FA02 Oktadekanoidy
- FA03 Eikosanoidy
- FA04 Dokosanoidy
- FA05 Alkoholy mastných kyselin
- FA06 Aldehydy mastných kyselin
- FA07 Estery mastných kyselin
- FA08 Amidy mastných kyselin
- FA09 Nitrily mastných kyselin
- FA10 Etery mastných kyselin
- FA11 Uhlovodíky
- FA12 Kyslíkaté deriváty uhlovodíků
- FA00 Jiné

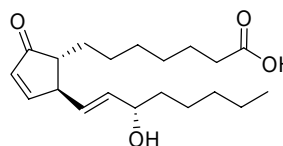
V této kategorii najdeme nejrůznější biologicky aktivní látky, jako je lipoová kyselina, biotin, jasmonová kyselina, prostaglandiny, leukotrieny, thromboxany, lipoxiny, karnitinové estery a další. Struktura některých zástupců této kategorie je ukázána ve vzorcích 1–6.



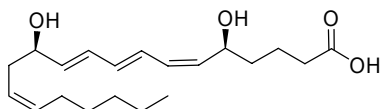
Vzorec 1. **Mastná kyselina: (6Z)-17-methyloktadec-6-enová kyselina**



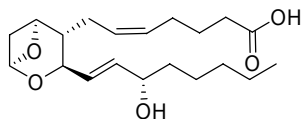
Vzorec 2. **Oktadekanoid: (1R,2R)-3-oxo-2-((Z)-pent-2-en-1-yl)cyclopentan-1-oxová kyselina**



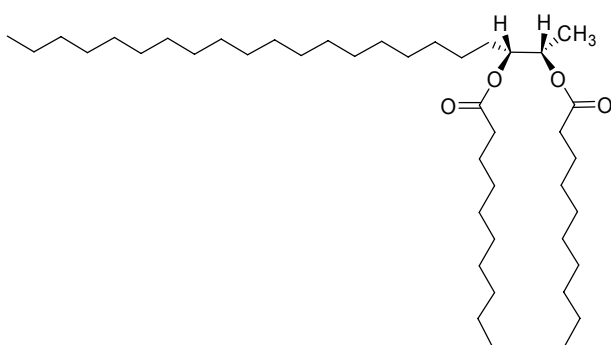
Vzorec 3. **Prostaglandin: (10Z,13E,15S)-15-hydroxy-9-oxo-prosta-10,13-dienová kyselina**



Vzorec 4. **Leukotrien: (5S,6Z,8E,10E,12R,14Z)-5,12-dihydroxykosa-6,8,10,14-tetraenová kyselina**



Vzorec 5: **Thromboxan: (5Z,9S,11S,13E,15S)-9,11-epoxy-15-hydroxythromboxa-5,13-dienová kyselina**

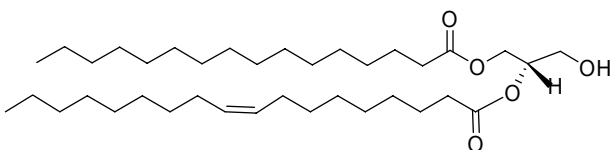


Vzorec 6. **Voskový ester: (2S,3R)-dokosan-2,3-diyl-didekanoát**

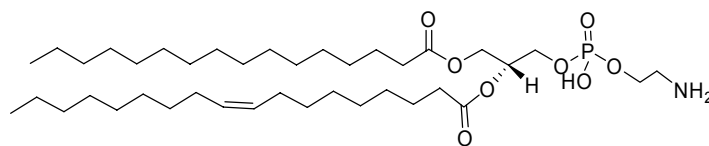
## 2. Glycerolipidy (GL)

Jde o složky buněčných membrán a zásobního tuku. Rozeznáváme tu 4 třídy a 19 podtříd. Třídy jsou tyto:

- GL01 Monoradylglyceroly
- GL02 Diradylglyceroly
- GL03 Triradylglyceroly
- GL00 Jiné

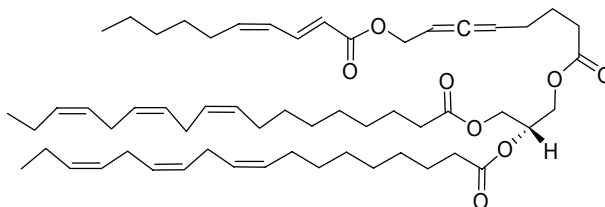


Vzorec 7. **Diradylglycerol: 1-hexadecanoyl-2-((9Z)-oktadec-9-enoyl)-sn-glycerol**



Vzorec 9. **Glycerofosfoethanolamin: 1-hexadecanoyl-2-((9Z)-oktadec-9-enoyl)-sn-glycero-3-fosfoethanolamin**

Jsou tu zahrnuty i makroergické etherové glycerolipidy z archebakteriálních membrán. Zařadili bychom sem i nedávno objevené ladderanové lipidy z anaerobních bakterií oxidujících amoniak, což jsou diethery glycerolu, kde jeden ze substituentů je na alkanový řetězec navázaný cyklohexan spolu s několika cyklobutanovými kruhy. Ukázky struktury jsou ve vzorcích 7 a 8.



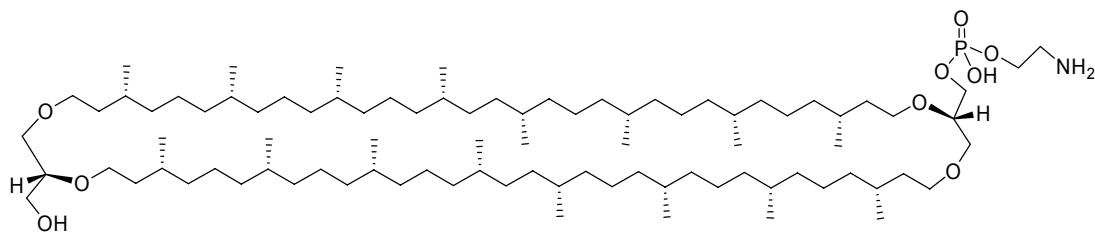
Vzorec 8. **Triradylglycerol: 1,2-di-((9Z,12Z,15Z)-oktadeca-9,12,15-trienoyl)-3-{8-(((2E,4Z)-deka-2,4-dienoyl)oxy)okta-5,6-dienoyl}-sn-glycerol**

## 3. Glycerofosfolipidy (GP)

Zástupci této kategorie jsou hlavními složkami buněčných membrán. Lze je rozdělit do 21 tříd a 117 podtříd. Třídy jsou tyto:

- GP01 Glycerofosfocholiny
- GP02 Glycerofosfoethanolaminy
- GP03 Glycerofosfoferiny
- GP04 Glycerofosfoglyceroly
- GP05 Glycerofosfoglycerofosfáty
- GP06 Glycerofosfoinositoly
- GP07 Glycerofosfoinositolmonofosfáty
- GP08 Glycerofosfoinositolbisfosfáty
- GP09 Glycerofosfoinositoltrisfosfáty
- GP10 Glycerofosfáty
- GP11 Glyceropyrofosfáty
- GP12 Glycerofosfoglycerofosfoglyceroly
- GP13 CDP-glyceroly
- GP14 Glycerofosfoglukosové lipidy
- GP15 Glycerofosfoinositolglykany
- GP16 Glycerofosfonocholiny
- GP17 Glycerofosfonoethanolaminy
- GP18 Diglyceroltetraetherové fosfolipidy (kaldarchoely)
- GP19 Glycerolnonitoltetraetherové fosfolipidy
- GP20 Oxidované glycerofosfolipidy
- GP00 Jiné

Ukázky struktury této kategorie jsou ve vzorcích 9 a 10.

Vzorec 10. Kaldarcheol: *sn*-kaldarcheo-1-fosfoethanolamin

#### 4. Sfingolipidy (SP)

Jde o komplexní kategorii látek, jejichž základní strukturou je sfingoidní báze, syntetizovaná ze serinu a dlouhého řetězce mastné kyseliny (resp. jejího koenzymu A).

Jsou to časté složky buněčných membrán, kde jejich cukerné substituenty mohou určovat i příslušnost k určité krevní skupině v AB0-systému. Tuto kategorii lze rozdělit do 10 tříd a 31 podtříd. Třídy jsou tyto:

SP01 Sfingoidní báze (sfingosiny)

SP02 Ceramidy

SP03 Fosfosfingolipidy

SP04 Fosfonosfingolipidy

SP05 Neutrální glykosfingolipidy

SP06 Kyselé glykosfingolipidy

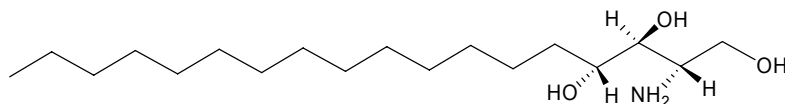
SP07 Zásadité glykosfingolipidy

SP08 Amfoterní glykosfingolipidy

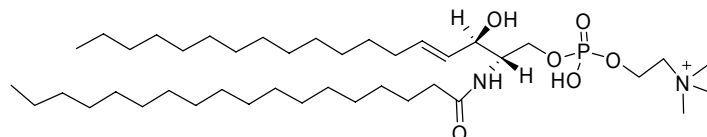
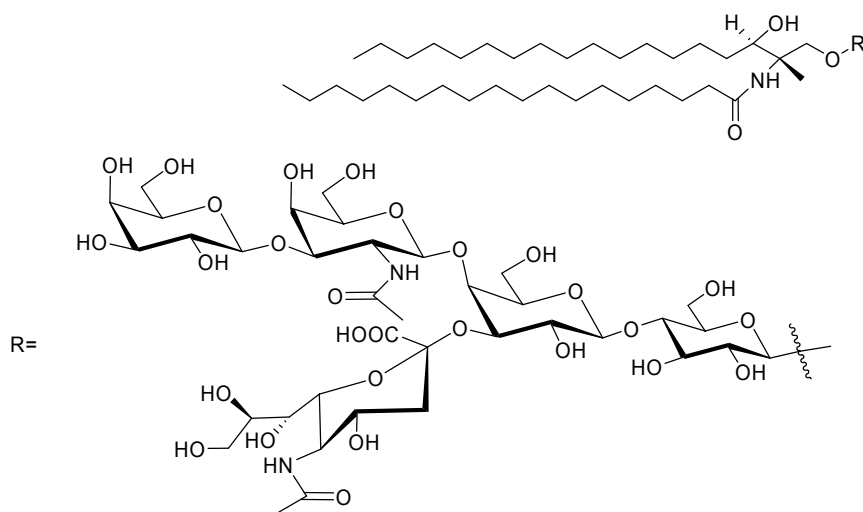
SP09 Arsenosfingolipidy

SP00 Jiné

Několik ukázek struktury sfingolipidů je ve vzorcích 11–13.



Vzorec 11. Sfingolipid: 4-hydroxysfinganin

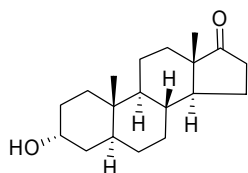
Vzorec 12. Sfingolipid: *N*-(oktadekanoyl)sfing-4-enin-1-fosfocholinVzorec 13. Sfingolipid:  $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glc-Cer (d18:1/18:0)

## 5. Sterolové lipidy (ST)

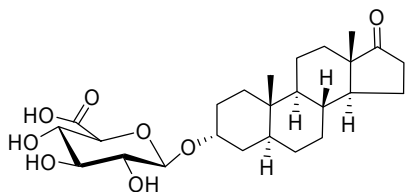
Sterolové lipidy plní nejrůznější funkce. Jsou to složky eukaryontních membrán, fungují jako hormony a signální molekuly, patří sem i vitamin D nebo žlučové kyseliny.

Kategorii lze rozdělit do 7 tříd a 18 podtříd. Třídy jsou tyto:

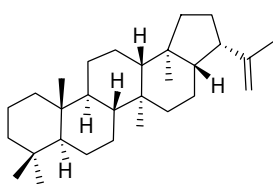
- ST01 Steroly
- ST02 Steroidy
- ST03 Sekosteroidy
- ST04 Žlučové kyseliny a deriváty
- ST05 Steroidní konjugáty
- ST06 Hopanoidy



Vzorec 14. Sterol: 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-on



Vzorec 15. Sterol: 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on-glukuronid



Vzorec 16. Hopanoid: hop-22(29)-en

ST00 Jiné

Některé struktury sterolových lipidů jsou ukázány ve vzorcích 14–16.

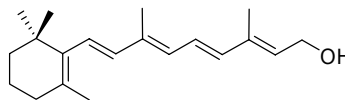
## 6. Prenolové lipidy (PR)

Prenoly se syntetizují z pětiuhlíkatých prekurzorů isopentenyl-difosfátu a dimethylallyl-difosfátu a tomu odpovídá i základní klasifikace terpenů. Hrají úlohu v

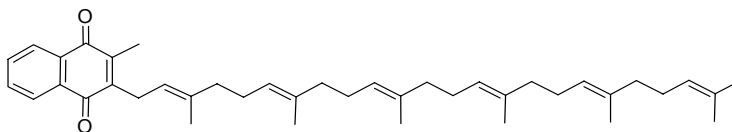
transportu oligosacharidů přes membrány a v různých glykosylačních reakcích. Rozeznáváme tu 4 třídy a 20 podtříd. Třídy jsou tyto:

- PR01 Isoprenoidy
- PR02 Chinony a hydrochinony
- PR03 Polyprenoly
- PR00 Jiné

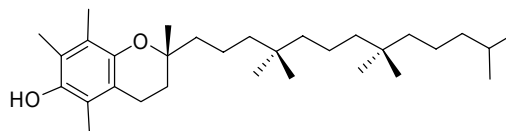
Ukázky struktur jsou ve vzorcích 17–19.



Vzorec 17. Isoprenoid: retinol



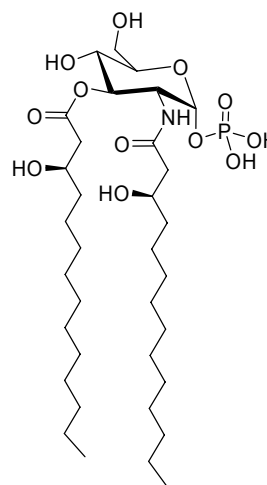
Vzorec 18. Prenolový lipid: 2-methyl-3-hexaprenyl-1,4-naftochinon (vitamin K)



Vzorec 19. Prenolový lipid: (2R,4'R,8'R)- $\alpha$ -tokoferol (vitamin E)

## 7. Sacharolipidy (SL)

V této skupině jde o látky, v nichž glycerol je nahrazen nějakým cukrem. Nejznámější z nich jsou glukosami-



Vzorec 20. Sacharolipid: lipid X

nové prekursory lipidu A v lipopolysacharidech gram-negativních bakterií. Rozeznáváme tu 5 tříd a 7 podtříd.

Třídy jsou tyto:

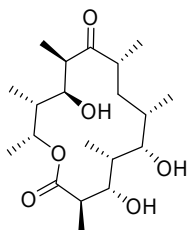
- SL01 Acylaminocukry
- SL02 Acylaminocukerné glykany
- SL03 Acyltrehalosy
- SL04 Acyltrehalosové glykany
- SL00 Jiné

Jedna typická struktura je ukázána ve vzorci 20.

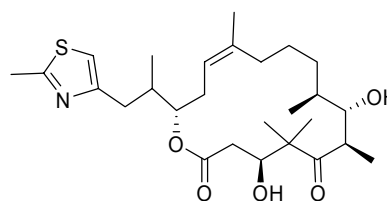
## 8. Polyketidy (PK)

Polyketidy jsou syntetizovány klasickými enzymy i iterativními a multimodulárními enzymy se semiautonomními aktivními místy. Mezi polyketidy patří řada antimikrobních, antiparazitických a kancerostatických látek (erythromycin, tetracykliny, nystatiny, avermektiny, epothilony). V této předběžné klasifikaci jsou zahrnuty 4 třídy:

- PK01 Makrolidové polyketidy
- PK02 Aromatické polyketidy
- PK03 Neribosomální peptido-polyketidové hybridy
- PK00 Jiné



Vzorec 21. **Polyketid: 6-deoxyerythronolid B**



Vzorec 22. **Polyketid: epothilon D**

Dvě ukázky jsou ve vzorcích 21 a 22.

Podrobnější, i když ne vždy úplné, informace na toto téma lze najít například na webových stránkách [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org) nebo [www.chem.qmul.ac.uk/iupac](http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac).

### A. Kotyk (*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Classification System of Lipids**

A new recommendation for classification of lipids was published, to be used particularly in biosciences. It consists of eight major groups, e.g. fatty acyls, glycerolipids, glycerophospholipids, sphingolipids, steroids, prenols, saccharolipids and polyketides. These groups are subdivided into a total of 69 classes and well over 200 subclasses.

## DISKUSE

### SCIENTOMETRIE A CHEMICKÉ LISTY

Diskuse k tématu čeština a angličtina v Chemických listech

RENÉ KIZEK

Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

#### Úvod

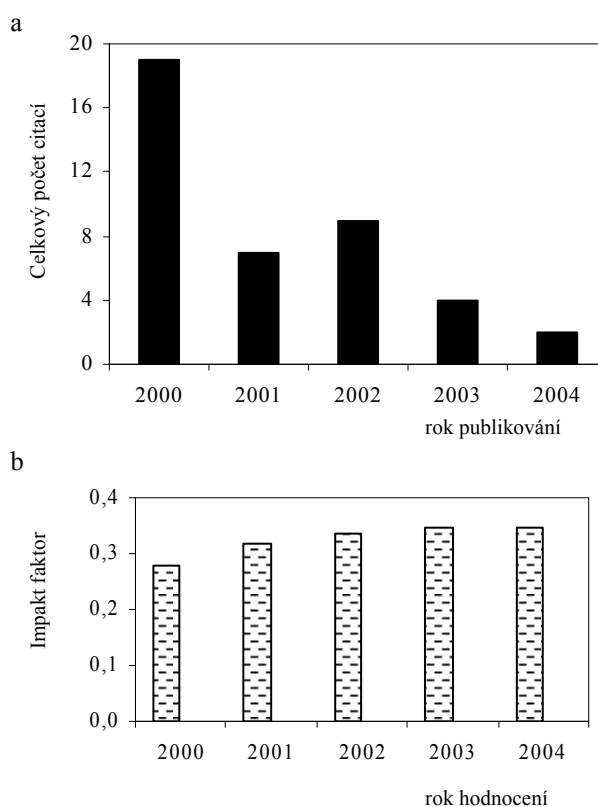
Velmi rád bych reagoval na úvodník v časopise Chemické listy<sup>1</sup>, který zcela jistě přináší celou řadu otázek, na které je potřebné hledat odpovědi. Je zřejmé, že časopis Chemické listy se snaží předkládat široké odborné, ale i laické veřejnosti, spektrum chemických článků. Většina publikovaných článků je ve formě přehledů (review) v co nejsrozumitelnější podobě. Za tuto popularizační činnost je skutečně třeba všechny redaktory časopisu velmi ocenit. Není asi nikdo, kdo by neslyšel od svých začínajících studentů: „A prosím Vás nemáte něco v češtině?“. A jaká je radost studenta, když řeknete: „Ano, mám“, v tuto chvíli jsou takové články opravdu nepostradatelné a mají skutečný smysl. Bohužel, ale kolik je takových českých studentů? Možná desítky či stovky a to je opravdu velmi málo. Má tedy taková relativně náročná práce smysl?

#### Impakt faktor

V době pravidelného hodnocení pracovního výkonu každého z nás podle počtu uveřejněných prací, konferencí, přednášek, obhájených diplomantů, doktorandů, sumy impakt faktorů a počtu citací, je otázkou, zda bude do časopisu Chemické listy psát zkušený a uznávaný odborník. Podle mého názoru je pak naprosto nezbytné sledovat jasný cíl, a tím je dosažení maximálního impakt faktoru časopisu<sup>2–8</sup>. Otázkou sledování a smyslu těchto scientometrických parametrů se zabývá celá řada výzkumníků a výsledky jsou prezentovány ve specializovaných časopisech<sup>9–11</sup>. Hlavní otázkou tedy zůstává, jaký cíl má časopis Chemické listy<sup>1,12–14</sup>. Chce redakce časopisu dosáhnout výrazného zvýšení impakt faktoru? Pravděpodobně ano. Impakt faktor se počítá jako podíl sumy publikovaných prací v předešlých dvou letech a počtu všech citací ve stejném období. Chemické listy publikovaly v roce 2002 devadesát tři článků a v roce 2003 šedesát osm článků, celkem tedy 161; počet citací v roce 2002 byl dvacet sedm a v roce 2003 dvacet devět, celkem 56. Vypočtený impakt faktor je tedy podíl  $56/161 = 0.348$ . Impakt faktor časopisu se velmi zvolna zvyšuje, viz obrázek, ale bez výrazné změny není pravděpodobně možné dosáhnout nárůstu tohoto ukazatele kvality časopisu. Pak tedy skutečně nezbyvá než otevřít časopis pro publikování celému světu. Pokud bude

tato změna nastolena, budou muset být publikovány především experimentální práce a to tedy v angličtině. Tím se podaří získat práce (méně kvalitní, ale i velmi dobré), které budou citovány. Je zcela zřejmé, že i v České republice je řada špičkových pracovišť a odborníků, kteří mohou svou práci časopisu pomoci. Na obr. 1 je ukázán počet citací u prací, které byly nejvícekrát citovány. Zcela excelentní byla práce kolegy Novotného<sup>15</sup>, která byla citována 19×. Díky takovým pracím bude časopis moci dosáhnout stanoveného cíle. Dalším významným mezníkem je také čas od zaslání článku k publikaci a dobou jeho skutečného publikování. Rychlost publikování práce skutečně přiláká nebo odradí autory od dalších publikací.

I přes to, co bylo napsáno výše, bych se velmi přimlouval, aby zůstala zachována část časopisu, kde by byly publikovány přehledné články v češtině s výrazně rozšířeným strukturovaným anglickým abstraktem a obrázky s anglickými popisky, zejména pro naše studenty a méně znalou laickou veřejnost.



Obr. 1. a – Nejcitovanější práce v Chemických listech v roce 2000<sup>15</sup>, 2001<sup>18</sup>, 2002<sup>19</sup>, 2003<sup>20</sup> a 2004<sup>21</sup>; b – trend impakt faktoru časopisu Chemické listy v letech 2000–2004<sup>22</sup>

**Pomůžte reklama?**

Předpokládám, že největším nepřítelem možných změn v Chemických listech nebudou lidé, ale finanční prostředky. Konzumní společnost přináší reklamu na ulicích, rozhlase, televizi na rozličné výrobky či služby. Je zajímavé, že podobný trend je pozorovatelný i u vědecko-populárních časopisů jako je 21. století, VTM-Science a dokonce i Vesmír. Proč neudělat podobnou reklamu i časopisu Chemické listy? Bylo by asi velmi vhodné upozornit na skutečnost, že v tomto časopise publikoval své práce profesor Heyrovský, Brdička<sup>16,17</sup> a jejich spolupracovníci (třeba na obálce časopisu, nebo krátkým šotem v Meteoru nebo Popularisu). Určitě by byla oslovena širší veřejnost a zcela jistě by to přispělo k vyššímu zájmu o časopis.

**LITERATURA**

1. Podešva J.: Chem. Listy, 99, 401 (2005).
2. Exner O.: Chem. Listy, 87, 719 (1993).
3. Leta J., Pereira J. C. R., Chaimovich H.: Scientometrics, 63, 599 (2005).
4. Gebler J.: Listy Cukrov., 118, 233 (2002).
5. Lopez-Abente G., Munoz-Tinoco C.: BMC Public Health, 5, Art. No. 24 (2005).
6. Moed H. F., van Leeuwen T. N.: Nature, 381, 186 (1996).
7. Adam D.: Nature, 415, 726 (2002).
8. Švec F.: Chem. Listy, 88, 672 (1994).
9. Rousseau R.: Scientometrics, 63, 431 (2005).
10. Sombatsompop N., Markpin T.: J. Am. Soc. Inf. Sci. Tec., 56, 676 (2005).
11. van Leeuwen T. N., Moed H. F.: Scientometrics, 63, 357 (2005).
12. Chuchvalec P.: Chem. Listy, 98, 319 (2004).
13. Podešva J.: Chem. Listy, 97, 245 (2003).
14. Vymětal J.: Chem. Listy, 93, 382 (1999).
15. Novotný L., Yosypchuk B.: Chem. Listy, 94, 1118 (2000).
16. Heyrovský J.: Chem. Listy, 40, 222 (1946).
17. Brdička R.: Chem. Listy, 39, 35 (1945).
18. Valentová K., Frček J., Ulrichová J.: Chem. Listy, 95, 594 (2001).
19. Navrátil T., Kopanica M.: Chem. Listy, 96, 111 (2002).
20. Klejdus B., Šterbová D., Stratil P., Kubáň V.: Chem. Listy, 97, 530 (2003).
21. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Havel L.: Chem. Listy, 98, 166 (2004).
22. [http://www.thomson.com/corp/contact\\_us/contact\\_us.jsp](http://www.thomson.com/corp/contact_us/contact_us.jsp) (2005).



**Česká společnost chemická,  
Ústav chemie a technologie sacharidů VŠCHT Praha  
a Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR**

pořádají

**konferenci „Struktura a biologické účinky polysacharidů a jejich derivátů“**

*11.11.2005, 8,30 až 16,00 h na Novotného lávce 5, Praha 1*

Předběžný program konference:

- Čopíková J.: Úvodní přednáška
- Synytsya A.: Deriváty pektinu
- Marounek M.: Metabolismus pektinu a fyziologické účinky jeho derivátů
- Jablonský I.: Glukany v bazidiomycetách a jejich specifika
- Maryška M.: PM polysacharidů a dalších přírodních materiálů
- Erban V.: Testování polysacharidů jako prebiotika
- Spěváček J.: Strukturální charakterizace  $\beta$ -glukanů  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopii pevného stavu
- Šimánek V.:  $\beta$ -Oligofruktany z jakonu (*Smallanthus sonchifolius*) jako prebiotika v doplňcích stravy
- Větvička V.
- Posterová sekce

Vložené 500 Kč zahrnuje CD s plnými texty přednášek. Abstrakta budou publikována v Chemických listech č. 9/2005.

Je možné zajistit ubytování na kolejích na Jižním městě. Předpokládá se i zájem pasivních účastníků bez odborného příspěvku.

Bližší informace na adrese <http://www.multiweb.cz/polysacharidy> . Kontaktní adresa: ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1, tel.: 221 082 370, tel/fax: 222 220 184, e-mail: [chem.listy@csvts.cz](mailto:chem.listy@csvts.cz)

**Česká společnost průmyslové chemie,  
Fakulta životního prostředí  
Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem  
a Spolek pro chemickou a hutní výrobu, a.s. Ústí nad Labem**

pořádají

2. ročník konference

**BEZPEČNOST V CHEMICKÉM PRŮMYSLU**

*19.–20. září 2005*

Rektorát Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem

Přednášky a odborné příspěvky budou zaměřeny na oblasti:

- zdroje rizik v chemickém průmyslu, podstata nebezpečí a možnosti ochrany proti nim, ochranná legislativa související s rizikem chemických výrob
- metody hodnocení a analýzy rizika
- likvidace havárií a způsoby tlumení jejich následků
- vztah chemického průmyslu a veřejnosti

Kontakt: [mblahova@csvts.cz](mailto:mblahova@csvts.cz)



ÚOCHB AV ČR

September 9, 2005

# Invited Lecture Series

Topic: Molecular Assembly

## Molecular Assembly and Encapsulation

Reversible encapsulation creates spaces where molecules are temporarily isolated from others in solution. We describe here the unique behavior that emerges from reversible encapsulation, including new forms of stereochemistry, isomerism, asymmetry and reactivity of molecules held at close range. Questions such as: What's it like inside? What are the rules that govern the inner space? Does catalysis occur inside? Can the space be made chiral? will be addressed in the context of reversible encapsulation complexes.

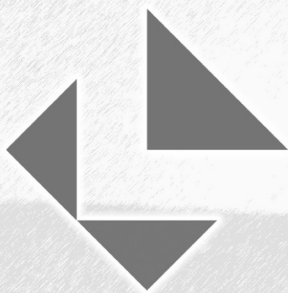
**Speaker: Professor Julius Rebek, Jr.**

The Skaggs Institute for Chemical Biology,  
The Scripps Research Institute, La Jolla, USA

ÚOCHB AV ČR

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

Lecture Hall 10:00 am



# LABORATOŘ

## 2005

Kongresové centrum Praha  
14.–15. 9. 2005

## Výstava s odborným doprovodným programem na téma LABORATORNÍ TECHNIKA, VYBAVENÍ, POMŮCKY A SLUŽBY LABORATOŘÍ

### Zaměření

**LABORATOŘ 2005** – výstava otevřená všem typům laboratorní praxe – provozním, analytickým, biochemickým, vodohospodářským, kontrolním, poloprovozním, školním a univerzitním laboratořím, které lze najít v celé sféře průmyslu, vědy, školství a služeb.

Je koncipována jako významné setkání dodavatelů s uživateli laboratorní techniky. Svou koncepcí zve na přehlídku nejnovější laboratorní techniky, vybavení a služeb laboratoří a doprovodného odborného programu, vyplněného přednáškami na témata souvisejícími s provozem laboratoří a zacházením s přístroji a chemickými látkami.

**ZAREGISTRUJTE SE** a získejte volný přístup na výstavu bez nutnosti další registrace, katalog, program odborných přednášek, aktuality z průběhu přípravy výstavy, drobný reklamní předmět a poukaz na malé občerstvení.

### Navštivte

- **Odborné a firemní přednášky a prezentace** – motto doprovodného programu: „*Nové poznatky správné laboratorní a výzkumné praxe a jejich aplikace do každodenní činnosti*“.
- **MEETING POINT** – prostor vyčleněný pro odpočinek účastníků s postery, nabídkou oborových časopisů, pracovních příležitostí, škol a výzkumných ústavů a občerstvením.
- **e-výstavu** – na [www.laborator2005.cz](http://www.laborator2005.cz). Seznam vystavovatelů s odkazem na jejich web stránky, nomenklatura, tiskové zprávy, novinky vystavovatelů, seznam odborných přednášek a prezentací.

### Základní nomenklatura

Laboratorní technika pro všeobecné použití • Analytické přístroje a technika • Chemikálie, reagenty a diagnostika • Laboratoř vodárenská a kontroly ŽP • Laboratoř povrchových úprav, metalurgická a plastikářská • Biochemická a farmaceutická laboratoř • Služby laboratoří • Literatura, časopisy, informační zdroje, databáze • Burza pracovních a studijních příležitostí

### Mediální partneři

**CHEMmagazín** – Hlavní mediální partner a organizátor  
Casopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi

Chemické listy **plasty a kaučuk**

mlékařské listy **zpravodaj**

ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
**FARMACIE**  
CASOPIS ČESKÉ FARMACEUTICKÉ SPOLEČNOSTI  
A SLOVENSKÉ FARMACEUTICKÉ SPOLEČNOSTI



**LABORATORNÍ PRŮVODCE**

[www.chemweb.cz](http://www.chemweb.cz)

**Industry EU**  
informační systém pro průmysl  
[www.industry-eu.com](http://www.industry-eu.com)

[www.LABORATOR2005.cz](http://www.LABORATOR2005.cz)

<b>OBSAH</b>		<b>CONTENTS</b>	
<b>ÚVODNÍK</b>	569	<b>EDITORIAL</b>	569
<b>REFERÁTY</b>		<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Stacionární fáze v afinitní chromatografii</b>	570	<b>Stationary Phases for Affinity Chromatography</b>	570
T. Vařilová		T. Vařilová	
<b>Stanovenie arzénu v biologickom materiáli a vo vzorkách životného prostredia technikami atómovej absorpčnej spektrometrie</b>	578	<b>Determination of Arsenic in Biological and Environmental Samples by AAS techniques</b>	578
I. Hagarová a M. Žemberyová		I. Hagarová and M. Žemberyová	
<b>Alternativní výklad vlivu bazicity prostředí v koncepci kyselin a zásad</b>	585	<b>An Alternative Explanation of the Influence of Medium Basicity in the Acid-Base Concept</b>	585
P. Pavlát, J. Hlaváč a V. Bekárek		P. Pavlát, J. Hlaváč, and V. Bekárek	
<b>LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY</b>		<b>LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS</b>	
<b>Určení dostupnosti amidovaných pektinů pro mikroorganismy tračniku</b>	591	<b>Assay of Availability of Amidated Pectins for Colon Microorganisms</b>	591
M. Marounek, A. Synytsya, J. Čopíková a K. Sirotek		M. Marounek, A. Synytsya, J. Čopíková, and K. Sirotek	
<b>Použití techniky difuzního gradientu v tenkém filmu při charakterizaci půd</b>	594	<b>Application of Diffusive Gradients in Thin Film Technique to Soil Characterization</b>	594
V. Řezáčová-Smetková, B. Dočekal a H. Dočekalová		V. Řezáčová-Smetková, B. Dočekal, and H. Dočekalová	
<b>Extrakčně-polarografické stanovení stopových množství 2-methyl-4,6-dinitrofenolu</b>	600	<b>Extraction Polarographic Determination of Trace Amounts of 2-Methyl-4,6-dinitrophenol</b>	600
P. Jiřík, J. Fischer a J. Barek		P. Jiřík, J. Fischer, and J. Barek	
<b>VÝUKA CHEMIE</b>		<b>EDUCATION IN CHEMISTRY</b>	
<b>Mimoškolní odborná činnost studentů Masarykovy střední školy chemické v Praze</b>	605	<b>Specialised Extracurricular Activity of Students From the Masaryk Secondary School of Chemistry in Prague</b>	605
J. Dudrová		Jana Dudrová	
<b>Praktické úlohy z koloidní chemie</b>	606	<b>Colloid Chemistry in Laboratory Practice</b>	606
A. Panáček a L. Kvítek		A. Panáček and L. Kvítek	
<b>NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE</b>		<b>NOMENCLATURE AND TERMINOLOGY</b>	
<b>Klasifikační systém lipidů</b>	610	<b>Classification System of Lipids</b>	610
A. Kotyk		A. Kotyk	
<b>DISKUSE</b>	615	<b>DISCUSSION</b>	615

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 99 (2005), čís./no. 8 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 129, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 115 • 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 • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: M. Bláhová, I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvicka (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • 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; t el/fax +420 222 220 184, e-mail: mblahova@csvts.cz, simanek@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 © 2005 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plně předplatné 2005 (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 2005 (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 27.7.2005.**