

SPOLEČNÉ KOŘENY ČESKÝCH A RAKOUSKÝCH CHEMIKŮ



Nedávné odhalení pamětní desky Josefu Loschmidtovi (1821–1895) v Ostrově nad Ohří, kde jsem měl tu čest a potěšení být přítomen, připomnělo českým a rakouským chemikům jejich společné vědecké a ekonomické kořeny. Vývoj chemie ve střední Evropě byl ovlivněn předními univerzitami habsburské monarchie v Praze a Vídni, které vytvářely tvůrčí a stimulující prostředí pro řadu vědeckých osobností 18. a 19. století. S prvními profesurami chemie na těchto univerzitách, ustavenými v letech 1811, resp. 1838, byly položeny základy pro vznik dnešních chemických ústavů v našich zemích. Naš chemický průmysl a obchod vznikal na těch místech v severních Čechách, na Slovensku, v okolí Prahy a Vídne, která jsou v habsburské monarchii poprvé spojována s hornictvím. Prvního shromáždění chemiků Rakouska, 28. února 1887, se zúčastnilo přes 100 chemiků ze všech částí habsburské monarchie. Ačkoliv na tomto shromáždění bylo rozhodnuto založit chemickou společnost, trvalo to ještě 10 let, než byla v roce 1897 ustanovena „Verein Österreichischer Chemiker“. Počet členů rychle vzrůstal z počátečních 700 na 1300, které společnost měla na konci monarchie.

Proč jsem začal tento úvodník pohledem o dvě století zpět? Naše země putovaly společně určitým úsekem historie a později byly odděleny na několik desetiletí fyzickou i ideologickou bariérou. V roce 2004 Česká republika vstoupí do Evropské unie, jejímž členem je Rakousko již zhruba jednu dekádu, takže obě země budou opět součástí velkého politického uskupení. To, co kdysi bylo považováno za nepřekonatelnou překážku, zmizelo během několika let a je dnes minulostí. Ve vědě našťastí takové bariéry nikdy neexistovaly, a proto jsou vědci předurčení k tomu, aby hráli důležitou roli při dalším zlepšování vztahů mezi sousedy a při politickém sjednocování Evropy. Chemické společnosti České republiky a Rakouska mají méně prostředků než chemické společnosti větších zemí v Evropě, ale naším vkladem je právě společná minulost.

Než se budu zabývat budoucností, dovoluji mi uvést několik údajů o dnešní Rakouské chemické společnosti (GÖCh). Ta má okolo 1900 členů a je organizována v 6 regionálních sekcích a 17 tematických pracovních skupinách, pokrývajících všechny obory. Naši členové reprezentují celé spektrum chemie: pracují v průmyslu, v obchodě, v akade-

mické sféře a ve veřejné správě. Učitelé chemie mají svou vlastní, velmi úspěšnou organizaci, Společnost učitelů chemie Rakouska (VCÖ), s kterou GÖCh úzce spolupracuje. „Všední“ práce GÖCh se odehrává v regionálních sekcích a pracovních skupinách; nejviditelnější „centrální“ aktivitou je komunikace prostřednictvím dvojměsíčníku Chemie-Report.at a naší domácí stránky (www.goech.at), dále udělování několika cen za úspěchy v chemii jak studentům, tak renomovaným vědcům a pořádání naší národní chemické konference jednou za dva roky. Novinkou bude pořádání prvního Rakouského týdne chemie (25. 9. – 2. 10. 2004), kdy chceme mnoha akcemi a aktivitami v celé zemi upoutat pozornost veřejnosti na chemii jako na důležitou vědeckou a průmyslovou oblast.

Existuje velká snaha koncipovat Evropskou chemickou společnost. Podporuji existenci takové společnosti jako platformy pro jednotlivce organizované v národních chemických společnostech. Je mimo diskusi, že mnoho věcí důležitých pro chemii, např. lobování v Evropské komisi, strategie zlepšení obrazu chemie u veřejnosti nebo definování standardů chemického vzdělání, může být účinně prosazeno pouze na evropské úrovni. Není to ovšem míněno tak, že bychom se vzdali národních chemických společností. Naopak, se silnou Evropskou chemickou společností mohou národní chemické společnosti lépe řešit své domácí problémy. Umím si představit, že mezi evropskou platformou a národními společnostmi budou hrát důležitou roli jakési „klastry“ společností, které by se přirozenou cestou vytvářely mezi sousedními zeměmi. Zvláště společnosti malých zemí budou moci společně řešit problémy dané limitovanými zdroji: samy dosud nemohou svým členům poskytnout všechny potřebné služby a jejich osamocené hlas není dostatečně slyšet na evropské úrovni. Regionální „klastrování“ by nám mohlo dát příležitost tyto služby zlepšit a naši pozici posílit. Toho může být dosaženo koordinací jistých činností u takových problémů, které je lepší řešit v rámci bi- nebo multinacionální spolupráce.

*Tím se dostávám zpět k začátku svého úvodníku. Lze do-
ložít, že chemický průmysl a věda našich dvou zemí vycházejí ze společných kořenů. Doufám, že můžeme spojit alespoň něco z našeho úsilí k formování společné budoucnosti.*

Vídeň, prosinec 2003

Ulrich Schubert
prezident Rakouské chemické společnosti

CHEMICKÉ VLASTNOSTI, BIOLOGICKÉ ÚČINKY A METODY DETEKCE BIOLOGICKÉHO OXIDU DUSNATÉHO

ZDEŇKA KUPKOVÁ a LUDĚK BENEŠ

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,
Palackého 1-3, 612 42 Brno
kupkova@vfu.cz

Došlo 17.12.02, přepracováno 12.5.03, přijato 30.12.03.

Klíčová slova: oxid dusnatý, detekce, NO-syntasa

Obsah

1. Úvod
2. Chemické vlastnosti a reakce oxidu dusnatého
3. Biosyntéza oxidu dusnatého
4. Biologické účinky oxidu dusnatého
 - 4.1. Fyziologická funkce NO
 - 4.2. Patofyziologická funkce NO
5. Analýza oxidu dusnatého a jeho metabolitů
 - 5.1. Přímá stanovení
 - 5.1.1. Chemiluminiscence
 - 5.1.2. Elektrochemická (amperometrická) detekce
 - 5.1.3. Elektronová spinová (paramagnetická) rezonance ESR (EPR)
 - 5.2. Nepřímá stanovení
 - 5.2.1. Griessova metoda
 - 5.2.2. Oxidace hemoglobinu
 - 5.2.3. Fluorescenční detekce
 - 5.2.4. Chemiluminiscenční reakce NO s luminolem
 - 5.2.5. Přeměna argininu na citrulin
 - 5.2.6. Analýza dusitanů a dusičnanů metodou HPLC
 - 5.2.7. Ostatní metody
6. Závěr

1. Úvod

V roce 1980 objevil a popsal Robert Furchgott biologický účinek endoteliálního relaxačního faktoru (EDRF). V roce 1987 bylo zjištěno, že EDRF je identický s oxidem dusnatým¹. Jeho biochemickou tvorbu objasnil Moncada v r. 1989. Oxid dusnatý se stal jednou z nejsledovanějších molekul posledních 10 let. Roku 1992 časopis *Science* vyhlásil oxid dusnatý molekulou roku, v roce 1998 Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro a Ferid Murad získali Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství „za klíčové objevy týkající se NO jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému“ (cit.²).

Oxid dusnatý působí jako mediátor v imunitním systému, uplatňuje se ve vazomotorice i při neurotransmisí³⁻⁵. Nejvýznamnější odlišností NO od jiných mediátorů

je jeho schopnost difundovat volně a rychle přes membrány, tzn. působit na okolní buněčné elementy bez ohledu na anatomické spojení.

Intenzivní studium oxidu dusnatého a jeho metabolitů dalo vzniknout novému termínu: „reaktivní formy dusíku“ (reactive nitrogen species, RNS), což jsou sloučeniny primárně odvozené od oxidu dusnatého⁶.

2. Chemické vlastnosti a reakce oxidu dusnatého

Oxid dusnatý je v atmosférických podmínkách dráždivým plynem, který přispívá k znečišťování ovzduší. Za standardních podmínek je koncentrace oxidu dusnatého v nasyceném vodném roztoku asi 2 mM (cit.⁷).

Je relativně stabilním radikálem s 15 elektrony (jeden je nepárový), a proto bývá označován též NO[•]. Odstraněním antivazebného elektronu z NO vzniká nitrosoniový ion NO⁺. Redukcí NO (přidáním elektronu) vzniká nitroxylový ion NO⁻.

S kyslíkem reaguje NO podle rov. (1) za vzniku oxidu dusičitého NO₂, což je hnědý jedovatý plyn, rovněž radikál. Reakce je 1. řádu vzhledem ke kyslíku a 2. řádu vzhledem k NO. Poločas této reakce není konstantní, ale závisí na počáteční koncentraci (2). Čím je koncentrace NO vyšší, tím rychleji reakce s kyslíkem probíhá⁸.

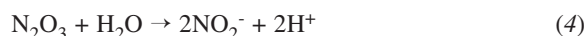


Oxid dusičitý může dimerizovat v bezbarvou formu (N₂O₄ – dimer NO₂), která už nemá charakter radikálu. Vyskytuje se především v atmosféře jako polutant⁸. Při vystavení vyšším dávkám oxidu dusičitého (nebo jeho dimeru) dochází k poškození epitelálních buněk dýchacích cest, včetně fibrózy, která může být smrtelná⁹.

Oxid dusičitý jako oxidační činidlo reaguje s nenasyčenými mastnými kyselinami za vzniku allylového radikálu a kyseliny dusité, jakožto možného zdroje karcinogenních nitrosaminů. Patologické následky má i nitrace tyrosinu v proteinech způsobená NO₂, která vede k destrukci tkání⁸. Reakcí (3) oxidu dusičitého s oxidem dusnatým vzniká oxid dusitý, který je vlastním nitrosylačním činidlem. Jeho tvorba je usnadněna v hydrofobním prostředí proteinů micelární katalýzou¹⁰.

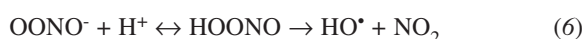


Hlavním rozkladným produktem vodného roztoku oxidu dusnatého jsou dusitany, které se v přítomnosti hemoproteinů oxidují až na dusičnany (4).



Rychlost autooxidace závisí na koncentraci NO a kyslíku⁷. Oxid dusnatý nereaguje v anaerobních podmínkách. Ve tkáních reaguje kyslík s oxidem dusnatým v hydrofobním prostředí membrán, reakce zde probíhá 300× rychleji než ve vodě¹¹.

Patologicky významná je reakce NO se superoxidem ($O_2^{\bullet -}$), při níž vzniká toxický peroxodusan ($OONO^-$)^{12,13} (5). Za fyziologického pH existuje v protonované formě jako kyselina peroxydusitá, která se rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý (6).



Toxicita peroxodusitanu pramení z oxidace SH skupin bílkovin, atomů železa a síry v biologických molekulách a z peroxidace lipidů. Může indukovat poškození DNA a apoptózu⁶.

In vivo se oxid dusnatý v přítomnosti akceptorů elektronů (přechodné kovy, NO_2) snadno slučuje s fenoly, thioley a se sekundárními aminy. Reaguje jako elektrofilní nebo jako oxidační činidlo. Reakcí se železem v erytrocytech vzniká methemoglobin, vazbou na železo enzymu guanylátcyklyazy stimuluje syntézu cyklického guanosinmonofosfátu vedoucího k vazodilataci¹⁴.

Nitrosylace¹⁵ je jednou z rozšířených modifikací bílkovin, vyskytující se za fyziologických i patologických podmínek. Nitrosylačním činidlem je oxid dusitý. S-Nitrosylsloučeniny mohou sloužit jako zdroj oxidu dusnatého.

3. Biosyntéza oxidu dusnatého

Oxid dusnatý vzniká¹⁶⁻¹⁸ oxidací guanidinového dusíku aminokyseliny L-argininu působením NO-syntasy za vzniku L-citrulinu. NO-syntasa (NOS) byla izolována v několika formách, které se mezi sebou liší subcelulární lokalizací, kinetikou, způsobem aktivace, a tedy i funkcí. Konstitutivní (stále přítomné – cNOS) se nachází v buňkách endotelu a v neuronech. Aktivují se vazbou vápenatých iontů na kalmodulin. Další dvě jsou induktivní (iNOS) a jsou obsaženy v makrofázích, hepatocytech, srdečních myocytech a dalších buňkách. Aktivují se jen po stimulaci těchto buněk. Všechny isoenzymy NOS obsahují hemové železo (protoporfyrin IX), flavinmononukleotid (FMN), flavinadeninindinukleotid (FAD), jako kofaktor potřebují nikotinamidadeninindinukleotidfosfát (NADPH) a tetrahydrobiopterin. Katalyticky účinné jsou jen ve formě dimerů a jsou stereospecifické.

NO-syntasy se též klasifikují podle svého zdroje na endotelovou (eNOS), neuronovou (nNOS) a makrofágovou nebo-li indukibilní NO-syntasu (iNOS).

4. Biologické účinky oxidu dusnatého

NO je buněčný posel, který difuzí ovlivňuje fyziologicky i patofyziologicky různé typy savčích buněk.

4.1. Fyziologická funkce NO

Oxid dusnatý stimuluje aktivitu solubilní guanylátcyklyazy, a tím reguluje syntézu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), který vyvolává prostřednictvím cGMP-dependentní proteinkinasy vazodilataci¹⁹. V imunitním systému se účastní nespecifické obrany organismu hlavně proti prvokům, některým bakteriím, virům a nádorům, zasahuje do procesu fagocytózy a zánětu. Také indukuje tvorbu interferonu γ , který působí antivirově²⁰.

V kardiovaskulárním systému se oxid dusnatý podílí na udržování tonu cév a krevního tlaku, inhibuje adhezi i agregaci trombocytů, tlumí aktivaci leukocytů a má antiproliferační účinek²¹.

V centrálním nervovém systému působí jako buněčný posel. Hraje roli při morfogenezi mozku, reguluje tvorbu synapsí, výbojovou aktivitu neuronů, výdej neurotransmiterů. NO je považován za jeden z mediátorů bolesti, může hrát určitou roli při vzniku morfinové tolerance i při závislosti na kokainu a alkoholu²².

Oxid dusnatý inhibuje apoptózu (geneticky programovaná smrt buněk) tím, že inhibuje (prostřednictvím cGMP a G-kinasy) apoptické fosforylační signály. Současně přímo inhibuje kaspasy (specifické proteasy, které obsahují v aktivním místě cystein, s možností S-nitrosylace oxidem dusnatým)²³.

Oxid dusnatý relaxuje střešní hladkou svalovinu včetně svěračů, prostřednictvím vazodilatace způsobuje erekci. Selektivním inhibitorem enzymu rozkládajícího cGMP (fosfodiesterasa typu 5) v corpus cavernosum je sildenafilcitrát (ViagraR), léčivo používané k terapii erektilní dysfunkce²⁴.

Oxid dusnatý významně ovlivňuje renální hemodynamiku a tubulární funkce. Zvýšená produkce NO v glomerulech infiltrovaných leukocyty přispívá k udržení perfuze glomerulů a k inhibici trombózy²⁵.

Oxid dusnatý má klíčový význam pro obranné schopnosti mukózní vrstvy gastrointestinálního traktu. Má ochranný vliv na mukózu žaludku, napodobuje některé funkce prostaglandinů²⁶.

Inhalace NO jako selektivního plicního vazodilatancia je úspěšně používána pro léčbu akutních i subakutních plicních hypertenzních stavů²⁷.

4.2. Patofyziologická funkce NO

Oxid dusnatý se účastní septického šoku²⁸, může být klíčovou molekulou při migréně i jiných vaskulárně podmíněných bolestech hlavy²².

Snížená koncentrace NO je jedním z faktorů hypertenze a erektilní dysfunkce²⁴.

Inhibitory indukibilní NOS mají pozitivní vliv u artritíd, zánětů²⁹, bronchiálního astmatu. Pravidelné měření exhalovaného NO je novou neinvazivní metodou umožňující kontrolu astmatu. Bylo potvrzeno, že hladina vydechaného NO je jedním z markerů stavu zánětu dýchacích cest³⁰.

Je pravděpodobný vliv NO při rozvoji Alzheimerovy choroby a epilepsie, kdy přemíra NO má neurotoxické účinky vyvolané hlavně jeho reakcí se superoxidem³¹.

Vliv oxidu dusnatého se uplatňuje i u očních chorob, kde se patologicky projevuje nejen jeho snížená, ale i zvýšená produkce (hlavně tvorba dalších RNS, cit.³²).

Autooxidací NO vzniklá nitrosylační činidla mohou poškozovat deaminací báze DNA a tak vyvolat mutace³³.

Existuje i vztah mezi diabetem a volnými radikály. U nemocných s diabetem 1. typu (insulindependentní diabetes mellitus) jsou β -buňky Langerhansových ostrůvků ničeny autoimunitní reakcí, způsobenou antigen-specifickými protilátkami a reaktivními formami kyslíku a dusíku – hlavně peroxodusitanem³⁴.

Oxid dusnatý je zapojen i v onemocněních gastrointestinálního traktu, jako je porucha motility (NO je extrémně důležitý u regulace průchodu tráveniny nebo pro tonus svěračů), vředová choroba. Jeho nadměrná tvorba je spojena se zánětlivým onemocněním střev (kolitidou)³⁵.

5. Analýza oxidu dusnatého a jeho metabolitů

Oxid dusnatý je *in vivo* tvořen v malém množství a rychle reaguje s kyslíkem, thioly, hemoglobinem a jinými látkami. Proto je jeho existence velice krátká (3–5 s). Stanovit ho lze přímo nebo nepřímo z jeho produktů.

5.1. Přímá stanovení

5.1.1. Chemiluminiscence

Luminiscenční analýza je založena na měření luminiscenčního záření, které zkoumaný vzorek emituje. Luminiscencí rozumíme vlastní záření látky ve viditelné oblasti spektra nebo blízko ní, které zpravidla vzniká po nebo při ozáření této látky. Luminiscenční záření není tepelným zářením, má jinou vlnovou délku než záření primární a trvá i po přerušení primárního záření. Zdrojem excitace u chemiluminiscence je energie chemické reakce³⁶.

NO reaguje s ozonem (7) za tvorby oxidu dusičitého v excitovaném stavu. Při návratu excitovaných molekul na základní hladinu je přebytečná energie emitována ve formě světla (8).



Intenzita chemiluminiscence je přímo úměrná koncentraci NO. Vlnová délka emitovaného světla leží v červené a infračervené oblasti spektra (640–3000 nm). Přestože jsou detektory emitovaného světla citlivé jen v oblasti vlnových délek pod 900 nm, patří metoda chemiluminiscence k nejcitlivějším metodám pro stanovení NO – detekční limit je 1–2 pM (cit.^{27,37}). Pro vysokou rychlost reakce NO s O_3 a citlivost detekce emitovaného světla je možné měřit hladinu NO v reálném čase, a to v plynné i v kapalně fázi. Lze stanovovat i oxidační produkty NO, ale až po převedení dusičnanů na dusitany (např. bakteriálními reduktasami nebo

kadmíem) a jejich redukci zpět na NO (v kyselém prostředí vzniká z dusitanu nitrosoniový ion, který je možné redukovat např. jodidem nebo dvojmocným vanadem na NO)³⁷.

Tato metoda je použitelná např. k měření NO ve vydechovaném vzduchu během konstantního výdechového proudu³⁸.

5.1.2. Elektrochemická (ampérometrická) detekce

Biologický poločas oxidu dusnatého (řádově sekundy) a jeho produkci jednotlivými buňkami je možné sledovat ampérometricky³⁹. Referenční elektroda je nejčastěji Ag/AgCl ponořená do roztoku NO. Na pracovní elektrodě je odevzdáván elektron za vzniku NO^+ . V přítomnosti OH^- vzniká HNO_2 a dusitany mohou být dále oxidovány na dusičnany. Množství oxidovaného NO je úměrné proudu protékajícímu mezi elektrodami. Původně používaná Clarkova platínová elektroda je dnes nahrazována uhlíkovou elektrodou modifikovanou porfyrinem, která je potažena vrstvou Nafionu (kationový iontoměnič odpuzující negativně nabitě ionty, např. NO_2^-). Využívána je i elektroda z polykrystalické platiny, vykazující vyšší účinnost oxidace NO, potažená vrstvou Nafionu a acetátem celulosy⁴⁰. Nejnovější přístroje jsou založeny na mikročipovém senzoru, jehož citlivost je 16 pA/nM NO s detekčním limitem přibližně 300 pM (cit.⁴¹).

Byl připraven biosenzor selektivní na NO na bázi optických vláken založený na měření změn fluorescence způsobené cytochromem c, který je označen fluorescenčním barvivem a zabudován do senzoru. Detekční limit je 20 μM (cit.⁴²).

Kalibrace NO senzoru je založena na vzniku oxidu dusnatého z dusitanu nebo na rozkladu donoru NO *N*-acetyl-*S*-nitroso-DL-penicillaminu⁴³ či na užití standardního NO roztoku připraveného z plynného NO. Elektroda citlivá na NO byla např. použita k přímému měření NO *in vivo* v žiludeční mukózní vrstvě během ischemické reperfuze⁴⁴.

5.1.3. Elektronová spinová (paramagnetická) rezonance ESR (EPR)

Po vložení látky s nepárovým elektronem (radikálu) do vnějšího magnetického pole dochází k orientaci magnetického momentu elektronu do dvou povolených orientací, které se liší energií. Dodáním záření o vhodné energii lze změřit hodnotu rozdílu mezi oběma spinovými stavy elektronu. Záznamem měření je spektrum ESR (cit.⁴⁵).

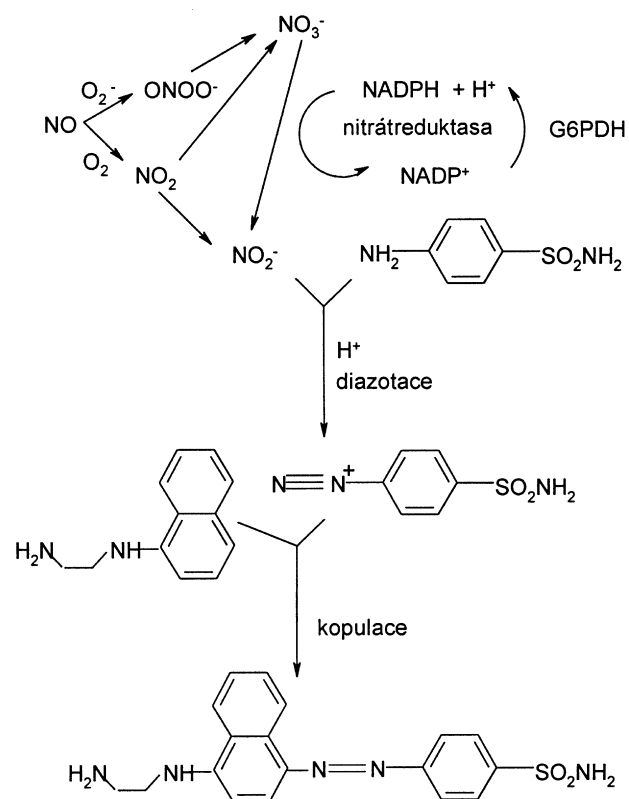
NO obsahuje v molekule 11 valenčních elektronů, ale ESR spektrum vzniká u volné molekuly NO, jen pokud je v excitovaném stavu. Pro detekci NO se užívá metoda zachytu spinu, kdy reakcí radikálu s diamagnetickou látkou náchylnou k tvorbě komplexu vzniká radikál, který má delší biologický poločas, a tím i lepší detegovatelnost. NO tvoří komplex nejčastěji s přechodnými kovy (Fe^{2+}), thioly nebo s reaktivními kyslíkovými centry. Pro zachycení NO se nejčastěji používá Fe^{2+} -*N*-methyl-D-glukamin-dithiokarbamat⁴⁶ nebo hemoglobin⁴⁷. Detekční limit vzniklých nitro-

soslučenin nebo methemoglobinu je přibližně 1 nM (cit.⁴⁸).

5.2. Nepřímá stanovení

5.2.1. Griessova metoda

Je založena na spektrofotometrickém stanovení dusitanů po diazotaci sulfanilamidu a kopulaci s *N*-(1-naftyl)ethylen-diaminem⁴⁹ (viz obr. 1) s detekcí v oblasti při 540 nm. V biologických vzorcích musí být dusičnany (vzniklé reakcí NO s hemoglobinem) zpět zredukovány na dusitany, které podléhají reakci, čímž je zajištěno stanovení celkové hladiny oxidačních produktů NO.



Obr. 1: Reakční mechanismus NO při Griessově reakci (8)

Při analýze séra musí být před stanovením provedena deproteinizace (např. ultrafiltrací). K redukci nitrátů se nejčastěji používá NADPH-dependentní nitrátreduktasa. Vyšší koncentrace NADP⁺ inhibuje Griessovu reakci. Proto se do reakční směsi přidává glukosa-6-fosfátdehydrogenasa a glukosa-6-fosfát, které NADP⁺ regenerují na redukovanou formu koenzymu.

Významné je postupné přidávání obou složek Griessova činidla pro dosažení maximální citlivosti testu. Pokud reaguje postupně kyselý roztok sulfanilamidu a pak teprve

N-(1-naftyl)ethylen-diamin, je reakce téměř třikrát citlivější než v případě, kdy se obě složky smíchají před přidáním do reakční směsi⁵⁰. Úskalím metody je možnost interference antikoagulantů nebo hemoglobinu ve vzorcích plazmy⁵¹. Kalibrační křivka s limitem citlivosti 5 μM (cit.⁵⁰) je sestavena pomocí vodného roztoku dusitanu sodného.

5.2.2. Oxidace hemoglobinu

Reakcí oxyhemoglobinu (Fe²⁺) s NO vzniká methemoglobin (Fe³⁺) a dusičnan (9).



Výhodou reakce je její vysoká rychlost (probíhá 26× rychleji než autooxidace NO), nenáročnost provedení, možnost měření *in vivo* i *in vitro* a vysoká citlivost a specifita pro NO (cit.⁵²). Spektrum oxyhemoglobinu je charakterizováno intenzivním absorpčním pásem s maximem při 415 nm a dvěma užšími absorpčními maximy při 542 nm a 577 nm. Methemoglobin vykazuje hlavní absorpční maximum při 406 nm (cit.⁵³).

NO je detegován díky charakteristické změně absorpčního maxima hemoglobinu z 415 nm (oxyHb) na 406 nm (metHb). Měřit lze i konverzi oxyhemoglobinu na redukováný methemoglobin jako rozdíl absorbance při 401 nm a 411 nm (izosbestický bod, cit.⁵³). Při měření chalkonů (prekurzory flavonoidů, u nichž ještě nedošlo k úplné cykлизaci na flavonoidní skelet) jako inhibitorů NO (cit.⁵⁴) byla sledována tvorba methemoglobinu pomocí poklesu absorbance oxyhemoglobinu při 576 nm.

Detekční limit metody pro měření NO *in vivo* je 1–10 nM (cit.⁵²).

5.2.3. Fluorescenční detekce

Pro fluorescenční detekci NO se užívají různé aromatické diaminy, např. naftalen-2,3-diamin (DAN, cit.⁵⁵) či 4,5-diaminofluorescein (DAF-2, cit.⁵⁶), které v přítomnosti kyslíku reagují s NO za vzniku triazolů. Metoda není selektivní pro NO, neboť reagují i dusitany. Schopnost DAF-2 detegovat NO je vyšší v přítomnosti dvojmocných kationů. Vápník zvyšuje signál NO uvolněného z NO donoru 200×. Současně bylo pozorováno zvýšení fluorescence s rostoucí dobou osvětlení⁵⁷.

Protože DAN je málo rozpustný ve vodě, není příliš vhodný pro měření biologických vzorků. Rozpustnější je 5,6-diaminonaftalen-1,3-disulfonová kyselina (DANDS) s maximem absorbance při 267 nm (cit.⁵⁸). DANDS reaguje s NO za vzniku 1*H*-naftotriazol-6,8-disulfonové kyseliny (NTADS) s maximem absorbance při 415 nm. Přirozená fluorescence DANDS je velice nízká a zvyšuje se reakcí s NO. Intenzita fluorescence je měřena při 428,8 nm s excitací při 302,4 nm. Měření se provádí na fluorescenčním spektrometru nebo metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Detekční limit je 0,6 nM (cit.⁵⁸).

5.2.4. Chemiluminiscenční reakce NO s luminolem

Luminol (5-aminoftalazin-1,4(2*H*,3*H*)-dion) je široce užívané chemiluminiscenční činidlo pro detekci reaktivních forem kyslíku a dusíku v biologickém systému. Oxid dusnatý reaguje s peroxidem vodíku za vzniku peroxodusitanu, který oxiduje luminol a vyvolá emisi chemiluminiscenčního záření.

Metoda byla použita při studiu patofyziologické role oxidu dusnatého v ledvinách potkanů u hypertenze⁵⁹. Detegovaná koncentrace NO uvolněného po průniku ledvinami byla 39 pM.

Yao a spol.⁶⁰ používají metodu pro měření NO *in vivo*, kde je vzorek odebrán mikrodiálýzou a detekce NO probíhá chemiluminiscenčně pomocí luminolu. Speciální mikrodiálýzační sonda je vysoce selektivní pro NO. Systém byl užit pro měření NO v krvi a tkáních a je dostatečně citlivý na změny koncentrace NO, způsobené teplotou nebo efekty donorů NO. Validovaný lineární rozsah metody je 5 nM až 1 μM s detekčním limitem 1 nM.

Je užívána i metoda založená na spojení chemiluminiscenční detekce NO (peroxodusitanu) luminolem a průtokové injekční analýzy (FIA, cit.^{61,62}). NO vzniká reakcí jodidu s dusitanem, prochází selektivní membránou a reaguje s peroxidasou za vzniku stabilnějšího komplexu. Ten po denaturaci uvolňuje NO, který je detegován technikou FIA na základě chemiluminiscence vznikající při reakci s luminolem. Detekční limit metody je 0,9 μM (cit.⁶¹).

Peroxodusitan může být k chemiluminiscenčnímu detektoru přiváděn dialýzační, vysoce selektivní membránou z acetátu celulosy. Metoda má vysokou citlivost, detekční limit je 10 pM (bez dialýzační membrány) a 100 pM (s dialýzační membránou)⁶².

5.2.5. Přeměna argininu na citrulin

Schopnost tkání nebo buněk využívat generovaný NO může být sledována na základě tvorby citrulinu z argininu v přítomnosti NOS kofaktorů FAD, FMN, NADPH, tetrahydrobiopterinu, vápníku a kalmodulinu (v případě NOS neuronové nebo endotelové). Reakci iniciuje radionuklidem označený arginin, terminační účinek má EDTA při pH 5,5, která váže vápník, což vede k inaktivaci enzymů. Vzorek prochází katexem. Za těchto podmínek se arginin váže na iontoměničiči, zatímco citrulin je eluován a měřen scintilačním počítacem⁶³.

Přeměna argininu na citrulin NO-syntasou a tvorba NO *in situ* může být monitorována metodou FIA s chemiluminiscenční detekcí⁶⁴. Imobilizovaná NOS produkuje NO v množství úměrném koncentraci L-argininu. Kalibrační křivka se sestrojí s argininem, mez detekce je 0,5 mM (cit.⁶⁴).

5.2.6. Analýza dusitanů a dusičnanů metodou HPLC

Pro současné měření dusitanů i dusičnanů v plazmě byla vypracována metoda HPLC s detekcí spektrofotometric-

kou⁶⁵ nebo elektrochemickou (především amperometrickou nebo coulometrickou⁶⁶). V práci⁶⁷ je pro simultánní měření dusitanů i dusičnanů užívána metoda HPLC se 2 detektory. Prvním je DAD detektor, detegující dusitany a dusičnany při 212 nm a druhým je citlivější elektrochemický detektor s elektrodou ze skelného uhlíku, monitorující dusitanové ionty. Detekční limit pro dusitany je při použití UV-VIS detektoru 0,1 μM a u elektrochemického detektoru 0,001 μM; pro dusičnany s UV-VIS detekcí je 0,2 μM.

Dusitany lze měřit také pomocí HPLC s fluorescenční detekcí po jejich derivatizaci naftalen-2,3-diaminem za tvorby 3,4-dihydro-1,2,4-triazaaanthracenu (excitace při 375 nm a emise při 415 nm). Detekční limit metody je 10 nM (cit.⁶⁸).

Další metoda HPLC je založena na nitrosaci dusitanu a *N*-acetyl-L-cysteinu na *N*-acetyl-S-nitroso-L-cystein, který je detegován při 333 nm. Mez detekce je 50 nM (cit.⁶⁹).

Pro stanovení dusitanů a dusičnanů byla vypracována také metoda iontové chromatografie^{70,71} s detekcí konduktometrickou, spektrofotometrickou (214 nm) a elektrochemickou.

5.2.7. Ostatní metody

Pro detekci plynného NO se používá hmotnostní spektrometrie⁷², pro detekci dusitanů plynová chromatografie⁷³, případně kombinace plynové a hmotnostní spektrometrie (GC-MS)⁷⁴. Pro analýzu a detekci vazeb NO se užívá infračervená spektrometrie⁷⁵. Dusitany a dusičnany se dají stanovit také kapilární elektroforézou⁷⁶, případně polarografií^{77,78}.

6. Závěr

Oxid dusnatý je v přítomnosti kyslíku reaktivním a nestálým radikálem s krátkým poločasem. Podléhá snadno oxidaci, reaguje se železem hemoglobinu, případně se superoxidem. Má funkci neurotransmiteru, účastní se nespecifické obrany organismu, například při chronických zánětech (revmatoidní artritida, bronchiální astma), při ateroskleróze, diabetu, epilepsii a septickém šoku. Výzkum metod stanovení oxidu dusnatého a objev potenciálních léčiv, která by byla schopná zasahovat do procesu tvorby a působení NO, patří k novým přístupům v ovlivnění zánětlivých, autoimunitních, neurodegenerativních a dalších civilizačních chorob.

*Práce byla realizována v rámci řešení Výzkumného zá-
měru FaF VFU č.1637 0003.*

LITERATURA

1. Palmer R. M. J., Ferrige A. G., Moncada S.: *Nature* 327, 524 (1987).
2. Müllner M.: *Br. Med. J.* 317, 1031 (1998).

3. Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A.: *Pharmacol. Rev.* 43, 109 (1991).
4. Sedláček J.: *Čs. Fyziol.* 42, 11 (1993).
5. Butler A. R., Williams D. L. H.: *Chem. Soc. Rev.* 22, 233 (1993).
6. Patel R. P., McAndrew J., Sellak H., White R., Jo H., Freeman B. A., Darley-Usmar V. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 385 (1999).
7. Kelm M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 273 (1999).
8. Thomas G.: *Medicinal Chemistry. An Introduction*, kap. 11. Wiley, Chichester 2001.
9. Last J. A.: *Environ. Health Perspect.* 102, 179 (1994).
10. Nedospasov A., Rafikov R., Beda N., Nudler E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13543 (2000).
11. Liu X., Miller M. J., Joshi M. S., Thomas D. D., Lancaster J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2175 (1998).
12. Vinten-Johansen J.: *Circ. Res.* 87, 170 (2000).
13. Butler A. R.: *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 18 (1995).
14. Štípek S., v knize: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci* (Štípek S. ed.), str. 29. Grada, Praha 2000.
15. Keshive M., Singh S., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R., Deen W. M.: *Chem. Res. Toxicol.* 9, 988 (1996).
16. Bergendi L., Ferenčík M., v knize: *Volné radikály a antioxidanty v medicíně (II)* (Ďuračková Z. ed.). SAP, Bratislava 1999.
17. Billiar T. R.: *Nitric Oxide. Ann. Surg.* 221, 339 (1995).
18. Vetrovský P., Entlicher G.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 62, 1355 (1997).
19. Schmidt H. H. W., Lohmann S. M., Walter U.: *Biochim. Biophys. Acta* 1178, 153 (1993).
20. Ferenčík M., Štvrtinová V., Kačáni L.: *Fórum Imunol.* 2, 128 (1994).
21. Moncada S.: *J. Hypertens.* 12, S35 (1994).
22. Němečková V.: *Psychiat.* 3, 174 (1999).
23. Stefanelli C., Pignatti C., Tantini B., Stanić I., Bonavita F., Muscari C., Guarnieri C., Clo C., Calderera C. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1450, 406 (1999).
24. Sato Y., Tsukamoto T.: *Drugs Today* 36, 83 (2000).
25. Tesař V., v knize: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci* (Štípek S. ed.), str. 175. Grada, Praha 2000.
26. Kulkarni K. S., Jain N. K., Singh A.: *Drugs Fut.* 26, 485 (2001).
27. Hampl V.: *Habilitační práce*. Univerzita Karlova, Praha 1997.
28. Parratt J. R.: *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 31 (1998).
29. Kim Y-K., Kim R-G., Park S-J., Ha J-H., Choi J-W., Park H-J., Lee K-T.: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 472 (2002).
30. Kharitonov S. A., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 727 (2001).
31. Dawson V. L.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22, 305 (1995).
32. Chiou G. C. Y.: *J. Ocul. Pharmacol. Th.* 2, 189 (2001).
33. Caulfield J. L., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R.: *J. Biol. Chem.* 273, 12689 (1998).
34. Zeman M., v knize: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci* (Štípek S. ed.), str. 167. Grada, Praha 2000.
35. Muscará M. N., Wallace J. L.: *Am. J. Physiol.* 276, G1313 (1999).
36. Janča J., Kapička V., Trka Z., Štěrba F.: *Obecná fyzika IV*, str. 114. SPN, Praha 1989.
37. Hampl V., Walters C. L., Archer S. L., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 21. Wiley, London 1996.
38. Wildhader J. H., Hall G. L., Stick S. M.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 74 (1999).
39. Malinski T., Czuchajowski L., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), part. VI, kap. 22. Wiley, London 1996.
40. Pariente F., Alonso J. L., Abruña H. D.: *J. Electroanal. Chem.* 379, 191 (1994).
41. <http://www.wpi-europe.com>, AmperometricDetection.pdf, staženo 6.2.2002.
42. Barker S. L. R., Kopelman R., Meyer T. E., Cusanovich M. A.: *Anal. Chem.* 70, 971 (1998).
43. Kitamura Y., Uzawa T., Oka K., Komai K., Ogawa H., Takizawa N., Kobayashi H., Tanishita K.: *Anal. Chem.* 72, 2957 (2000).
44. Wada K., Kamisaki Y., Ohkura T., Kanda G., Nakamoto K., Kishimoto Y., Ashida K., Itoh T.: *Am. J. Physiol.* 274, G465 (1998).
45. Waisser K., Pour M.: *Organická Chemie II*, str. 91. Karolinum, Praha 2000.
46. Venkatamaran S.: *Free Radical Biol. Med.* 29, 580 (2000).
47. Singel D. J., Lancaster Jr. J. R., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 23. Wiley, London 1996.
48. Henry Y. A., Singel D. J., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 24. Wiley, London 1996.
49. Green L. C., Wagner A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R.: *Anal. Biochem.* 126, 131 (1982).
50. Crkovská J., Štípek S.: *Klin. Biochem. Metab.* 6, 82 (1998).
51. Ricart-Jané D., Llobera M., López-Tejero M. D.: *Nitric Oxide* 6, 178 (2002).
52. Feelish M., Kubitzek D., Werringloer J., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 31. Wiley, London 1996.
53. Archer S.: *FASEB J.* 7, 349, (1993).
54. Herencia F., López-García M. P., Ubeda A., Ferrándiz M. L.: *Nitric Oxide* 6, 242 (2002).
55. Wada M., Morinaka Ch., Ikenaga T., Kuroda N., Nakashima K.: *Anal. Sci.* 18, 631 (2002).
56. Jourdain D.: *Free Radical Biol. Med.* 33, 676 (2002).
57. Broillet M-Ch., Randin O., Chatton J.-Y.: *FEBS Lett.* 491, 227 (2001).
58. Zhang X., Wang H., Liang S., Zhang H.: *Talanta* 56, 499 (2002).
59. Kikuchi K., Nagano T., Hayakawa H., Hirata Y., Hirobe M.: *J. Biol. Chem.* 268, 23106 (1993).
60. Yao D., Vlessidis A. G., Evmiridis N. P., Evangelou A., Karkabounas S., Tsampalás S.: *Anal. Chim. Acta* 458, 281 (2002).

61. Yao D., Prodromidis M. I., Vlessidis A. G., Karayannis M. I., Evmiridis N. P.: *Anal. Chim. Acta* 450, 63 (2001).
62. Dai K., Vlessidis A. G., Evmiridis N. P.: *Talanta* 59, 55 (2003).
63. Tarpey M. M., Fridovich I.: *Circ. Res.* 89, 224 (2001).
64. Evmiridis N. P., Yao D.: *Anal. Chim. Acta* 410, 167 (2000).
65. El Menyawi I., Looareesuwan S., Knapp S., Thalhammer F., Stoiser B., Burgmann H.: *J. Chromatogr., B* 706, 347 (1998).
66. Di Matteo V., Esposito E.: *J. Chromatogr., A* 789, 213 (1997).
67. Jedličková V., Paluch Z., Alušík Š.: *J. Chromatogr., B* 780 193 (2002).
68. Li H., Meininger C. J., Wu G.: *J. Chromatogr., B* 746, 199 (2000).
69. Tsikas D., Rossa S., Sandmann J., Frölich J. C.: *J. Chromatogr., B* 724, 199 (1999).
70. Stratford M. R. L., Dennis M. F., Cochrane R., Parkins Ch. S., Everett S. A.: *J. Chromatogr., A* 770, 151 (1997).
71. Everett S. A., Dennis M. F., Tozer G. M., Prise V. E., Wardman P., Stratford M. R. L.: *J. Chromatogr., A* 706, 437 (1995).
72. Payne W. J., Gall J. L., Berlier Y., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 27. Wiley, London 1996.
73. Johnson A. A., Burleson D. G.: *Anal. Biochem.* 236, 331 (1996).
74. Tsikas D., Sandmann J., Frölich J. C.: *J. Chromatogr., B* 772, 335 (2002).
75. Sampath V., Rousseau D. L., Caughey W. S., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 29. Wiley, London 1996.
76. Leone A. M., Kelm M., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VII, kap. 34. Wiley, London 1996.
77. Jensen B. O., Skeidsvoll J., Holmsen H.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 35, 185 (1997).
78. Ximenes M. I. N., Rath S., Reyes F. G. R.: *Talanta* 51, 49 (2000).

Z. Kupková and L. Beneš (*Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Chemical Properties, Biological Effects and Methods of Detection of Nitric Oxide**

Nitric oxide (NO) produced by the action of NO synthase on arginine plays many important roles in physiological and pathophysiological processes as well as in the maintenance of neurotransmission, vascular regulation and immunity systems. NO is formed in small amounts in vivo and is rapidly decomposed by interaction with oxygen, making its measurement difficult. NO is usually determined by chemiluminescence, EPR, electrochemically and by the Griess assay.

VISITING SCIENTISTS OR SECONDED NATIONAL EXPERTS

The European Commission's Joint Research Centre has published a call for Expression of Interest for temporary job opportunities (Visiting Scientists or Seconded National Experts), to work at the JRC for a period of 3–12 months in a variety of scientific fields, including the field of QSAR. The call is open to candidatures of experts from acceding/candidate countries associated to the EU RTD Framework Programme, namely: Bulgaria, Czech Republic, Cyprus, Estonia, Hungary, Latvia, Lithuania, Malta, Poland, Romania, Slovak Republic, Slovenia and Turkey. The deadline for applications is 28 May 2004 (12.00h CET). Further information can be obtained from the following website: <http://www.jrc.cec.eu.int/enlargement>

Dr Andrew Worth Coordinator of the JRC Activity on QSARs ECVAM, TP 582 Institute for Health & Consumer Protection Joint Research Centre European Commission 21020 Ispra (VA) Italy.
Tel: +39 0332 789566, fax: +39 0332 789963, e-mail: andrew.worth@jrc.it.

pad

VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM V GEOCHEMII

MARTIN MIHALJEVIČ^a, LADISLAV STRNAD^b
a ONDŘEJ ŠEBEK^b

^aÚstav geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů, ^bLaboratoře geologických ústavů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, 128 43, Praha 2, Albertov 6
mihal@natur.cuni.cz

Došlo 25.10.02, přepracováno 20.8.03, přijato 12.9.03.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, indukčně vázané plazma, izotop, stopová analýza

Obsah

1. Úvod
2. Základní princip instrumentace
3. Interference
 - 3.1. Spektrální interference
 - 3.2. Nespektrální interference
4. Detekční limity
5. Přídavná zařízení
 5. 1. Zmlžovače
 5. 2. Technika „dávkování do proudu“
 5. 3. Analýza plynů
 5. 4. Elektrotermální odpařování
 5. 5. Laserová sonda
6. Aplikace
 6. 1. Prvky vzácných zemin
 6. 2. Refraktorní prvky
 6. 3. Platinové kovy a zlato
7. Srovnání s běžnými spektrálními metodami
8. Závěr

1. Úvod

Uplynula zhruba dvě desetiletí od uvedení na trh prvních hmotnostních spektrometrů s indukčně vázaným plazmatem (ICP MS) s analytickou technikou. Přesněji řečeno uplynulo 25 let od konstrukce prvních spektrometrů tohoto typu a 15 let od jejich proniknutí na trh. Přístroj vznikl původně pro potřebu geologických, oceánologických a ekologických laboratoří. Jeho využití však brzy nalézají i průmysl, medicína, armáda, policie, ale i akademická pracoviště všeho druhu. V současnosti přístroje dodává řada firem, přístroje jsou vybaveny četnými přídavnými zařízeními usnadňujícími a urychlujícími vlastní měření, umož-

ňujícími měření vzorků tuhých, silně viskózních, či vzorků s vysokým obsahem solí bez předchozí složité úpravy.

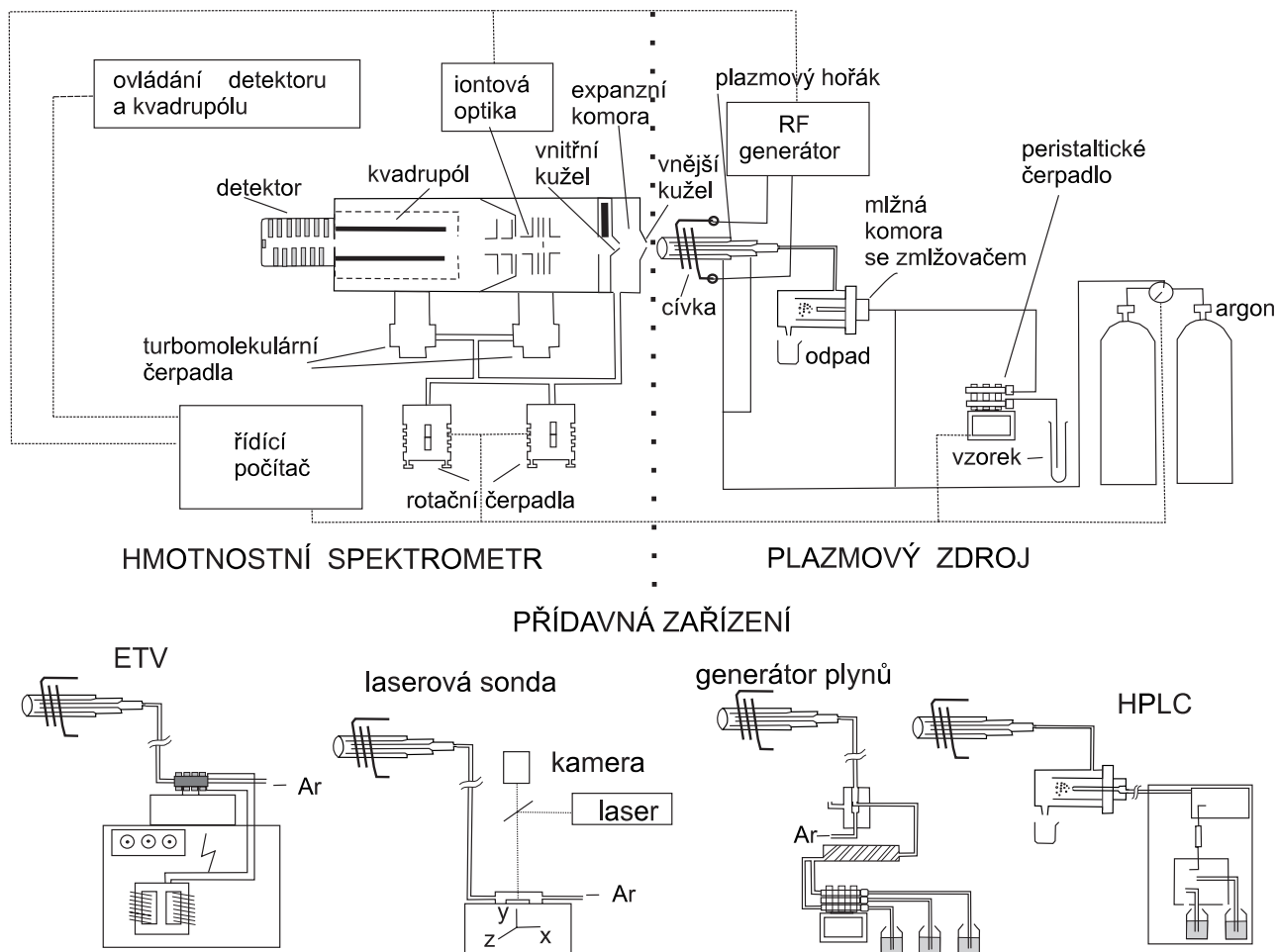
Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem se stal nepostradatelným zařízením pro řadu laboratoří, které provádějí anorganickou prvkovou analýzu¹. Pro ty, kteří se vybavili tímto zařízením, může značná produktivita a výkon přístroje způsobit milé překvapení. Opak může nastat vzhledem k vysokým nákladům, které jsou nezbytné na chod, dokonalé zvládnutí a údržbu vlastního přístroje.

2. Základní princip instrumentace

ICP MS je analytická spektrální technika kombinující ICP (Inductively Coupled Plasma – indukčně vázané plazma) jako zdroj kladně nabitých částic (např. Na⁺, Pb⁺) a hmotnostní spektrometrii (MS – Mass Spectrometry), která tyto částice deteguje. Vznik přístroje byl podmíněn vyřešením problému spojení obou hlavních částí², tj. umožnit pohyb nabitých iontů z prostředí atmosférického tlaku (ve kterém se nachází plazmový hořák) do prostředí s vysokým vakuem (ve kterém je umístěn detektor iontů). Takové spojení umožňuje konstrukce přístroje, která je znázorněna na obr. 1. Základní součásti přístroje tvoří plazmový zdroj, spojení neboli přechodnou část tvoří tzv. expanzní komora. Vlastní hmotnostní spektrometr je tvořený iontovou optikou, kvadrupólem a detektorem. Všechny tyto součásti, včetně expanzní komory, jsou výkonnými čerpadly zbavovány vzduchu, aby byl umožněn pohyb vznikajících iontů z plazmy do analyzátoru a zároveň, aby částice vzduchu nerušily vlastní stanovení. Tlak v prostoru kvadrupólu a detektoru dosahuje až 10⁻⁵ Pa.

Plazmový zdroj je tvořen radiofrekvenčním (RF) generátorem a indukční cívkou, plazmovým hořákem, mlžnou komorou a zmlžovačem (viz obr. 2). V plazmovém hořáku vzniká díky radiofrekvenčnímu generátoru (obvyklá frekvence je 27 nebo 40 MHz) a indukční cívice v proudu argonu plazma. Pomocí inertního plynu (Ar) a zmlžovače je tvořen v mlžné komoře z kapalného vzorku aerosol, jehož jemná frakce (částice < 5 μm) se dostává do hořáku.

Tento plazmový hořák bývá identický s plazmovým hořákem používaným v ICP OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)³. Indukčně vázané plazma je velmi vhodným zdrojem iontů. Jeho teplota (až 10 000 K, většinou však 7000–8000 K) je schopna ionizovat většinu prvků. Plazmový hořák je tvořen třemi koncentrickými křemennými trubicemi, kterými protéká různými rychlostmi argon (celkový tok může být až 18 l.min⁻¹). Vznik plazmatu je podmíněn fluktuacemi elektrického pole v prostředí indukční cívky. Konstrukce indukční cívky ovlivňuje vlastnosti plazmatu a jednotlivé typy spektrometrů se liší v jejím uspořádání a možnostmi ovládání pole, kterým je

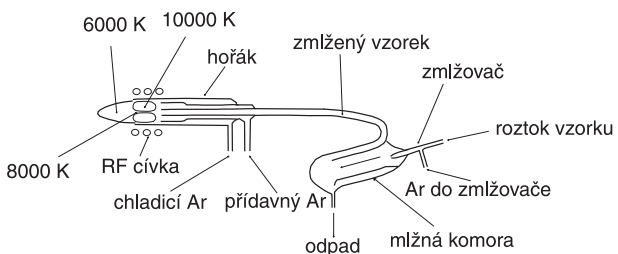


Obr. 1. Schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem; mezi přídatná zařízení, která lze kombinovat s ICP MS náleží např.: ETV (elektrotermická vaporizace), laserová sonda, zařízení pro vyvíjení plynů a HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie)

plazma buzeno a udržováno. Výkon plazmového zdroje se pohybuje kolem 1300 W, ale může být modifikován. Oscilacemi v elektromagnetickém poli v prostředí argonu dochází ke kolizím jednotlivých částic, elektronů a iontů, které tvoří vlastní plazma. Průchodem aerosolu vzorku plazmatem vzniká pára, následně atomy a ionty. Množství a zastoupení jednotlivých iontů vznikajících z analytu záleží zejména na energii v plazmatu oscilujících elektronů. Minimální energie elektronů potřebná pro ionizaci molekuly (atomu) se nazývá energie ionizační případně ionizační potenciál. První ionizační potenciál vybraných prvků a stupeň ionizace (procentuální zastoupení ionizovaných částic v plazmatu) při teplotě 8700 K je uveden v tabulce I.

Velká skupina prvků má první ionizační potenciál menší než Ar a získá v plazmatu s teplotou 8000 K energii nutnou k vytvoření kladně nabitých iontů. Tyto prvky proto můžeme pomocí plazmatu ionizovat a následně analyzovat. Ostatní prvky, např. fluor nebo vzácné plyny, ionizovat a měřit v tomto prostředí nelze.

Spojení mezi plazmatem a vlastním spektrometrem je tvořeno expanzní komorou, která je od okolního prostředí



Obr. 2. Schéma mlžné komory s koncentrickým zmlžovačem, plazmovým hořákem a výbojem

ochráněna dvěma děliči tlaku – kovovými kužely (nejčastěji vyrobenými z niklu nebo platiny). Tlakový gradient na obou stranách děliče tlaku vytváří paprsek ionizovaných částic, který již vstupuje do vlastního spektrometru. Materiál děličů tlaku musí mít dobrou tepelnou vodivost a musí být inertní vůči používaným rozpouštědlům.

Úlohou iontové optiky je rozostření iontového svazku, tak aby obešel pohlcovač fotonů (destička v ose přístroje,

Tabulka I
Ionizační potenciály a stupně ionizace vybraných prvků

Prvek	První ionizační potenciál [eV]	Stupeň ionizace [%]
Ar	15,8	0,2
H	13,6	4
O	13,6	4
N	14,5	1
F	17,4	0,003
Cl	13,0	8
Br	11,8	21
Be	9,5	53
Pb	7,4	99,4
In	5,8	99,9

chrání detektor před dopadem fotonů), poté ho opět zaostří a vhodně urychlit do kvadrupólového separátoru (kvadrupólu).

Kvadrupól tvoří čtyři kovové tyče (nejčastěji z molybdenu), které oscilací svého elektromagnetického pole umožní pohyb iontu směrem k detektoru. Frekvence oscilací polarit na kvadrupólových tyčích je konstantní, ale mění se amplituda napětí na tyčích, které umožní průchod iontu v závislosti na jeho náboji a hmotnosti. Podmínky na kvadrupólu se mění během zlomků vteřiny a umožňují tak analýzu v celém hmotnostním spektru během několika sekund. Ionty, které neprojdou kvadrupólem, se na některé z tyčí vybijí a jsou odstraněny vakuovými pumpami. Ionty prošlé kvadrupólem dopadají na detektor a jejich signál je dále zesilován v elektronovém násobiči. Dopadem jednoho iontu zde vzniká kaskádový tok elektronů, který je zaznamenán jako výsledek signál a je dále zpracováván.

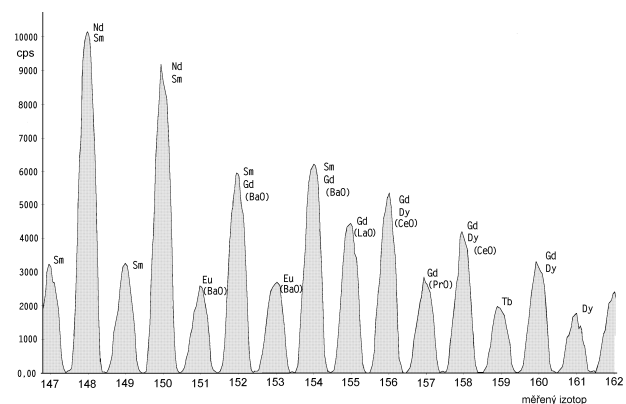
Všechny parametry, zejména výkon RF generátoru, průtoky plynů, pozice hořáku, napětí iontové optiky a napětí detektoru jsou ovládány řídicím počítačem.

Popisovaná spektrometrie je rychlá, víceprvková a umožňuje rovněž izotopovou analýzu. Přístroj je během několika sekund schopný změřit koncentrace široké škály prvků, která je dána počtem prvků v kalibračním roztoku. Kalibrační roztoky jsou připravovány zejména s ohledem na stálost jednotlivých prvků, minimalizaci interferenčních jevů a minimalizaci paměťového efektu (tj. schopnosti měřit signál, i když přestal být vstříkovan analyzovaný vzorek). Výjimečný paměťový efekt vytvářejí zejména bor, jod, rtuť a cín, ale i řada dalších prvků, které dlouhou dobu ulpívají na stěnách hadiček, hořáku případně povrchu děličů tlaku. Pro analýzu obecně platí, že těžké ionty (které díky větší hmotnosti snáze prolétnou až k detektoru) se analyzují lépe než ionty lehké. Mezi důležitá omezení náleží vlastnosti analyzovaného vzorku. Ten nesmí obsahovat velké koncentrace kyselin (způsobují korozi vnějšího děliče tlaku), nebo velká množství solí (celkové množství tuhých látek musí být nižší než cca 1 g.l⁻¹). Vysoké koncentrace solí způsobují zanesení otvoru ve vnějším děliču tlaku, a tím změnu para-

metrů měření. Podobně existuje omezení v množství organických sloučenin v roztocích, které mohou způsobit ukládání uhlíkatých částic na vnějším děliču tlaku a následnou změnu signálu. Pro důkladné spalování uhlíku v organických maticích je možné přisávat do plazmového hořáku stopy kyslíku, které tomuto jevu zabrání. Při měření velmi nízkých koncentrací je třeba neustále sledovat koncentrace analytu ve slepém pokusu.

3. Interference

Výsledkem procesu měření je hmotnostní spektrum většinou s rozsahem 5–250 atomových hmotnostních jednotek. Ačkoliv je hmotnostní spektrum mnohem jednodušší než spektrum atomové, setkáváme se i v ICP MS s řadou interferencí (viz obr. 3). Existují interference spektrální dané překryvem izobarických iontů ve spektru a interference nespektrální způsobené zejména složením matrice².



Obr. 3. Výřez části hmotnostního spektra vzorku granitu s hlavními izotopy europia, gadolinia a monoizotopového terbia; dále jsou zastoupeny některé izotopy neodymu, samaria a dysprosia. Je patrné, že dochází k hmotnostním překryvům izotopů různých prvků a výběr izotopů vhodných k vlastnímu měření se tím značně zužuje. Např. pro sedm izotopů gadolinia se výběr zužuje na pouhé dva izotopy ¹⁵⁵Gd a ¹⁵⁷Gd

3.1. Spektrální interference

Některé částice, které se hojně vyskytují v argonovém plazmatu, např. Ar⁺ s hmotnostní jednotkou 40, nebo ArAr⁺ s hmotnostní jednotkou 80, či ArO⁺ (hmotnostní jednotka 56), bývají v hmotnostním spektru při detekci přeskačovány z důvodu snahy o minimalizaci zátěže detektoru³. Komplikují se tím stanovení K, Ca (izotopy blízké 40), Fe (nejhojnější izotop ⁵⁶Fe) a Se (nejhojnější izotop ⁸⁰Se). Řada izobarických interferencí jednotlivých prvků (např. ¹¹⁴Cd⁺ interferující s ¹¹⁴Sn⁺) může být eliminována počítačově tím, že měříme současně signál dalšího izotopu, který není zatížen interferencí a vypočítáme korekční faktor pro interferující izotop (na základě jejich přírodního zastou-

pení). Jeho signál (koncentraci) poté odečteme od celkového signálu. Jak vyplývá z předchozího textu, většina prvků tvoří kladně nabitě ionty. Dvakrát nabitě ionty se projeví v hmotnostním spektru s poloviční nominální hodnotou mateřského iontu (např. $^{140}\text{Ce}^{++}$ se projeví v hmotnostním spektru na pozici zdánlivě odpovídající $^{70}\text{Zn}^+$). Poměr mezi ionty nesoucí jeden nebo dva náboje je závislý exponenciálně na poměru prvního a druhého ionizačního potenciálu². Tento poměr však může být snížen vhodným nastavením měřících podmínek na hodnotu $< 0,5$ % mateřského iontu.

Spektrální interference vyvolávají rovněž prvky matrice nebo nosného plynu spojené do polyatomových částic. V praxi se nejčastěji můžeme setkat s interferujícími polyatomovými částicemi vznikajícími kombinací Ar, O, C, N, H s dalšími ionty. Např. CaO^+ (40+16) může interferovat s $^{56}\text{Fe}^+$ nebo ClO^+ (37+16) s $^{53}\text{Cr}^+$, vzhledem k častému výskytu Ca a Cl ve vzorcích³. Přítomnost chloridů, síranů a fosforečnanů může rovněž způsobovat vznik nežádoucích interferencí. Typickým případem je stanovení As v roztocích s vysokým obsahem Cl iontů (částice ArCl^+ interferuje s jediným izotopem $^{75}\text{As}^+$). Problém interferencí byl u nově konstruovaných přístrojů odstraněn pomocí cely, kde kolizemi s He, CH_4 nebo NH_3 dochází k rozbití interferujících částic. Aby se předcházelo interferencím, používá se jako základní rozpouštědlo roztok HNO_3 (1–5 %), který zajistí stabilitu iontů a přítomnost dusíku nezpůsobuje ve větší míře vznik nežádoucích interferujících částic. Při běžných rutinních stanoveních je však většina předpokládaných interferencí minimalizována vhodným nastavením parametrů zmlžovače a iontové optiky.

3.2. Nespektrální interference

Matriční prvky mohou vyvolávat nespektrální interference (zejména potlačení signálu) tím, že ovlivňují energetické poměry a tudíž ionizační rovnováhy v plazmatu.

Obecně platí, že signál izotopově lehkého analytu v izotopově těžké matrici je potlačen ve větší míře, než signál izotopově těžšího analytu v matrici izotopově lehké. Znamená to, že lépe se stanovuje např. koncentrace Th v roztoku obsahujícím B, než B v matrici obsahující Th. Míru potlačení signálu mezi prvky, které jsou si hmotnostně blíže než B a Th, určuje hodnota ionizačního potenciálu. V páru dvou prvků s odlišným ionizačním potenciálem způsobuje větší potlačení signálu prvek s nižším ionizačním potenciálem. Potlačení signálu záleží spíše než na poměru koncentrace analytu a koncentrace matričního elementu na absolutních obsazích matričních prvků. Z praxe je známé i zesílení signálů některých prvků přítomností polárních sloučenin uhlíku, zejména nižších alkoholů a kyseliny octové. Toto zesílení signálu pravděpodobně pochází z dokonalejší ionizace srážkami s atomy uhlíku⁴.

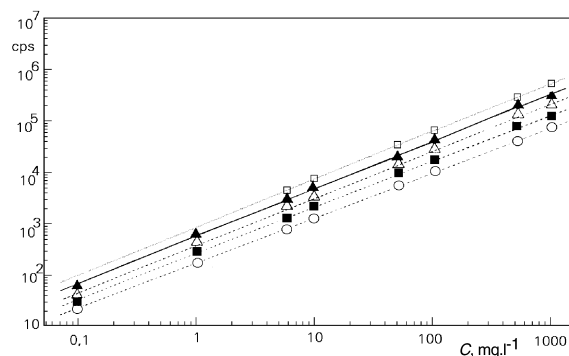
Jednotlivé interferující vlivy potlačujeme několika způsoby: měřením pomocí externího standardu (způsob známý pod názvem metoda standardního přídatku), pomocí interního standardu a metodou izotopového ředění.

Externí standard či standardní přídatek zajišťuje stejné podmínky při měření standardu a vzorku. Interní standard je

izotop, jehož průběžným měřením umožňujeme řídicímu systému reagovat na běžné změny ve stabilitě signálu přístroje. Pomocí interního standardu systém opravuje výchyly změřené koncentrace analytu vzniklé náhodnou nestabilitou přístroje. Interní standard by se měl svojí hmotností blížit hmotnostem prvků v analyzované škále. Interní standard musí být dobře ionizovatelný prvek, který se v měřeném vzorku nevyskytuje. Nejčastěji bývá interním standardem ^{115}In , ^{45}Sc , ^{209}Bi nebo ^{103}Rh . Ideální interní standard pro dané měření je jeden z izotopů analyzovaného prvku. Je-li použit takovýto interní standard, hovoříme o metodě izotopového ředění. Tento postup je velmi pracný a náročný, ale ve svém důsledku přesný. Metoda izotopového ředění bývá používána pro analýzu referenčních materiálů a dalších vzorků vyžadujících vysokou přesnost stanovení.

4. Detekční limity

Detekční limity ICP MS jsou vzhledem k ostatním spektrálním metodám (GF AAS – atomová absorpční spektrometrie s grafitovou píčkou, ICP OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, XRF – rentgenová fluorescenční spektrometrie, INAA – instrumentální neutronová aktivační analýza, PIXE – analýza protony vybuzených spekter) velmi nízké. I když jsou po mineralizaci tuhého vzorku brány v potaz interferenční vlivy, matriční efekty a změny ve stabilitě signálu přístroje, dosáhneme pomocí ICP MS velmi dobrých výsledků. Detekční limity se u řady těžkých kovů v reálných podmínkách pohybují v ng.l^{-1} (ppt) a u řady ostatních v desetínách $\mu\text{g.l}^{-1}$ (ppb). ICP MS předčí řadu metod svým dynamickým rozsahem, který může pokrýt více než 4 řády², jak je znázorněno na obr. 4. V praxi používáme rozsah o řád nižší. Pro dosažení co nejnižších detekčních limitů je nutné nalézt maximální



Obr. 4. Rozsah kalibrační křivky pro Cd, Cr, Cu, Ni, Tl² (osa x koncentrace analytu, osa y počet pulzů za vteřinu – cps)
□ kadmium, ▲ chrom, ○ měď, △ nikl, ■ thallium

poměr signál/šum. Optimalizovaný signál (pro určitou koncentraci prvku) by měl být rovněž stabilní v čase. Parametry, které poměr signál/šum ovlivňují především, jsou: průtoky jednotlivých plynů (charakter vstříkovaného aero-

solu), výkon RF generátoru, umístění hořáku, výkonost vakuové techniky, parametry iontové optiky, kvadrupólu a detektoru, v neposlední řadě charakter analytu a matrice.

5. Přídavná zařízení

5.1. Zmlžovače

Významnou součástí ICP MS je zdroj aerosolu, na který je nutno roztok vzorku převést. Základní uspořádání přístroje je určeno pro analýzu roztoků a nejběžnějším zdrojem aerosolu je zmlžovač (nebulizér) v kombinaci s mlžnou komorou. Existují různé konstrukce zmlžovačů a jejich vylepšení. Výběr vhodného zmlžovače je závislý na spotřebě vzorku, charakteru aerosolu, vlastnostech roztoku či suspenze. Nejhojněji používaný zmlžovač (skleněný, koncentrický) je náchylný k poškození suspenzí přítomnou v nedokonale mineralizovaných vzorcích. Zmlžovače schopné zmlžovat vzorky se suspenzí či viskózní vzorky, např. se žlábkem tvaru V (V-grooved) a Babingtonův (GMK zmlžovač), nemají takové parametry jako skleněný koncentrický zmlžovač. Mezi nejefektivnější způsoby zmlžování náleží v poslední době použití ultrazvukového zmlžovače. Ultrazvukový zmlžovač produkuje vibracemi piezoelektrické membrány mnohem jemnější aerosol než ostatní zmlžovače, čímž zvyšuje citlivost vlastního stanovení.

Přímé zmlžování (bez mlžné komory) usnadňuje práci při analýze prvků s velkým paměťovým efektem.

5.2. Technika „dávkování do proudu“

Dávkování do proudu (metoda FI – Flow Injection) je technika aplikovaná ve spektrometrii od roku 1975 (cit.⁵) a spočívá v aplikaci vzorku do nosného média a sledování signálu analytu v čase. Systém má velmi mnoho variací lišících se zejména stupněm disperze vzorku v nosném médiu. Mezi hlavní výhody tohoto uspořádání patří snížení kontaminace vzorkem nebo maticí, odstranění maticí efektů, možnost předúpravy vzorků, minimalizace množství vzorku, případně dávkování interních standardů. Technika nachází uplatnění zejména při analýze vysoce mineralizovaných roztoků, např. mořské vody⁶, biologických tekutin^{6,7}, roztoků koncentrovaných kyselin⁸, ropu⁹, případně rozpuštěných solí, kovů či přírodnin¹⁰.

5.3. Analýza plynů

Namísto aerosolu, který je nasát do plazmového hořáku, mohou být do proudu argonu zaváděny plynné sloučeniny obsahující analyt (zejména ve formě hydridu příslušného analyzovaného prvku). Docílí se tím snížení obsahu rozpuštědla v plazmatu a odstranění maticí interferencí (např. molekuly ArCl ovlivňující stanovení As, cit.^{10,11}). Proces vyvíjení plynných sloučenin s následným zaváděním do ICP MS se týká zejména Ge, As, Se, Sn, Te, Pb a Bi,

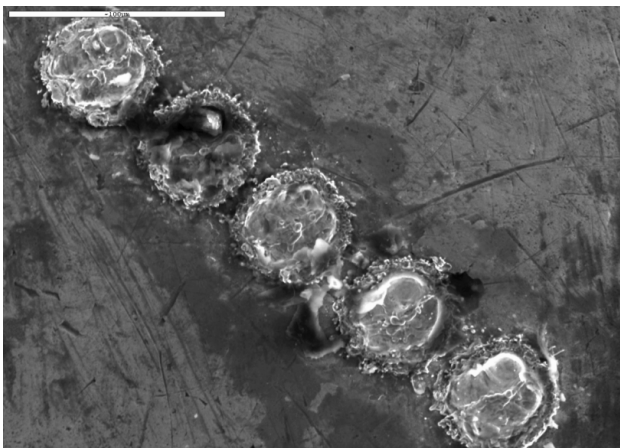
příp. Hg. Speciální postup s tvorbou těkavých oxidů byl použit k stanovení izotopového složení Re a Os (cit.¹²). Dále mohou být rovněž vyvíjeny jednotlivé halogeny, zejména Br, I (cit.¹³), karbonylové sloučeniny¹⁴, sloučeniny fluoru¹⁵ případně methylester kyseliny borité¹⁶.

5.4. Elektrotermální odpařování

Elektrotermální odpařování (electrothermal vaporisation, v kombinaci s ICP MS má označení ETV ICP MS) spočívá v zavedení malé části kapalného nebo polokapalného vzorku do grafitové (případně wolframové) pícky, termálního zpracování vzorku, zavedení pyrolyzních produktů do plazmatu a následné časově rozlišené analýzy. Aplikace záhy potvrdily předpokládané výhody tohoto uspořádání¹⁷. Největší výhodou zmíněného systému je malá spotřeba vzorku. Optimalizovaný teplotní program rovněž dokáže odstranit maticí prvky z analyzovaného roztoku, včetně potlačení tvorby oxidů a výrazně přispět ke snížení detekčního limitu. Při vhodném použití můžeme snížit spektrální interference až o řád. Reprodukovatelnost měření tímto způsobem je závislá zejména na množství vzorku a geometrii jeho dávkování do květy. ETV ICP MS bylo s úspěchem použito pro analýzu roztoků s vysokým obsahem rozpuštěných solí¹⁸, olejů¹⁹, tělních tekutin²⁰, suspenzí²¹, zrn jednotlivých minerálů²², ale i relativně čisté vody vzniklé rozpuštěním arktického ledu²³.

5.5. Laserová sonda

Laserová sonda se používá pro přímou analýzu tuhých vzorků pomocí ICP MS. Laser s tuhou látkou nebo plynový pulzní laser je nejčastěji zdrojem záření (infračerveného nebo ultrafialového, $\lambda = 1064$ nebo 266 nm), které dopadem na tuhý vzorek vytvoří kráter (obr. 5), přičemž vzniklý aerosol je přiveden PTFE hadicí do plazmatu. Vzorek společně s kalibračním materiálem je umístěn v křemenné cele na pohyblivém a ovladatelném stolku a je možné jej pozorovat mikroskopem či kamerou. Průměr kráteru vzniklého působením laseru na povrch vzorku se pohybuje od 10 do 100 μm , hloubka je závislá na energii a době působení laseru. Energie pulzu dosahuje v případě UV laseru 0,1–2 mJ. Problém vzniká s kalibrací takového uspořádání a nalezením vhodného interního standardu. Hloubka a průměr kráteru záleží i na druhu materiálu a je proto nutné systém kalibrovat stejnými materiály, např. silikáty sklem, kovy slitinami kovů, lisované prášky tabletami lisovaných referenčních materiálů. Jako interní standard většinou slouží některý z makroprvků matrice (v případě silikátů např. ²⁹Si), do tablety zakomponovaný vhodný prvek nebo prvek, který je přiveden ze zmlžovače připojeného k proudu aerosolu vzniklého laserovou ablací analyzovaného materiálu. U malého množství vzorku a lze-li jej tavit bez ztráty analytu je možné připravit skleněné pelety tavením. Velký objekt, z něhož nelze získat část, která by se vešla do křemenné cely (průměr nejčastěji 5 cm), je možné analyzovat tak, že



Obr. 5. Krátery vzniklé působením laseru na slitinu mincovního kovu; průměr 30 μm , foto z elektronového mikroskopu

ho částečně pokryjeme menší celou a kontakt cely s objektem dokonale utěsníme, aby procházející argon nesoucí abladovaný prach neunikal do okolí, ale dostával se do plazmatu. Kromě již zmíněné mikroanalýzy je velkou výhodou kombinace laserové ablace a hmotnostní spektrometrie možnost přímé analýzy vzorku bez nutné mineralizace či dalších chemických kroků. Širokou škálu aplikací prvkové a izotopové analýzy detailně popisují Beauchemin a spol.¹⁰ Metoda našla vhodné uplatnění při analýze jednotlivých minerálů (zirkony, granáty, pyroxeny, diamanty, sulfidy) plyných-kapalných uzavření v minerálech, skla, keramiky, kostí, skořápek, zubů, korálů, aerosolů a dalších vzorků²⁴.

6. Aplikace

ICP MS je metoda předurčená k analýze prvků, které nelze analyzovat jinými spektrálními metodami. V přírodních tuhých materiálech jsou takovými prvky zejména prvky vzácných zemin, platinové kovy, zlato a refraktorní prvky Zr, Hf, Nb, Ta, W. Metodou nemá smysl analyzovat např. sodík v přírodní vodě, zinek v odpadním kalu a mangan v půdě, pokud se tyto prvky ve vzorcích vyskytují v koncentracích stovek $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a vyšších.

Totéž platí pro biologické materiály a vody. Zájem se soustřeďuje na stopové a ultrastopové koncentrace toxických prvků či stopové a ultrastopové koncentrace esenciálních prvků. Z těchto velkých skupin uvedme např. Tl, Pb, Cd, As, U za toxické a I či Se za esenciální.

ICP MS předčí ostatní metody velmi nízkou spotřebou vzorku (z méně než 1 ml vzorku je možné stanovit širokou škálu prvků).

6.1. Prvky vzácných zemin

Prvky vzácných zemin (Rare Earth Elements neboli REE – skupina prvků od La k Lu) jsou významné pro studium di-

ferenčních procesů mezi jednotlivými částmi zemské kůry a stanovují se obvykle všechny společně s yttriem. ICP MS umožňuje (s výjimkou Pm) přímé stanovení, bez separace matričních prvků a obohacení (nutné pro ICP OES) či bez nákladného zařízení pro neutronovou aktivaci analýzu (NAA). Při analýze REE sledujeme hmotnosti od 139 do 176. Tb, Pr, Ho, Tm jsou prvky monoizotopové, ostatní prvky vzácných zemin mají více izotopů. U každého z prvků lze nalézt alespoň jeden izotop bez izobarické interference (obr. 3). Stanovení může být ovlivněno tendencí prvků lehkých vzácných zemin tvořit částice s kyslíkem ($^{141}\text{Pr}^{16}\text{O}^+$ může interferovat s $^{157}\text{Gd}^+$, cit.³). Analyzované roztoky by rovněž neměly obsahovat větší množství chloridů vzhledem k tomu, že částice obsahující chlor a prvky lehkých vzácných zemin interferují s prvky těžkých vzácných zemin. Tvorba interferujících kyslíkatých částic je v praxi minimalizována vhodným nastavením průtočných plynů zmlžovače, mlžné komory a plazmového hořáku. Protože těžké vzácné zeminy jsou hojné v některých těžkých minerálech (tj. minerálech obtížně rozpustitelných), stává se tavení vzorku nedílnou součástí mineralizační procedury.

6.2. Refraktorní prvky

Refraktorní prvky (rozuměj zejména Zr, Hf, Nb, Ta) jsou přítomné v běžných silikátech, ale i ve speciálních minerálech, které se obtížně mineralizují. Proto je nezbytné, aby se v mineralizačním kroku objevilo tavení. Tavení např. s LiBO_2 bývá prováděno bez předchozího rozpouštění silikátů a eliminace Si jako SiF_4 kyselinou fluorovodíkovou nebo následuje po rozkladu silikátů a odstranění křemíku. Volbu tavidla určují zejména charakter analytu, teplota eutektika vznikajícího z tavidla a vzorku případně z tavící směsi a vzorku, charakter prostředí, které chceme nastolit během tavení (tj. alkalické nebo kyselé, oxidační nebo redukční). V neposlední řadě nás zajímá stupeň opotřebení tavící nádoby zejména z důvodu ceny drahých kovů, případně možné kontaminace vzorku. Rozklad některých sloučenin tavením, nemusí to být jenom sloučeniny refraktorních prvků, ale i např. oxidy, sírany, fosforečnany, karbidy některých kovů i nekovů, nemá zatím při rozpouštění alternativu.

Během tavení je nutné pamatovat na celkové množství rozpuštěných solí v následně připraveném roztoku, které by nemělo přesáhnout $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. V každém případě platí, že analýza roztoků s vysokým obsahem rozpuštěných solí je obtížnější a její výsledky jsou zatíženy větší chybou než analýza roztoků s malou iontovou silou.

6.3. Platinové kovy a zlato

Platinové kovy a zlato se v zemské kůře vyskytují v koncentracích ppb či ppt a jsou v minerálech a horninách rozptýleny velmi nerovnoměrně. Pro jejich stanovení bývají nutné speciální rozkladné a prekoncentrační kroky dokonce i v ICP MS (cit.²⁵). Komplikace s interferencemi mohou nastat zejména vlivem tvorby částic $^{61}\text{Ni}^{40}\text{Ar}^+$ s $^{101}\text{Ru}^+$, či $^{63}\text{Cu}^{40}\text{Ar}^+$

Tabulka II

Roční náklady na provoz, relativní cena za stanovení 1 resp. n prvků, relativní čas na zvládnutí metody

Technika	FAAS	GF AAS	ICP OES	ICP MS
Cena ročního provozu, tis. Kč	80	150	250	400
Počet analyzovaných prvků	1	1	n	n
Relativní cena za vzorek	1	30	70	100
Relativní doba zvládnutí metody	1	2	3	6

s $^{103}\text{Rh}^+$, $^{65}\text{Cu}^{40}\text{Ar}^+$ s $^{105}\text{Pd}^+$, a $^{181}\text{Ta}^{16}\text{O}^+$ s $^{197}\text{Au}^+$ (cit.³). Mezi běžně používané rozkladné metody náleží dokimastická (prubířská) mineralizace na NiS či PbS (cit.²⁵). Vzorek se ve speciálním kelímku smísí se spektrálně čistým niklem, sírou, křemenem a vhodným tavidlem (nejčastěji $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$). Protavením směsi se oddělí silikátová a sulfidová tavenina. Vzniklý NiS obsahuje platinové kovy a většinu Au. Následuje selektivní rozpouštění kupelu, či celkové rozpouštění a koprecipitace platinových kovů s telurem nebo jejich separace na iontoměničích. Ekologicky méně příznivá metoda tvorby PbS je méně používaná, nicméně vhodná pro analýzu platinových kovů a Au. Protože většina doprovodných prvků zůstává během procesu v silikátu, metoda umožňuje pracovat s větší navázkou vzorku než je běžné u prostého tavení. Ředící faktor proto např. u navážky vzorku 10 g nepřesahuje nižší desítky.

7. Srovnání s běžnými spektrálními metodami

Všechny výše jmenované superlativy jsou zatíženy cenou instrumentace, cenou provozu přístroje a cenou nezbytného vybavení laboratoře. Nezanedbatelným faktem při využití ICP MS je kromě vysoké pořizovací ceny i vysoká cena chodu instrumentace. Náklady vznikají zejména velkou spotřebou argonu, spotřebou energie pro vlastní přístroj (obvykle tři jeho vakuová čerpadla zůstávají neustále v chodu), energie na chod klimatizace a ventilace laboratoře. I když tedy přístroj neměří, spotřebovává finance. Další náklady představují superčisté chemikálie a kyseliny, dále pak referenční materiály. V žádném měřeném experimentu, proceduře a sadě vzorků by neměl chybět odpovídající referenční materiál.

Poměrné náklady nejběžnějších spektrálních metod (plamenové atomové absorpční spektrometrie FAAS, AAS s grafitovou píčkou – GF AAS, optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem – ICP OES) a ICP MS na roční chod a relativní čas na zvládnutí techniky jsou uvedeny v tabulce II. Tabulka je vytvořena pro ICP MS s kvadrupólovým analyzátozem. Čas na zvládnutí techniky i náklady na stanovení jsou nesrovnatelně větší pro ICP MS než pro ostatní spektrální metody.

8. Závěr

ICP MS způsobila nebývalý pokrok v prvkové a izotopové analýze materiálů, přírodnin, tkání a tělních tekutin. Využití techniky zjednodušilo analýzu řady prvků (plati-

vých kovů, prvků vzácných zemí, refraktorních prvků) a urychlilo analýzu ultrastopových koncentrací v řadě přírodních materiálů. K vlastnímu přístroji existuje řada přídatných zařízení, která umožňují odstranění interferenčních vlivů, zejména matričních, stanovení koncentrací v tuhých vzorcích, stanovení forem. Řadu postupů (zejména analýzu roztoků) je možné považovat za rutinní analytickou práci, využití přídatných zařízení, analýza izotopových poměrů a speciálních vzorků, např. silně mineralizovaných nebo organických, má stále ještě badatelský charakter.

Při využití přístroje je třeba brát v úvahu finanční náročnost, která je spojena s jeho provozem, a proto je důležité nesnažit se aplikovat tuto techniku na všechny vzorky, ale zejména na speciální úlohy, jinak velmi obtížně řešitelné. Při rozhodování je nutné mít jasnou představu zejména o počtu a typu měřených vzorků, charakteru jejich matrice, analyzovaném spektru prvků, objemu analyzovaných roztoků, nutnosti určovat izotopové složení, možnosti financování nejen vlastního provozu stroje při měření, ale i vývoje postupů, metodik a praxe, které povedou k dokonalému zvládnutí techniky. Způsob, jakým donutit uživatele práce na ICP MS, aby získané výsledky nekončily pouze v zásuvkách, či nepublikovaných zprávách a aby množství a výjimečnost získaných dat nenahrazovaly důvtip a hypotézy, většinou prodejci přístroje nenabízejí.

Autoři pracují v laboratoři ICP MS UK PŘF vybavené z prostředků PHARE (CZ 9503-01) MF ČR a FRVŠ 1557. Využívají uvedenou techniku na řešení projektu MŠMT 113 100 005 – „Látkové a energetické toky ve svrchních částech zemské kůry“.

LITERATURA

1. Horlick G.: J. Anal. At. Spectrom. 9, 5 (1994).
2. Montaser A., Golightly D. W. (eds): *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*. VCH, New York 1992.
3. Falkner K. K., Klinkhammer G. P., Ungerer C. A., Christie D. M.: Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 23, (1995).
4. Gammelgaard B. Jons O.: J. Anal. At. Spectrom. 14, 867 (1999).
5. Ruzicka J., Hansen E. H.: Anal. Chim. Acta 78,145 (1975)
6. Alves L. C., Allen L. A., Houk R. S.: Anal. Chem. 65, 2468 (1993).

7. Weeks D. A., Johnson K. S.: *Anal. Chem.* **68**, 2717 (1996).
8. Peng Z., Klinkenberg H., Beeren T. Van Borm T.: *Spectrochim. Acta, Part B* **46**, 1051 (1991).
9. Al-Swaidan: *Talanta* **43**, 1313 (1996).
10. Beauchemin D., Grégoire D. C., Günther D., Karanasios V., Mermet J. M., Wood T. J.: *Discrete Sample Introduction Techniques for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Elsevier, Amsterdam 2000.
11. Story W. C., Caruso J. A., Heitkemper D. T., Perkins L.: *J. Chromatogr. Sci.* **30**, 427 (1992).
12. Grégoire D. C.: *Anal. Chem.* **62**, 141 (1990).
13. Cox R. J., Pickford C. J., Thompson M.: *J. Anal. At. Spectrom.* **7**, 635 (1992).
14. Park C. J., Yim S. A.: *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1061 (1999).
15. Lopez-Molinero A., Benito M., Aznar Y., Villaeal A., Castillo J. R.: *J. Anal. At. Spectrom.* **13**, 215 (1998).
16. Wilke T., Wildner H., Wünsch G.: *J. Anal. At. Spectrom.* **12**, 1083 (1997).
17. Gray A. L., Date A. R.: *Analyst* **108**, 1033 (1983).
18. Falkner K. K., Edmond J. M.: *Anal. Chem.* **62**, 77 (1990).
19. Richner P., Wunderli S.: *J. Anal. At. Spectrom.* **8**, 5 (1993).
20. Newman R. A., Osborn S., Siddik S. H.: *Clin. Chim. Acta* **179**, 191 (1989).
21. Grégoire D. C., Miller-Ihli D. J., Sturgeon R. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* **9**, 615 (1994).
22. Grégoire D. C., Ansdell K. M., Goltz D. M., Chakrabarti C. L.: *Chem. Geol.* **124**, 91 (1995).
23. Sturgeon R. E., Grégoire D. C., Willie S. N., Zheng J., Kudo A.: *J. Anal. At. Spectrom.* **8**, 1053 (1993).
24. Machado N., Gauthier G.: *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**, 5063 (1996).
25. Paukert T.: *Chem. Listy* **87**, 8 (1993).

M. Mihaljevič^a, L. Strnad^b, and O. Šebek^b (^a*Institute of Geochemistry, Mineralogy and Mineral Resources, bLaboratories of the Geological Institutes, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Application of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in Geochemistry**

This review covers principles and applications of ICP MS in geochemical and environmental sciences. The current popularity of ICP MS is attributed to very low detection limits for almost all elements across the Periodic Table, simple mass spectra and the ability to measure isotopic ratios. The most frequently analysed groups of elements are described in relation to the occurrence of spectral and non-spectral interferences, methods of calibration and measurement, the instrumental arrangement and also the most frequent methods of decomposition of solid samples. Modifications of the way of introducing the sample, in particular the use of electrothermal vaporisation and laser ablation, make the ICP MS a very effective instrumental method for trace analysis. However, it is necessary to take into consideration the high costs of purchase and operation of the instrument.

MŮŽE BÝT OBSAZEN

**Tento
prostor**

Vaším oznámením o pořádané akci
nebo inzercí produktů Vaší firmy,
personální nabídkou apod.

**Bližší informace získáte
na sekretariátu ČSCH
resp. v redakci Chemických listů.**

Kontakt:

**mblahova@csvts.cz, chem.listy@csvts.cz,
tel./fax: 222 220 184, tel. 222 221 778**

CHEMICKÝ PRŮMYSL

MOŽNOSTI ROZŠÍŘENÍ PROGRAMU PRO SIMULACI CHEMICKÝCH PROCESŮ

JAROSLAV POŽIVIL a JOSEF CHUDOBA

*Ústav počítačové a řídicí techniky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
pozivilj@vscht.cz, chudobaj@vscht.cz*

Došlo 1.4.03, k tisku 15.10.03.

Klíčová slova: univerzální simulační programy, stacionární simulace, reakční kinetika

Obsah

1. Úvod
2. Uživatelské přizpůsobení programu HYSYS
 - 2.1. Technika automatizace (OLE)
 - 2.2. Vytvoření rozšíření ve Visual Basicu nebo ve Visual C++
 - 2.3. Proměnné a jednotkové operace definované uživatelem
3. Příklad rozšíření – katalytická oxidace SO_2 na SO_3
 - 3.1. Reakční kinetika
 - 3.2. Simulační model
 - 3.3. Výsledky a diskuse
4. Rozšiřující reakční kinetika oxidace SO_2
5. Závěr

1. Úvod

HYSYS se v současné době řadí mezi celosvětově nejrozšířenější univerzální simulační programy¹ pro chemické procesy. Přestože jeho součástí je rozsáhlá knihovna jednotkových operací a objemná databáze fyzikálních dat, problematika simulace chemických procesů je natolik složitá, že jsme nuceni posuzovat kvalitu simulačních programů především podle možností rozšířit je o vlastní modely aparátů, o vlastní termodynamické modely, experimentální data, výpočetní metody apod. Typickým problémem je oblast reakční kinetiky, kde jsme většinou odkázáni na výsledky měření a vlastní vztahy. Proto jsme testovali možnosti rozšíření simulačního programu HYSYS.Process v oblasti chemické kinetiky.

2. Uživatelské přizpůsobení programu HYSYS

Přístupy k rozšiřování programu HYSYS je možné rozdělit do tří skupin:

- technika automatizace (OLE),
- vnější programová rozhraní,
- proměnné a jednotkové operace definované uživatelem.

2.1. Technika automatizace (OLE)

Přizpůsobování programu HYSYS potřebám uživatele je usnadněno tím, že HYSYS plně využívá techniku automatizace (Automation). Jde o techniku Microsoft založenou na modelu COM (Component Object Model), který umožňuje jedné aplikaci (programu) pracovat s objekty náležejícími jiným aplikacím. Vyvinula se z techniky spojování a vkládání objektů OLE (Object Linking and Embedding), a proto se někdy používá termín OLE Automation. Technika OLE dovoluje vzít určitý objekt (např. tabulku Excelu) a vložit ho s propojením do jiného objektu (např. textového dokumentu), přičemž změny v tabulce se automaticky promítají do textového dokumentu.

Technika automatizace umožňuje programátorovi zpřístupnit objekty jednoho programu pro užití v jiných aplikacích. V prostředí MS Windows je tato technika již standardem. Jejím principem je sdílení objektů v jednotlivých programech, přičemž tyto objekty jsou definovány na základě reference na zdrojový program, ve kterém jsou vytvořeny. Technika automatizace pracuje způsobem klient – server. Serverem je aplikace, která umožňuje ostatním aplikacím pracovat s jejími soubory. Klientem automatizace je aplikace, která pracuje s objekty jiných aplikací pomocí automatizace. Přitom většina aplikací může tvořit jak klienta automatizace, tak server automatizace.

HYSYS je aplikace serveru automatizace (poskytuje požadované služby), jiný program, např. Visual Basic, představuje klienta automatizace (požaduje služby). Můžeme v něm napsat kód, který má přístup k objektům programu HYSYS a využívá je. Uživatel napíše program podle svých potřeb v libovolném prostředí, které podporuje techniku automatizace (Visual C++, Visual Basic, Delphi, aj.) a využívá pro své účely vlastnosti proudů, fyzikálně-chemické vlastnosti látek či matematické modely simulačního programu HYSYS. Program předřazený simulačnímu programu HYSYS může sloužit i jako maska, která využívá důležité výsledky simulace a skrývá komplikovanost řešení. Typickým příkladem je propojení mezi MS Excelem a programem HYSYS pomocí jazyka VBA (Visual Basic for Application), který je součástí MS Excelu. Propojení Excelu a HYSYS je vhodné například pro prezentaci výsledků analýz citlivosti. Tento doplněk je již k dispozici na internetu² i s příslušným zapracovaným grafickým rozhraním včetně dokumentace.

Architektura klient – server se využívá i opačným směrem – programu HYSYS se zpřístupní rozšiřující moduly, jak popíšeme dále.

2.2. Vytvoření rozšíření ve Visual Basicu nebo ve Visual C++

Funkčnost programu HYSYS verze 2.0 lze rozšířit přidáním následujících uživatelských objektů k simulaci:

- rozšiřující jednotková operace (Unit Operation),
- rozšiřující reakční kinetika (Reaction Kinetics),
- rozšiřující balíček fyzikálně-chemických vlastností (Property Package).

Tato rozšíření se vytvářejí pomocí rozhraní mezi programem HYSYS a vývojovým programovacím prostředím Visual Basic nebo Visual C++ (rozšiřující balíček fyzikálně-chemických vlastností lze vytvořit pouze ve Visual C++). HYSYS obsahuje knihovny objektů, ke kterým mají tyto dva programovací jazyky přístup. Propojení je uskutečněno přes kontejnery HYSYSu (containers), které obsahují objekty a metody, které používá HYSYS a následně pak i vývojové prostředí. Pro uvedené typy rozšíření se využívají tři typy kontejnerů. Vlastní rozšíření se definuje – kóduje se ve vývojovém prostředí a kód je po odladění zkompilován jako knihovna DLL (Dynamic Linked Library). Posledním stupněm je registrace knihovny DLL do systému registrů Windows. I když uvedená tři rozšíření zůstávají v separátním souboru DLL, při používání se tváří jako integrální součást programu HYSYS.

Při vytváření rozšíření se postupuje v šesti stupních. Postup popíšeme pro rozšíření ve Visual Basicu:

1. Vytvoření definičního souboru rozšíření (EDF = extension definition file). Tento soubor obsahuje důležité informace vyžadované kontejnerem rozšíření programu HYSYS, např. jména a typy vlastních proměnných nebo jeho identifikaci (ProgId). Pro tvorbu souboru EDF se používá program dodávaný společně se simulačním programem HYSYS – editor pohledů (Extension View Editor).
2. Vytvoření grafického prostředí objektu (Object View). Tento stupeň sice není povinný, ale umožňuje uživateli interaktivní práci s vytvořeným objektem.
3. Implementace metod požadovaných kontejnerem, např. rozšiřující jednotkové operace musí mít implementovány metody Inicializuj (Initialize) a Proveď (Execute).
4. Registrace rozšíření, přičemž se vyžaduje, aby registrovaný identifikátor ProgId byl stejný jako ten, který jsme vložili do definičního souboru rozšíření EDF.
5. Odladění rozšíření pomocí standardních postupů Visual Basicu. Např. je možno vložit body přerušení, nejlépe do metody Inicializuj, nebo se použije ladicí okno Debug atd.
6. Distribuce rozšíření. Jakmile je rozšíření odladěno, lze vytvořit ActiveX DLL soubor výběrem příslušného příkazu Visual Basicu v nabídce Soubor (File). Výsledkem je rozšíření, které je možné distribuovat, přičemž uživateli zůstanou skryté použité informace či metody. Distribuovat je nutné jak soubor DLL, tak soubor EDF, popř.

další soubory, pokud je rozšíření vyžaduje. Pro spuštění vlastního modulu je třeba mít nainstalovaný soubor DLL a soubor EDF v jednom adresáři.

2.3. Proměnné a jednotkové operace definované uživatelem

Funkčnost simulačního programu HYSYS lze zlepšit použitím proměnných a jednotkových operací definovaných uživatelem. Uživatelem definované proměnné (User Variables) jsou po své definici plnohodnotnými proměnnými, které nelze rozlišit od vestavěných proměnných objektů HYSYS. Lze je používat stejným způsobem v rámci celého objektu simulace (Simulation Case). Uživatelem definované proměnné se píšou v interním jazyku maker, který je součástí programu HYSYS. Interní editor maker (Macro Language Editor) je interaktivní prostředí pro vývoj, testování a provádění skriptů. Používá syntax velmi podobnou syntaxi jazyka MS Visual Basic. Umožňuje zápis kódů, které je možné spouštět v programu HYSYS v mnoha různých situacích.

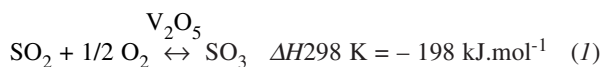
S uživatelem definovanými proměnnými lze např. pracovat v rámci analýz citlivosti, lze je monitorovat graficky a také je exportovat do jiných simulací, neboť každá nová proměnná je uložena do svého souboru. Podobně je tomu také s uživatelem definovanými jednotkovými operacemi. Jde o vlastní modely jednotkových operací, které jsou rovněž programované v interním jazyku maker programu HYSYS.

Příkladem využití může být výpočet Reynoldsova čísla při proudění tekutin, výpočet Wobbeho čísla pro plynné směsi, výpočet rosného bodu nebo vyjádření cenových nákladů proudících médií.

3. Příklad rozšíření – katalytická oxidace SO₂ na SO₃

3.1. Reakční kinetika

K popisu kinetiky reakcí v plynné fázi na tuhém katalyzátoru jsou v programu HYSYS k dispozici modely Langmuira a Hinselwooda, Eleya a Rideala a Marse a Van Krevelena³. Tyto obecné modely ne vždy přesně popisují kinetiku reakcí na určitých katalyzátorech. Z tohoto důvodu je často nutné doplnit simulační úlohu o vlastní model, který vychází z experimentálních měření nebo je publikován v literatuře. Jedním z takových příkladů je oxidace SO₂ na SO₃ na vanadovém katalyzátoru v průmyslově důležité výrobě kyseliny sírové:



Jde se o exotermní vratnou reakci, která probíhá adiabaticky v etážovém reaktoru prakticky za konstantního tlaku. Kinetická data byla získána měřením vzorků průmyslových

katalyzátorů na laboratorním diferenciálním průtokovém reaktoru s recirkulací plynu^{4,5,6}. Pro vyjádření závislosti reakční rychlosti na teplotě byla použita kinetická rovnice^{7,8}

$$r = 0,5 \cdot A \cdot \exp(-E/RT) \cdot (y_{\text{O}_2} \cdot y_{\text{SO}_2}^{0,5} - \frac{y_{\text{SO}_3}}{K_p}) \quad (2)$$

kde r je reakční rychlost, A frekvenční faktor, E aktivační energie, T teplota, y molární zlomek a K_p rovnovážná konstanta reakce (1). Konstanta K_p je pouze funkcí teploty a vychází z experimentálních dat⁹:

$$\log K_p = \frac{4812,3}{T} - 2,8254 \log T + 2,284 \cdot 10^{-3} T - 7,012 \cdot 10^{-7} T^2 + 1,197 \cdot 10^{-10} T^3 + 2,23 \quad (3)$$

3.2. Simulační model

Cílem výpočtů byla simulace chování první etáže adiabatického reaktoru na oxidaci SO_2 . K tomu byl použit knihovní model reaktoru s pístovým tokem (PFR) a knihovní termodynamický model PRSV (modifikace Pengovy a Robinsonovy stavové rovnice). Kinetika reakce – vztahy (2) a (3) byla naprogramována jako rozšíření (Reaction Kinetics Extension) v prostředí Visual Basicu 6.0 a reakce se tak stala součástí nabídky reakcí v programu. Do kinetické rovnice jsme použili experimentální data pro starší typ katalyzátoru:

$$\text{pro } T < 763,34 \text{ K} \quad A = 1,80 \cdot 10^8 \text{ kmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}, \\ E = 121,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\text{pro } T \geq 763,34 \text{ K} \quad A = 2,55 \cdot 10^4 \text{ kmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}, \\ E = 65,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Pro získání názornější představy o náročnosti/jednoduchosti vytváření rozšíření je dále uveden jeho kód ve Visual Basicu. Za apostrofy jsou uvedeny vysvětlující komentáře (všechny znaky uvedené mezi apostrofem a koncem řádku považuje Visual Basic za komentář).

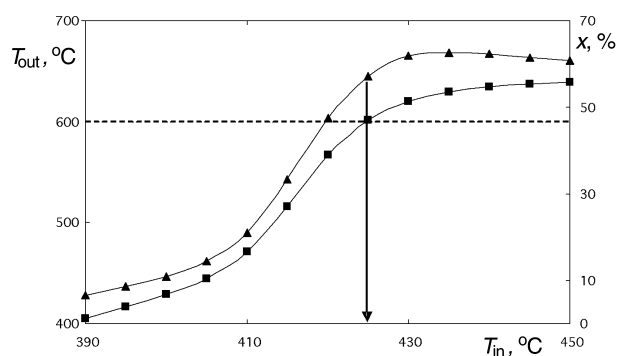
Pro simulaci byla použita reálná průmyslová data první etáže reaktoru, jehož základní údaje jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
Parametry simulovaného reaktoru

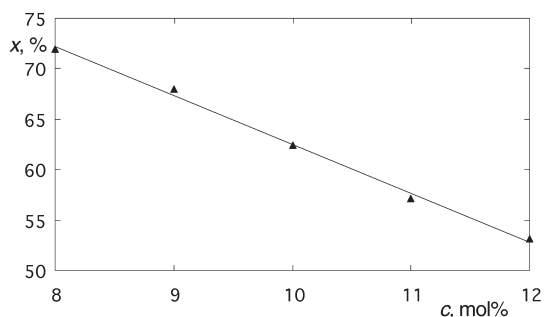
Parametr	Hodnota
Průměr reaktoru, m	7,07
Výška vrstvy katalyzátoru v prvním loži, m	0,495
Sypná hmotnost katalyzátoru, $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$	580
Teplota na vstupu do lože, °C	425
Tlak na vstupu do lože, kPa	114,4
Průtok plynu, $\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$	10,902

Kvůli verifikaci modelu byl nejprve simulován základní výrobní režim – denní výroba 313 t H_2SO_4 při koncentraci SO_2 10,9 mol.% ve vstupním plynu. Protože bylo dosaženo dobré shody s daty získanými z reálného procesu, byl model využit ke zkoumání vlivu některých provozních parametrů na stupeň konverze:

- závislost stupně konverze a výstupní teploty plynu na teplotě vstupujícího plynu,
- závislost stupně konverze na koncentraci SO_2 ve vstupujícím plynu,
- průběh konverze a teploty podél lože katalyzátoru.



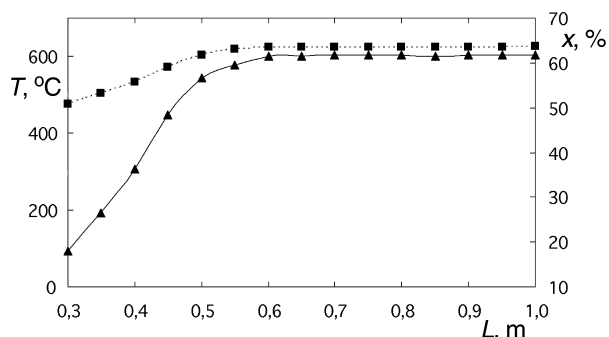
Obr. 1: Závislost stupně konverze SO_2 (x) a výstupní teploty plynu (T_{out}) na teplotě vstupujícího plynu (T_{in});
▲ konverze, ■ teplota



Obr. 2: Závislost stupně konverze SO_2 (x) na koncentraci SO_2 ve vstupujícím plynu (c)

3.3. Výsledky a diskuse

Závislost stupně konverze a výstupní teploty plynu na teplotě vstupujícího plynu je znázorněna v obr. 1. Optimalizace vstupní teploty do vrstvy katalyzátoru představuje u exotermní vratné reakce nejjednodušší možnost racionalizace výroby bez nutných investic. Vstupní teplotu je třeba pružně přizpůsobovat změnám režimu výroby (snižovat při rostoucí koncentraci SO_2 a zvyšovat při rostoucím průtoku plynu) i stavu katalyzátoru (jeho postupná dezaktivace se dá do jisté míry kompenzovat vzrůstem vstupní teploty). Při stanovení optimální vstupní teploty jsme omezeni výstupní



Obr. 3: Závislost stupně konverze SO_2 (x) a teploty (T) na délce lože katalyzátoru; \blacktriangle konverze, \blacksquare teplota

teplotou, která nesmí překročit maximální přípustnou hodnotu, při které dochází k deaktivaci katalyzátoru. Ta se obvykle pohybuje podle použitého typu katalyzátoru mezi 600 a 650 °C, pro určitý starší typ činí 600 °C. Proto optimální vstupní teplota základního režimu nemůže být vyšší než 425 °C a maximální dosažitelná konverze je pak 57,6 %. Závislost stupně konverze na koncentraci SO_2 ve vstupujícím plynu je znázorněna na obr. 2. V grafu jsou vyneseny konverze při optimální vstupní teplotě, která odpovídá maximální přípustné teplotě na výstupu z etáže 600 °C.

Konverze SO_2 je příznivě ovlivňována přebytkem vzduchu, ale přitom současně rostou náklady související s průchodem plynu výrobou, jsou nutná rozměrnější zařízení a zejména klesá využití reakčního tepla, které ohřívá větší množství inertního dusíku. Aby se lépe využila energie pro výrobu páry, dává se proto přednost vyšším koncentracím SO_2 (11–12 %). Při použití dvoustupňové konverze se 4–5 loži katalyzátoru se pro vyšší koncentrace pokles konverze na první etáži reaktoru v dalších ložích do značné míry vyrovná.

Při další simulaci jsme zaznamenali konverzní a teplotní profil lože katalyzátoru v rozmezí 0,3 m až 1,0 m. Jak je zřejmé z obr. 3, je použití lože delšího než 0,5 m neefektivní, protože se konverze přiblížila rovnovážné hodnotě a dále neroste – bylo dosaženo stupně přeměny 0,647 při teplotě 623 °C.

4. Rozšiřující reakční kinetika oxidace SO_2

Rozšíření simulačního programu HYSYS je ilustrováno příkladem reakční kinetiky katalytické oxidace oxidu siřičitého při výrobě kyseliny sírové. Potřebná kinetická rovnice byla naprogramována jako rozšíření v prostředí Visual Basicu 6.0 a celá reakce se tak stala součástí nabídky reakcí v programu.

```
Option Explicit      'vsechny promenne musi byt deklarovany;
                    'usnadnuje to jejich identifikaci a zabranuje chybam pri preklepu
Dim hyContainer As Object      'deklarace globalnich objektu HYSYSU
                    'predpona hy oznacuje promenne pochazejici z HYSYSu

Public Function Initialize(ByVal Container As Object, ByVal IsRecalling As Boolean)
As Long
    'Tato funkce se vola, kdyz je rozsireni poprve pridano do programu nebo kdyz je
    nahrano
On Error GoTo chyba      'v pripade chyby ukonci program
Dim hyReactant As Reactant      'Deklarace lokalnich objektu v HYSYSU
Initialize = extnCurrentVersion      'overeni pouzivane verze HYSYSU
Set hyContainer = Container      'Odkaz na kontejner, který obsahuje metody pro za-
cleneni rozsireni
    'IsRecalling je False pri prvni pridani rozsireni k simulaci
If IsRecalling = False Then
    'reakcni podminky:
    hyContainer.Phase = ptVapourPhase      'plynna reakcni faze
    hyContainer.ReactionBasis = rbMoleFracBasis      'molarni zlomky
    hyContainer.Reactants.RemoveAll      'odtrani vseh prvodnich reaktantu
    'pridani pozadovanych reaktantu a jejich stechiometrie:
    Set hyReactant = hyContainer.Reactants.Add(„SO2“)
    hyReactant.StoichiometricCoefficientValue = -1
    hyContainer.BaseReactant = hyReactant      'klicova slozka v rychlostni reakci
    Set hyReactant = hyContainer.Reactants.Add(„Oxygen“)
    hyReactant.StoichiometricCoefficientValue = -0.5
    Set hyReactant = hyContainer.Reactants.Add(„SO3“)
    hyReactant.StoichiometricCoefficientValue = 1
    'nedefinovane vlastnosti se nastavi jako vypoctene takze je nelze me-
    nit:
```



```

With hyContainer
    .SetReactionPropertyState rpReactants, vsCalculated
    .SetReactionPropertyState rpStoichiometricCoefficients, vsCalculated
    .SetReactionPropertyState rpMinTemperature, vsCalculated
    .SetReactionPropertyState rpMaxTemperature, vsCalculated
    .SetReactionPropertyState rpReactionBasis, vsCalculated
    .SetReactionPropertyState rpReactionPhase, vsCalculated
    .SetReactionPropertyState rpBaseReactant, vsCalculated
    .SetReactionPropertyState rpBasisConversion, vsCalculated
    .SetReactionPropertyState rpRateConversion, vsCalculated
End With
End If
chyba: 'navesti pro chybu
End Function

Public Function ReactionRate(ByVal Fluid As Object, ByVal RxnTemperatureInC As
Double, ByVal RxnVolumeInKmolPerM3 As Double, rate As Double) As Boolean
    'rychlost reakce (funkce ReactionRate) se vola pri kazdem vypoctu pomoci
    rozsireni
    On Error GoTo chyba 'zachyceni moznych chyb

    'definice lokalnich promennych
    Dim TK As Double 'reakcni teplota v Kelvinech
    Dim KSO3 As Variant 'rovnovazna konstanta
    Const Ro As Long = 580 'sypna hustota katalyzatoru (kg/m3)
    Const R As Single = 8.314 'univerzalni plynova konstanta J/K*mol
    'indexy slozek - pro prehlednost programu:
    Dim SO2Index As Integer
    Dim O2Index As Integer
    Dim SO3Index As Integer
    Dim A As Double 'predexponencialni Arrheniuv faktor
    Dim B As Double 'aktivacni energie
    Dim ComponentFrac As Variant
    'molarni zlomky slozek:
    Dim ySO2 As Double
    Dim ySO3 As Double
    Dim yO2 As Double

    TK = RxnTemperatureInC + 273.15 'reakcni teplota v Kelvinech
    'experimentalni hodnoty aktivacni energie a predexponencialniho faktoru
    If TK >= 763.34 Then
        A = 25500# / 3600 'kmol/kg/s
        B = 15600 * 4.186 ' J/mol
    Else
        A = 180000000# / 3600 'kmol/kg/s
        B = 29000 * 4.186 'J/mol
    End If
    'vypocet rovnovazne konstanty jako funkce teploty
    KSO3 = 10 ^ (4812.2 / TK - 2.8254 / 2.3025 * Log(TK) + 0.002284 * TK -
0.0000007012 * TK ^ 2 + 0.0000000001197 * TK ^ 3 + 2.23)
    'indexovani slozek (na zaklade vlastnosti HYSYS Containeru)
    SO2Index = Fluid.Components.Index(„SO2“)
    SO3Index = Fluid.Components.Index(„SO3“)
    O2Index = Fluid.Components.Index(„Oxygen“)
    ComponentFrac = Fluid.MolarFractionsValue 'molarni slozeni vstupniho proudu
    ySO2 = ComponentFrac(SO2Index)
    ySO3 = ComponentFrac(SO3Index)
    yO2 = ComponentFrac(O2Index)

```

```

'reakcni rychlost (kmol/kg kat./s)
rate = 0.55 * A * Exp(-B / (R * TK)) * (yO2 * ySO2 ^ 0.5 - ySO3 / KSO3)
' prepocet na vnitřní jednotky HYSYSu:
rate = rate * Ro      'kmol/s/m3
ReactionRate = True   'reakcni rychlost spočtena
Exit Function
chyba:      'reakcni rychlost není spočtena
ReactionRate = False
End Function

```

5. Závěr

Simulace chemických procesů je natolik složitá, že ani rozsáhlé univerzální simulační programy nejsou dostatečně univerzální, a tak je kvalita prostředků pro jejich rozšíření významným kritériem při jejich hodnocení. Typickou oblastí je reakční kinetika, kde jsme většinou odkázáni na výsledky měření a vlastní vztahy. Vzhledem k otevřené architektuře poskytuje program HYSYS.Process několik možností rozšíření, které jsou podle našeho názoru dostatečné. Jejich využívání však není zcela triviální a vyžaduje vzhledem k objektovému charakteru programu speciální znalosti a alespoň minimální zkušenost s používáním objektově orientovaného programovacího jazyka, jako je např. Visual Basic.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu MŠMT ČR (výzkumného záměru) MSM 223400007.

LITERATURA

1. *Simulation and Model Based Control Software Industry Outlook, 1996–2001*, compiled by Automation Research Corporation, Dedham, MA; Software Usage Surveys by 100 % Software Solutions, Inc, and the University of Edinburgh.
2. www.hyprotech.com, staženo 14.5.2002
3. HYSYS Process 2.2 Documentation. 2000 AEA Technology – Hyprotech Ltd. [CD ROM]
4. Vosolsobě J., Michálek J.: Chem. Listy 60, 87 (1966).
5. Michálek J., Vosolsobě J.: Chem. Prum. 17, 527 (1967).
6. Michálek J., Vosolsobě J.: Chem. Prum. 30, 461 (1980).
7. Michálek J., Vosolsobě J., Muchlenov I. P.: Ž. prikl. chim. 48, 80 a 766 (1975).
8. Michálek J., Vosolsobě J.: Sborník VŠCHT Praha B19, 55 a 67 (1975).
9. Twigg M. V.: *Catalyst Handbook*, 2. vyd., I. Manson Publishing, London 1996.

J. Poživil and J. Chudoba (*Department of Computer and Control Instrumentation, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Possibilities of Program Extension for Simulation of Chemical Processes**

Simulation of chemical processes is insofar complex that even the latest simulation programs are not sufficiently versatile and so the quality of means for their extension is a significant criterion for their evaluation. The article deals with the extension of the HYSYS simulation program. A typical field is reaction kinetics where we mostly depend on measurement results and own relationships. The implementation of experimental models of reaction kinetics into program is shown on the example of catalytic oxidation of SO₂ to SO₃. The described possibilities of program extension make it a versatile tool for the use in simulation of chemical processes.

TEORETICKÝ VÝPOČET VZNIKU METÁNU Z KOMUNÁLNEHO ODPADU

PETER HORBAJ

Katedra energetickej techniky, Strojnícka fakulta, Technická univerzita Košice, Vysokoškolská 4, 04200 Košice, Slovenská republika

Peter.Horbaj@tuke.sk

Došlo 7.8.02, prepracované 22.9.03, prijaté 14.10.03.

Kľúčové slová: odpad, skládka odpadov, vyhniвание, metán, skládkový plyn, výpočet množstva plynu

Obsah

1. Úvod
2. Najpoužívanejšie rovnice výpočtu množstva metánu a ich použitie
 - 2.1. Buswellove rovnice
 - 2.1.1. Jednoduchá Buswellova rovnica
 - 2.1.2. Rozšírená Buswellova rovnica
 - 2.2. Peavyho rovnice
3. Záver

Tabuľka I

Vznik odpadov podľa jednotlivých hospodárskych odvetví za rok 2001 (kt.rok⁻¹)

Odvetvie hospodárstva	Spolu	Množstvo odpadov		
		ostatné	zvláštne ^a	nebezpečné
Poľnohospodárstvo	4 654,6	287,6	4 329,0	37,9
Rybolov	0,087	0	0,084	0,003
Priemysel spolu	6 645,0	3 882,0	1 814,6	948,4
Stavebníctvo	338,7	169,2	144,5	25,0
Obchodné služby	183,4	14,8	81,8	86,8
Hotely a reštaurácie	8,2	0,3	7,7	0,3
Doprava a spoje	174,1	84,7	55,7	33,7
Peňažníctvo a poisťovníctvo	1,1	0,08	0,9	0,06
Verejná správa a obrana	1 603,0	98,0	1 502,1	2,9
Školstvo	10,3	1,1	8,8	0,4
Zdravotníctvo a soc.starostlivosť	92,3	4,0	75,0	13,4
Ostatné verejné služby	231,6	82,7	102,2	46,7
Predaj,udržba a oprava mot.voz.	243,1	144,1	79,5	19,5
Nezistené	2 224,8	1 514,5	262,6	447,7
Spolu	16 410,2	6 283,0	8 464,4	1 662,8

^a bez nebezpečných

1. Úvod

V zmysle nariadenia vlády č. 606/1992 Zb. o nakladaní s odpadmi bolo prevádzkovaných v roku 2001 na Slovensku 165 skládok odpadov a to v zložení^{1,2}:

- 21 skládok I. stavebnej triedy,
- 5 skládok II. stavebnej triedy,
- 133 skládok III. stavebnej triedy,
- 6 skládok osobitného určenia.

Po prehodnotení skládok podľa kritérií vyhlášky MŽP SR č. 283/2001 Z.z. o vykonaní niektorých ustanovení Zákona o odpadoch je od 1.1.2002 v prevádzke 156 skládok odpadov v zložení²:

- 20 skládok na inertný odpad,
- 120 skládok na odpad, ktorý nie je nebezpečný,
- 16 skládok na nebezpečný odpad.

Odpadom je v zmysle zákona č. 238/1991 Zb. o odpadoch vec, ktorej sa chce majiteľ zbaviť alebo tiež hnutelná vec, ktorej odstránenie je potrebné z hľadiska ochrany životného prostredia. Podľa Regionálneho informačného systému o odpadoch (RISO) bolo v roku 2001 v SR vyprodukovaných celkom 16,4 milionov ton odpadov, z toho 6,28 milionov ton ostatných odpadov a 8,46 milionov ton zvláštnych odpadov (z toho 1,66 milionov ton nebezpečných odpadov), na ktoré sa vzťahuje zákon č. 223/2001 Z.z. o odpadoch. Vznik odpadov v SR podľa jednotlivých hospodárskych odvetví udáva tabuľka I (cit.²).

Komunálny odpad je odpad z domácnosti vznikajúci na území obce pri činnosti fyzických osôb a odpad podobného

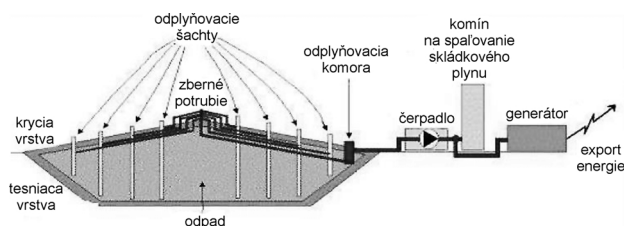
charakteru vznikajúci pri činnosti právnických osôb alebo fyzických osôb oprávnených na podnikanie, ako aj odpad vznikajúci pri činnosti obce pri čistení verejných komunikácií a priestranstiev, ktoré sú v správe obce, ako aj pri údržbe verejnej zelene vrátane parkov a cintorínov, pričom podľa³⁻⁵ je zastúpenie biodegradovateľného odpadu v komunálnom odpade cca 28 %.

Najrozšírenejším spôsobom zneškodňovania odpadov je stále ich skládkovanie 23,3 % (3,7 milionov ton) na čom sa podieľa hlavne kategória komunálny odpad a to 63,47 % (1,08 milionov ton). Podľa údajov z RISO sa v roku 2001 zneškodnilo spaľovaním 550,8 kt odpadu všetkých kategórií, čo predstavuje 3,5 % odpadov.

Z celkového množstva odpadov vzniknutých v roku 2001 sa v SR zhodnocuje 8181,0 kt, čo predstavuje 51 %. V Slovenskej republike vzniklo podľa údajov RISO a po ich prepočítaní na sušinu 2 095 577,5 milionov ton komunálneho odpadu, čo je 389,6 kg na obyvateľa a rok⁶⁻⁸.

V skládkach dochádza k rozkladovým procesom za vzniku tuhých, kvapalných a plyných produktov v dôsledku biochemických reakcií spôsobovaných prevažne mikroorganizmami. Za pomoci kyslíka, resp. i bez pomoci kyslíka prebiehajú v skládke aeróbne a anaeróbne procesy. Ak je zloženie odpadu priaznivé, t.j. odpad obsahuje dosť kuchynského odpadu, papiera a organických látok, teplota sa zvyšuje behom 4 až 6 týždňov na 60 až 65 °C.

Anaeróbny rozklad (vyhniavanie), je proces využívaný na produkciu metánu z pevného a kvapalného organického odpadu (obr. 1). Vo väčšine prípadov produkcie metánu z pevných a kvapalných odpadov je táto produkcia rozdelená do troch krokov⁹⁻¹¹:



Obr.1. Schéma skládky odpadov s využívaním skládkového plynu na výrobu energie

1. prvý krok zahŕňa transformáciu vysokomolekulárnych zložiek na zložky vhodné ako pre zásobu uhlíka, tak aj pre zdroj energie, prostredníctvom enzýmov,
2. druhý krok súvisí bakteriálnou konverziou zložiek, ktoré sú výsledkom prvého kroku na identifikovateľné nízkomolekulárne prechodné zložky,
3. tretí krok zahŕňa bakteriálnu konverziu prechodných zložiek na jednoduché zložky a produkty ako sú oxid uhličitý a metán.

Teoreticky by mohol vzniknúť z 1 kg organického uhlíka, 1,86 m³ zmesi metánu a kysličníka uhličitého, čo by znamenalo, že pri asi 20 % organického uhlíka v odpade by malo vzniknúť asi 150 m³ plynov. Avšak v skládkach pre-

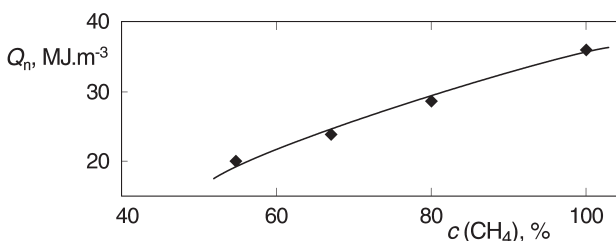
biehajú i vedľajšie reakcie vzniku skládkových plynov, obvykle v množstve 50 až 120 m³ na 1 t domového odpadu.

Zloženie plynov vznikajúcich v skládke je závislé na zložení organického podielu odpadov. Približne vzniká v skládke 10 až 45 % metánu (pri dodržaní pravidiel separovaného zberu stúpa % vznikajúceho metánu až na 50–60 %), ktorý je z hľadiska energetického využívania ako jediný zaujímavý. Zbytok tvoria oxid uhličitý, sírovodík, oxid uhľatý a iné plyny, veľmi málo zastúpené v produkovaných plynov.

Takto vzniknutý skládkový plyn je možné následne využívať¹²⁻¹⁵:

- neupravený na priame spaľovanie v kogeneračných jednotkách prípadne v kotloch,
- upravený prostredníctvom primiešavania zemného plynu (za účelom zvýšenia výhrevnosti skládkového plynu) na spaľovanie v priemyselných spaľovacích zariadeniach,
- priamym získavaním čistého metánu zo skládkového plynu.

Kvalita a výhrevnosť plynov sa mení podľa jednotlivých skládok, pričom za najdôležitejšiu vlastnosť je možné považovať výhrevnosť. Rôzni autori uvádzajú rôzne hodnoty, ktoré sa pohybujú od 5,5 MJ.m⁻³ až po 23 MJ.m⁻³ (cit.^{17,18}), pričom na obr. 2 je uvedená závislosť výhrevnosti bioplynu na obsahu metánu v ňom¹⁶⁻¹⁹.



Obr.2. Závislosť výhrevnosti bioplynu Q_n na obsahu metánu c (%)

2. Najpoužívanejšie rovnice výpočtu množstva metánu a ich použitie

Problematike výpočtu metánu vznikajúceho z komunálneho odpadu sa venuje pozornosť približne od roku 1930, napr. práce A. M. Buswella. Medzi najznámejších autorov, ktorí sa touto problematikou zaoberali resp. zaoberajú patria ďalej S. P. Peavy, G. Tchobanoglous, D. R. Rowe, J. Herenklage, R. Stegmann, N. Nakičenič, E. Wagnerová, B. Weber, J. Váňa a niektorí ďalší.

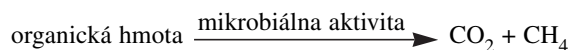
Napriek ich záujmu o problematiku odpadov, prostredníctvom využitia metánu vznikajúceho v skládke odpadov, nevypracovali všetci prakticky využiteľné rovnice pre výpočet množstva takto vznikajúceho plynu. Najďalej sa v tejto oblasti dostali A. M. Buswell, S. P. Peavy a G. Tchobanoglous, na základe nimi vytvorených rovníc boli neskôr vytvárané ich rôzne modifikácie.

2.1. Buswellove rovnice

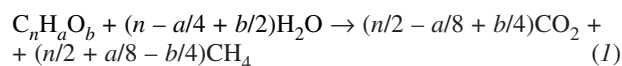
Ako bolo uvedené v úvode kapitoly 2, A. M. Buswell sa úspešne pokúsil zostaviť rovnice na výpočet množstva vznikajúceho skládkového plynu už v roku 1930. Na základe experimentálnych prác s odpadom, a na základe týchto jednoduchých rovníc boli neskôr navrhnuté rovnice presnejšie, ktoré sám autor nazval rozšírenými Buswellovou rovnicami. Rozdiel medzi nimi spočíva v tom, že pokiaľ jednoduchá rovnica považuje za vstupný substrát len jednoduché chemické zlúčeniny a ako výstupný produkt anaeróbneho rozkladu odpadu len CO_2 a CH_4 , rozšírená rovnica zahŕňa ako predmet rozkladu zložitejšie chemické zlúčeniny obsahujúce tiež síru a ako výstupný produkt rozkladu okrem CO_2 a CH_4 tiež NH_3 a H_2S .

2.1.1. Jednoduchá Buswellova rovnica

Jednoduchá Buswellova rovnica vyplýva z nasledujúcej schémy²⁰:



pričom tvar rovnice je:



kde n , a , b sú počty atómov uhlíka, vodíka a kyslíka v zlúčenine.

Takže, ak je známa empirická rovnica substrátu resp. odpadu, potom nahradením relatívnych hodnôt pre n , a , b , je možné vypočítať množstvo získaného metánu z 1 tony organického komunálneho resp. priemyselného odpadu.

Použitie jednoduchej Buswellovej rovnice zahŕňa nasledovné zjednodušujúce predpoklady:

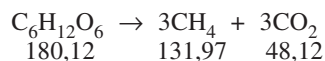
- pri anaeróbnom rozklade odpadu vzniká len CH_4 a CO_2 , toto neplatí pre nádoby na prepravu odpadov,
- nevznikajú iné stále medziprodukty,
- v procese rozkladu nepôsobia chemické inhibítory,
- všetok odpad je mineralizovateľný a neuvažuje sa nede gradovateľný materiál,
- zo žiadnej časti odpadu nevzniká mikrobiálny materiál,
- žiadna časť odpadu nie je využiteľná pre vznik mikrobiálnej energie.

K nevýhodám použitia tejto rovnice patrí:

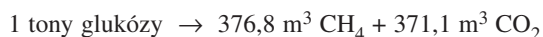
- jednoduchá Buswellova rovnica vyžaduje znalosť empirického vzorca odpadu resp. elementárnu analýzu odpadu, keďže táto rovnica zloženia odpadu môže byť rôzna pre rôzne skládky odpadov i pre rôzne miesta na tej istej skládke odpadov,
- nie sú tu uvažované fyzikálno-chemické premenné (tlak, teplota, súdržnosť vrstvy odpadu, produkcia priesakových kvapalín,...).

Rozklad glukózy

Množstvo metánu vznikajúceho rozkladom glukózy nachádzajúcej sa v komunálnom odpade, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, t.j. $n = 6$; $a = 12$; $b = 6$, na jednotlivých skládkach odpadov je možné vypočítať po dosadení rovnice glukózy do rovnice (I):



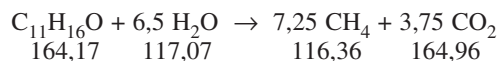
Z jednej tony glukózy môže vzniknúť 0,73 t CO_2 (131,97 / 180,12) a 0,27 t CH_4 (48,12 / 180,12). Na základe skutočnosti, že 1 mol plynu zaberá za normálnych podmienok 22,4 l, je možné určiť množstvo metánu vznikajúceho z rozkladu 1 t glukózy:



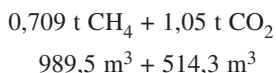
Pri rozklade glukózy vzniká cca 50 % CO_2 a 50 % CH_4 .

Rozklad mokrého odpadu

Pri rozklade mokrého odpadu, ktorého chemický vzorec je podľa^{7,21} $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}$, t.j. $n = 11$, $a = 16$, $b = 1$, ak odpad obsahuje len látky na báze C, H a O, vznikne z 1 t mokrého odpadu:



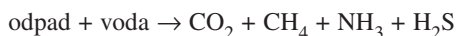
kde z 1 t mokrého odpadu vzniká:



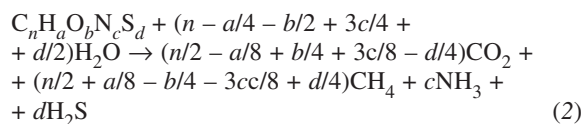
Pri rozklade mokrého odpadu vzniká cca 65,7 % CH_4 a 34,3 % CO_2 .

2.1.2. Rozšírená Buswellova rovnica

Rozšírená Buswellova rovnica vyplýva z nasledujúcej schémy²¹ a ako bolo uvedené na začiatku kapitoly 2, táto rovnica zahŕňa, na rozdiel od jednoduchej Buswellovej rovnice, aj obsah síry a dusíka v komunálnom odpade:



pričom tvar rovnice je:

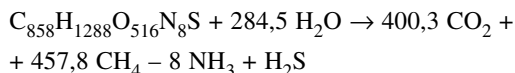


kde n , a , b , c , d sú počty atómov uhlíka, vodíka, kyslíka, dusíka a síry v zlúčenine.

Rozklad suchého odpadu

Empirický vzorec suchého odpadu vypočítaný podľa^{7,21} na základe údajov z chemickej analýzy, umožňuje po jeho

implementácii do rovnice (2) vypočítať množstvo metánu vznikajúceho z rozkladu 1 t suchého odpadu:



kde z 1 t suchého odpadu vzniká:

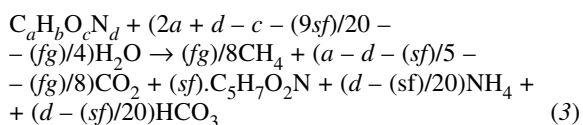
$$0,37 \text{ t CH}_4 + 0,88 \text{ t CO}_2 \\ 516,4 \text{ m}^3 + 448,1 \text{ m}^3$$

Pri rozklade suchého odpadu vzniká cca 53,5 % CH₄ a 46,5 % CO₂.

Rozklad odpadu so zahrnutím konverzie na biomasu a energiu

Počas anaeróbného rozkladu organického materiálu, bude malá časť substrátu konvertovaná na bakteriálnu biomasu a energiu. Táto premena môže byť popísaná nasledujúcou schémou²¹⁻²³:

organický materiál + voda $\xrightarrow{\text{mikrobiálna aktivita}}$ CH₄ + CO₂ + bakteriálna biomasu + iné konečné produkty + energia



kde vzorec biomasy podľa^{7,21} je uvažovaný v tvare C₅H₇O₂N, kde jednotlivé symboly v rovnici (3) znamenajú:

$$f = 4a + b - 2c - 3d$$

g – časť substrátu konvertovaná na energeticky zaujímavý CH₄,

s – časť materiálu konvertovaná do biomasy²⁰.

Použitie Buswellovej rovnice s konverziou zahŕňa nasledovné zjednodušujúce predpoklady:

- všetky organické materiály sú mineralizované,
- všetka síra sa premení na H₂S a žiadna nebude využitá pre mikrobiálnu aktivitu,
- hodnoty s a g sú konštantné.

Ďalšie zjednodušenia, ktoré je potrebné uvažovať sú:

- každá empirická rovnica je špecifická pre konkrétnu vzorku odpadu a nemôže byť reprezentatívnou hodnotou pre celú skládku odpadov,
- hodnoty s a g sú špecifické pre každý substrát a pre každú skupinu mikroorganizmov aktívnych pri degradácii odpadu, ktoré závisia na teplote,
- do úvahy sa neberú fyzikálno-chemické premenné vo vnútri skládky, ako sú teplota, vlhkosť, produkcia priesakových kvapalín, súdržnosť skládky, produkcia vodíka a prevzdušenie skládky.

Rozklad odpadu so zahrnutím jeho konverzie na biomasu a energiu

Podľa^{7,21} bolo navrhnuté používať pre biomasu chemický vzorec C₅H₇O₂N, ktorý je tiež zahrnutý do rozšíre-

nej Buswellovej rovnice. V prípade aplikácii rovnice (3) a berúc do úvahy hodnoty konštant z literatúry²²:

$$s = 0,04$$

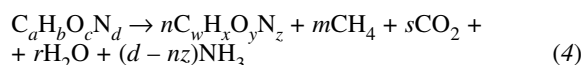
$$g = 0,96$$

je možné vypočítať pre 1 t odpadu, ktorého chemický vzorec je podľa⁷ C₉H₁₄₉O₅₉ a rozkladaného prostredníctvom rovnice (3) hodnoty:

$$0,37 \text{ t resp. } 268 \text{ m}^3 \text{ CH}_4, \\ 0,84 \text{ t resp. } 231 \text{ m}^3 \text{ CO}_2.$$

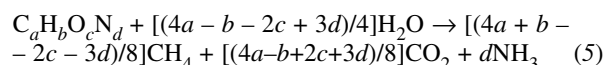
2.2. Peavyho rovnice

Anaeróbný rozklad (vyhnívanie), ako bolo spomínané v úvode príspevku, je proces využívaný na produkciu metánu z pevného a kvapalného organického odpadu (obr. 1), ktorý je popisovaný v literatúre¹¹ prostredníctvom rovnice (4):

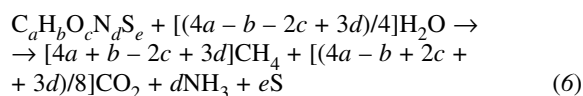


$$\text{kde} \quad s = a - nw - m, \\ r = c - ny - 2s.$$

Vzorci C_aH_bO_cN_d a C_wH_xO_yN_z reprezentujú molárny základ zloženia materiálu na začiatku a na konci procesu rozkladu odpadu¹¹. Pre rozklad stabilizovaného odpadu platí rovnica (5):

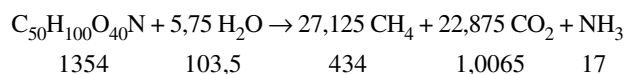


Takže, ak je známa empirická rovnica substrátu resp. odpadu, ktorý obsahuje aj síru, potom nahradením relatívnych hodnôt pre a, b, c, d, e je možné vypočítať množstvo získaného metánu z 1 tony organického komunálneho resp. priemyselného odpadu z rovnice (6):



Rozklad komunálneho odpadu

Pre výpočet teoretického objemu metánu z anaeróbného rozkladu 1 tony komunálneho odpadu, ktorého chemický vzorec je podľa¹¹ C₅₀H₁₀₀O₄₀N, bude použitá rovnica (5), pričom dostaneme:



– ďalej sa určí hmotnosť metánu produkovaného z 1 t komunálneho odpadu

$$M_{\text{CH}_4} = (434/1354) \cdot 1000 \text{ kg} \cdot \text{t}^{-1} = 320,5 \text{ kg} \cdot \text{t}^{-1}$$

– čo pri hustote metánu ρ = 0,7167 kg·m⁻³ (za normálnych

podmienok) znamená nasledovný objem vzniknutého metánu pre uvažovanú 1 tonu komunálneho odpadu

$$V_{\text{CH}_4} = 320,5/0,7167 = 447,2 \text{ m}^3 \cdot \text{t}^{-1}$$

Pri uvažovaní iného chemického zloženia komunálneho odpadu (vypočítaného autorom príspevku podľa priemerneho zloženia odpadov v SR) v tvare $\text{C}_{92,7}\text{H}_{220,4}\text{O}_{97,9}\text{N}$ bez síry resp. $\text{C}_{718,2}\text{H}_{1708,8}\text{O}_{759}\text{N}_{7,8}\text{S}$ so sírou, boli získané nasledovné objemy vznikajúceho metánu:

$$V_{\text{CH}_4} = 375,5 \text{ m}^3 \cdot \text{t}^{-1} \text{ podľa rovnice (5),}$$

$$V_{\text{CH}_4} = 375,2 \text{ m}^3 \cdot \text{t}^{-1} \text{ podľa rovnice (6).}$$

Na základe literárnych prameňov^{5,7,9,11}, na základe experimentálne získaných hodnôt^{10,15,19,22} i na základe praktických skúseností^{4,12,15,17}, je potrebné uvažovať pri získaných výsledkoch s ich vynásobením koeficientom 0,85. Dôvodom je zreálnenie vypočítaných výsledkov s praxou.

3. Záver

Keďže skládky odpadov a rovnako tak ani spaľovne odpadov v SR nespĺňajú v drvivej väčšine prípadov predpisy MŽ SR ani EÚ, je možné i tejto oblasti konštatovať neuspokojivý stav. Ďalej je treba podotknúť, že zo Zákona NR SR č. 223/2001 Z.z. z 15.5.2001 o odpadoch a o zmene a doplnení niektorých zákonov a z Vyhlášky NR SR č. 283/2001 Z.z. z 11.6.2001 o vykonaní niektorých ustanovení zákona o odpadoch, vyplýva pre prevádzkovateľov a majiteľov skládok odpadov, na ktorých sa ukládajú biologicky rozložiteľné odpady, povinnosť podľa § 27, bod 7: „Skládkový plyn sa musí zachytávať zo všetkých skládok odpadov, na ktoré sa ukládajú biologicky rozložiteľné odpady. Zachytený skládkový plyn sa musí upraviť a využiť na výrobu energie; ak sa zachytený skládkový plyn nemôže využiť na výrobu energie, musí sa spáliť.“

Toto sa v súčasnosti nerobí na žiadnej skládke odpadu v SR.

V neposlednom rade je potrebné konštatovať dve skutočnosti. Za prvé, že všetky výpočty vychádzajú z rovnakého teoretického základu a líšia sa veľmi málo, aj to len v započítavaní, resp. nezapočítavaní dusíkatých a sírych látok, ktorých obsah v komunálnom odpade je často veľmi malý. Za druhé, že trend spracovania organickej frakcie tuhých komunálnych odpadov jednoznačne smeruje od anaeróbneho rozkladu na skládkach odpadov k jeho intenzívnemu kontrolovanému rozkladu v špeciálnych anaeróbnych reaktoroch.

Táto práca bola podporovaná projektmi VEGA č.1/1105/04, VEGA č.1/9398/02 a VEGA 1/0555/03.

LITERATÚRA

1. Klinda J.: *Správa o stave životného prostredia*. Ministerstvo životného prostredia SR, Bratislava 2001.
2. <http://www.mpsr.sk>, stiahnuté 3.9.2001.
3. Klinda J.: *Katalóg indikátorov životného prostredia SR*. Ministerstvo životného prostredia SR, Bratislava 2000.
4. Weber B.: *Deponietechnik 1989* (4, 5).
5. Nakičenič N.: *Energy Gases-The Methan Age and Beyond. Znovuvydané vo The Future of Energy Gases, U.S.Geological Survey Professional Paper 1570*, str. 197. Institute for Applied Systems Analysis, Laxenburg 1994.
6. <http://www.economy.gov.sk>, stiahnuté 10.1.2002.
7. Emcon Associates: *Methane Generation and Recovery from Landfills*. Ann Arbor Sci., Ann Arbor, Mich., 1980.
8. Váňa J., Slejška A.: *Alternatívni energie 2002*, 5.
9. Tchobanoglous G. H., Eliassen R., Theisen J.: *Solid Wastes: Engineering Principles and Management Issues*. Mc Graw-Hill, New York 1977.
10. Winkler P. F.: *Compost Sci. 1973* (14,5).
11. Peavy H. S.: *Environmental Engineering*. Mc Graw-Hill, New York 1985.
12. Wagnerová E.: *8. mezinárodní konference při příležitosti 50. výročí založení VŠB Fakulty strojní, Ostrava, 9.-11. september 2000*, str. 124. VŠB, Ostrava 2000.
13. Horbaj P.: *Habilitačná práca*. Technická univerzita, Košice 1996.
14. Ladomerský J.: *Energetika a životné prostredie*. Edičné stredisko TU Zvolen, Zvolen 2000.
15. <http://www.hofstetter.ch>, stiahnuté 15.2.2002.
16. Kačík F., Kačíková D.: *Fyzikálna chémia a fyzikálno-chemické analytické metódy*. Edičné stredisko TU Zvolen, Zvolen 1998.
17. Firemné materiály: Gazotech, Bardejov 2001; Spaľovňa odpadov, Košice 1993.
18. <http://www.tzb-info.cz>, stiahnuté 20.8.2002.
19. <http://www.biom.cz>, stiahnuté 20.9.2002.
20. Buswell M. A.: *Ind. Eng. Chem.* 22, 1168 (1930).
21. Buswell M. A., Mueller H. F.: *Ind. Eng.Chem.* 44, 550 (1930).
22. Price E. C., Cheremisinoff P. N.: *Biogas Production and Utilization*. Ann Arbor Sci., Ann Arbor, Mich., 1981.
23. <http://www.orbit-online.net>, stiahnuté 20.1.2002.

P. Horbaj (Department of Power Engineering, Faculty of Engineering, Technical University, Košice): **Theoretical Calculation of Methane Formation from Municipal Waste**

Due to a utilizable energy content in ever-increasing amounts of municipal waste, the article deals with its potential use for obtaining energy, specifically with the calculation of the methane amount formed in the waste decomposition, using the Buswell and Peave equations.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

KRYSTALIZACE A SKELNÝ PŘECHOD KANDYTŮ VYROBENÝCH Z ISOMALTU

IRENA ŠMÍDOVÁ^a, JANA ČOPIKOVÁ^a,
ANTONÍN SIKORA^b a MARTIN MARYŠKA^c

^aÚstav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav makromolekulární chemie, Akademie věd České Republiky, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ^cÚstav skla a keramiky, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
smidovai@vscht.cz

Došlo 23.6.03, přijato 4.9.03.

Klíčová slova: kandyty, isomalt, krystalizace, skelný přechod, diferenciální skanovací kalorimetrie, rentgenová difrakce, polarizační mikroskopie

Úvod

Kandyty jsou nečokoládové cukrovinky¹, které byly původně vyráběny ze sacharosy a hydrolyzátů škrobu, tj. škrobového sirupu nebo maltosového sirupu a vody. Škrobový sirup se získává kyselou hydrolyzou, maltosový sirup enzymovou hydrolyzou a také je využívána kombinovaná hydrolyza bramborového nebo obilného škrobu. V současné době se vyrábějí kandyty také z alditolů a redukováných škrobových nebo maltosových sirupů (maltitolových sirupů). Kandyty z alditolů mají sníženou energetickou hodnotu, nezpůsobují kazivost zubů a patří mezi potraviny pro zvláštní výživu. V případě alditolů připadá v úvahu zejména D-glucitol a isomalt, někdy se objevují kandyty s laktitolem. Isomalt (palatinin) je ekvimolární směs α -D-glukopyranosyl-1,6-glucitolu a α -D-glukopyranosyl-1,6-mannitolu a vyrábí se hydrogenací palatinosy (6-O- α -D-glukopyranosyl-D-fruktosa).

V každém případě by kandyty měly obsahovat cukry pouze v amorfním stavu. Amorfní látky se mohou vyskytovat ve velmi viskózním sklovitém stavu nebo méně viskózním kaučukovitým stavu². Přechod mezi těmito stavy se obecně nazývá skelný přechod. Teplota, která přechod charakterizuje, se nazývá teplota skelného přechodu T_g (cit.³). Jde spíše o teplotní interval, než o přesnou teplotu, což je typickou vlastností fázových přechodů 2. řádu^{2,3}. Skelný stav je nerovnovážný stav. Hnací síly vedoucí ke krystalizaci jsou zde velmi silné, avšak vysoká viskozita sklovitých kandytů brání krystalizaci redukcí molekulární pohyblivosti⁴, a proto molekuly nemohou zaujmout místo v krysta-

lové struktuře. Pokud se však viskozita sníží, může dojít ke zvýšení molekulové pohyblivosti a tím ke krystalizaci. Ke snížení viskozity může dojít buď zvýšením obsahu vlhkosti, nebo zvýšením teploty nad T_g .

Při výrobě kandytů ze sacharosy^{5,6} je nutné používat škrobový nebo maltosový sirup, případně jejich redukované produkty. Škrobový a maltosový sirup zvyšují teplotu skelného přechodu tradičních kandytových hmot. Naopak voda je hlavní změkčovadlo a tudíž její obsah by měl být co nejnižší. Maximální hodnota teploty skelného přechodu u kandytů, které neobsahují krystaly, se pohybuje kolem 60 °C. V případě kandytů vyráběných z isomaltu může naopak přídavek sirupu krystalizaci urychlit⁸. Krystalizace během skladování je jedna z nejvýznamnějších vad kandytů.

V tomto článku bude věnována pozornost kandytům vyráběných z isomaltu, kdy se v receptuře nepoužívají hydrolyzáty škrobu.

Isomalt taje při 145–150 °C. Když je zahříván nad tuto teplotu a pak je rychle ochlazen, utuhne kapalina v průhledné sklo. Díky nízké hygroskopicitě materiálu se netvoří lepkavý povrch, což je výhodné pro výrobu tvrdých bonbonů – kandytů⁷.

Sorpční izotermy isomaltu ukazují, že při teplotě 25 °C a relativní vlhkosti vzduchu do 85 % neabsorbuje výrazněji vlhkost⁷, proto může být snadno skladován a distribuován bez zvláštní péče. Nízká hygroskopicitá je důležitá fyzikální vlastnost, která vysvětluje, proč produkty založené výhradně nebo hlavně na isomaltu se nestávají lepkavými a mají dlouhou trvanlivost. Kandyty vyrobené z tradičních surovin, tj. sacharosy a škrobového sirupu, mají rovnovážnou relativní vlhkost vzduchu kolem 30 %, a proto musí být používány vhodné obaly. Současně musí být výrobky skladovány za požadovaných podmínek.

Senzorická kvalita, např. sklovitý vzhled a nelepkavý povrch, a skladovatelnost kandytů jsou dány jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. K charakterizaci těchto vlastností se jeví jako užitečné sledování jejich hygroskopicity, stanovení teploty skelného přechodu, která by měla být co nejvyšší a stanovení přítomnosti krystalické fáze, případně jejího obsahu. V tomto článku byly sledovány změny hmotnosti kandytů během skladování při relativní vlhkosti 65 %, což je obvyklá relativní vlhkost vzduchu na území České republiky, přítomnost krystalické fáze byla identifikována pomocí polarizační mikroskopie a rentgenové difrakce a konečně teplota skelného přechodu byla stanovena pomocí diferenciální skanovací kalorimetrie.

Materiál a metody

Vzorky kandytů vyrobených z isomaltu byly měřeny 14 dní ode dne výroby a znovu po týdenním skladování při stálé relativní vlhkosti vzduchu 65 %. Skladování při rela-

Tabulka I
Počáteční složení kandytů

Vzorek č.	Obsah [hm. %]					
	H ₂ O	isomalt	fruktosa	glukosa	sacharosa	maltosa
1	2,25	97,07	–	–	–	–
2	2,25	97,07	–	–	–	–
3	1,53	97,83	–	–	–	–
4	1,53	97,83	–	–	–	–
5	1,63	97,66	–	–	–	–
6	1,14	95,09	–	–	–	–
7	4,90	–	8,55	12,44	59,50	0,70
8	2,50	–	0,39	3,73	43,36	21,27

tivní vlhkosti vzduchu 65 % probíhalo nad nasyceným roztokem NaNO₂ v uzavřeném prostoru⁸ při laboratorní teplotě.

Vlhkost

Počáteční vlhkost kandytů byla měřena metodou Karla Fischera (Karl Fischer Titrator AF8 ThermoOrion, USA). Absorpce vlhkosti při skladování byla zjišťována vážením jednotlivých cukrovinek.

HPLC

Složení kandytů bylo stanoveno kapalinovou chromatografií HPLC. Vzorek o hmotnosti 5 gramů byl rozpuštěn v destilované vodě a objem roztoku byl doplněn na 100 ml v odměrné baňce. Před dávkováním na kolonu byl roztok přefiltrován pomocí diskového mikrofiltru s velikostí pórů 0,45 μm. Objem nastříkovaného vzorku byl 20 μl. HPLC sestava byla následující: předkolonka 3,3 × 30 mm Separon SGX NH₂, kolona Tessek s náplní Separon SGX NH₂ velikost částic 5 μm (ČR), mobilní fáze acetonitril:voda 75:25, průtok na koloně 1,0 ml.min⁻¹, teplota 30 °C, čerpadlo Delta Chrom™ SDS 030 Watrex (ČR), detektor Refracto-Monitor IV (USA). Data byla získána a zpracována pomocí DATA Apex software (ČR).

Polarizační mikroskopie

Vzorky krystalů isomaltu a reprezentativní vzorky kandytů před a po skladování byly studovány pomocí polarizační mikroskopie optickým mikroskopem Jenapol-Carl Zeiss Jena (SRN), se zkříženými nikoly; snímky byly zaznamenány digitální barevnou kamerou Hitachi HV-C20M (3 CCD elements) (Japonsko) a vyhodnoceny programem LUCIA 4.21 (ČR). Tenký plátek nebo úlomek z každého vzorku byl měřen přímo na mikroskopickém podložním sklíčku.

Diferenciální skanovací kalorimetrie

Měření byla provedena na přístroji DSC Pyris 1 Perkin-Elmer (USA). Teplotní a výkonová kalibrace byly provedeny pomocí teploty tání india a tepelné kapacity korundu. Navážky vzorku se pohybovaly mezi 4 až 5 mg. Vzorky byly uzavřeny v hliníkových nádobkách a ohřívány s rychlostí ohřevu 20 °C za min. Teplota skelného přechodu byla vyhodnocena programem Pyris software for Windows.

Rentgenová difrakce

Měření byla provedena na RTG difraktometru X'Pert firmy PANalytical (Holandsko). Podmínky měření: Anoda Cu, zatížení 40 kV, 30mA; monochromátor v difraktovaném svazku; clony...D.S.1/2, A.S1/2, R.S.0.2; velikost kroku 0,02° 2 θ; načítací doba 0,6 s v kontinuálním uspořádání. Rozsah měření 3–50° 2 θ.

Výsledky a diskuse

Výsledky stanovení počáteční vlhkosti a složení kandytů jsou v tabulce I. Zkoumané kandyty byly vyrobeny pouze z isomaltu, bez přídavku jiných surovin, které zlepšují stabilitu skla a brání krystalizaci. Počáteční vlhkost kandytů se pohybovala kolem 1–2 %. Tato hodnota je uspokojivá pro udržení kvality kandytů během skladování po dlouhou dobu bez nežádoucích změn⁷. V tabulce I jsou pro ilustraci také uvedeny rozbor typické kandytové hmoty vyrobené ze sacharosy a škrobového sirupu (vzorek č. 7) nebo ze sacharosy a maltosového sirupu (vzorek č. 8).

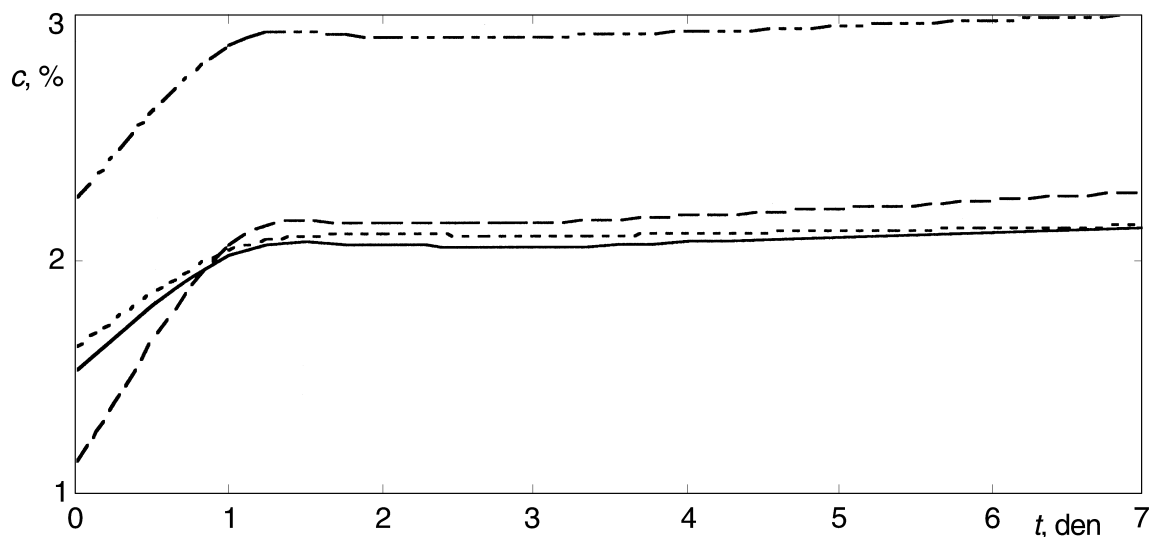
Absorpce vody

Pro zjištění absorpce vody byly vybrány 4 kandyty podle druhu, a to vzorky 1, 3, 5 a 6. Kandyty 1 a 2 a kandyty 3 a 4 se od sebe lišily pouze barvou a příchutí. Váže-

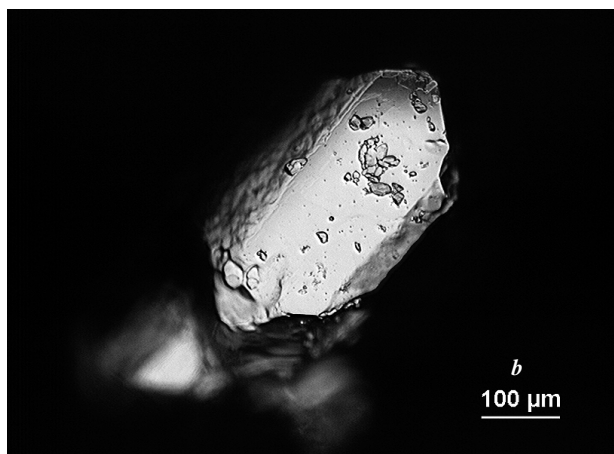
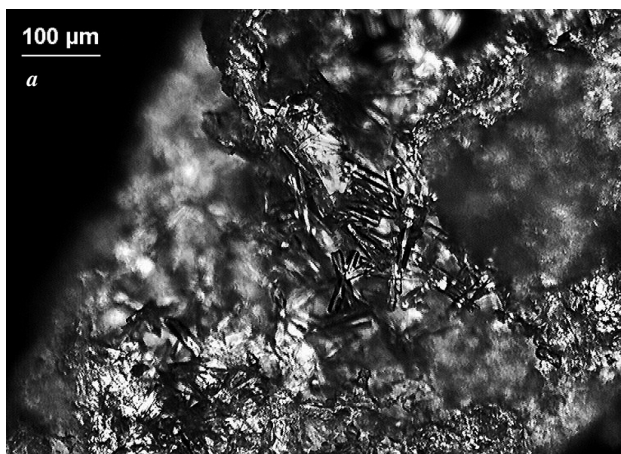
ním těchto kandytů po jednom, dvou, třech dnech a po týdnu skladování při relativní vlhkosti vzduchu 65 % a laboratorní teplotě bylo zjištěno množství absorbované vody jako přírůstek hmotnosti (%). Největší přírůstek byl pozorován první den po vložení do prostředí se stálou vzdušnou vlhkostí. Po prvním dnu skladování při relativní vlhkosti vzduchu 65 % zůstal obsah vody v kandytech téměř konstantní. Nejvíce vody absorboval vzorek číslo 6, který měl nejnižší počáteční vlhkost. Konečná vlhkost v kandytech nepřesáhla významně 3 % ani po 7 dnech skladování v atmosféře s relativní vlhkostí vzduchu 65 % (obr. 1).

chem. Vytváří se zde aglomeráty z jednotlivých malých krystalků, které se liší velikostí a mohou být i menší než 5 μm . Podle literatury⁷ by kandyty vyrobené z isomaltu neměly obsahovat žádné krystaly.

Z obr. 3 je zřejmé, že vzorek kandytu před skladováním obsahuje ojedinělé malé krystalky ve hmotě. Tyto krystalky jsou pravděpodobně způsobeny špatným rozpuštěním isomaltu při výrobě cukrovinky. Výskyt nerozpuštěných krystalů ve hmotě může podporovat krystalizaci v celé hmotě výrobku, protože způsobuje nukleaci dalších krystalů.



Obr. 1. Obsah vody v kandytech (c) v závislosti na čase; - · · - vzorek 1, — vzorek 3, - - - vzorek 5, - - - - vzorek 6

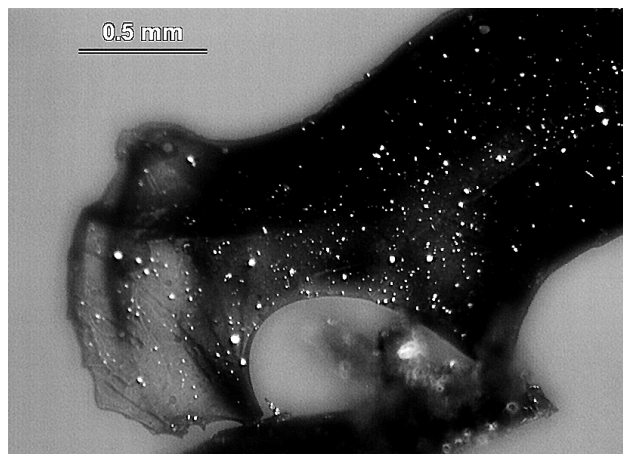


Obr. 2. (a) Krystalický isomalt a (b) krystal sacharosy

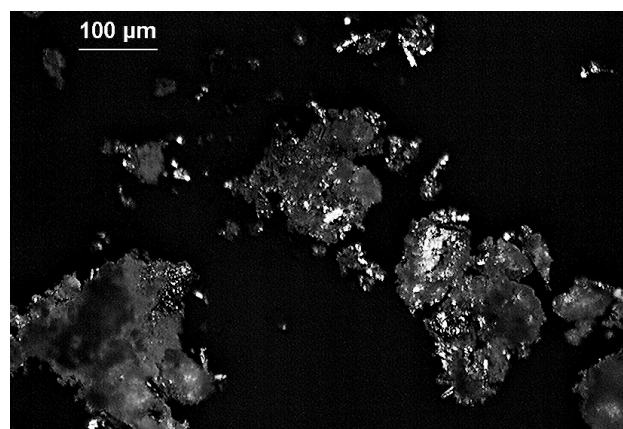
Polarizační mikroskopie

Na obr. 2 je snímek krystalu krystalického isomaltu (a) a sacharosy (b). Isomalt na obr. 2 byl překryštalizován z isomaltu, který slouží jako surovina k výrobě kandytů. Na tomto obrázku isomalt netvoří krystaly s pravidelným povr-

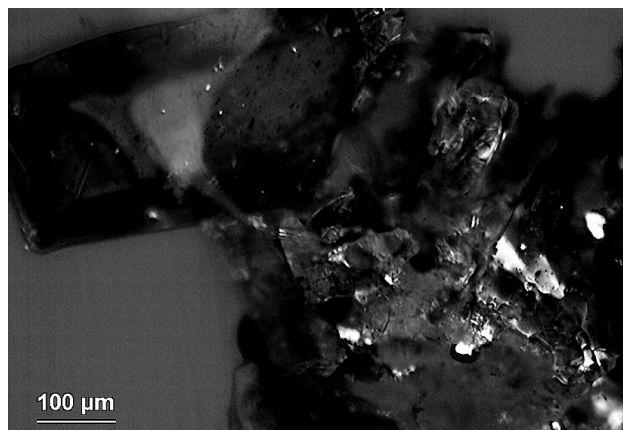
U vzorků skladovaných při relativní vlhkosti vzduchu 65 % byl studován zvláště povrch a vnitřní část. Povrch skladovaného kandytu byl „omřelý“ s vrstvou krystalů (obr. 4). Vnitřní část skladovaného kandytu obsahovala ojedinělé shluky krystalků (obr. 5), nepatrně zvětšené oproti kandytu analyzovanému 14 dní ode dne výroby.



Obr. 3. Vnitřní část kandytu před skladováním



Obr. 4. ‚Omřelý‘ povrch skladovaného kandytu s vrstvou krystalů



Obr. 5. Vnitřní část skladovaného kandytu s ojedinělými shluky krystalků

Diferenciální skanovací kalorimetrie

Teplota skelného přechodu T_g krystalického isomaltu při podmínkách popsaných v této práci je 75,8 °C. Údaje o teplotě skelného přechodu čistého isomaltu se v literatuře liší a pohy-

bují se od 34 °C (cit.¹¹), 59,3 °C (cit.¹²), do 63,6 °C (cit.¹⁰). Teploty skelného přechodu vzorků naměřené v této studii se pohybují od 49 °C do 55,8 °C (tab. II a III). Pokud budou kandyty skladovány při teplotě, která je nižší než teplota jejich skelného přechodu, lze předpokládat dobrou stabilitu a trvanlivost. Kandyty udrží svůj tvar a nebudou se slepovat, roztékat ani krystalizovat během skladování.

Teplota tání isomaltu T_m se podle literatury pohybuje okolo 145–150 °C (cit.⁷) resp. 142 °C (cit.¹²). Tání čistého isomaltu v uvedených podmínkách nastalo při 127,3 °C (tab. II). Průměrná hodnota tepla tání ΔH_m isomaltu naměřené v této práci je 110 J.g⁻¹ (tab. II), Ndindayino¹³ však uvádí hodnotu až 137,3 J.g⁻¹.

Tabulka II

Výsledky diferenciální skanovací kalorimetrie isomaltu a kandytů před skladováním

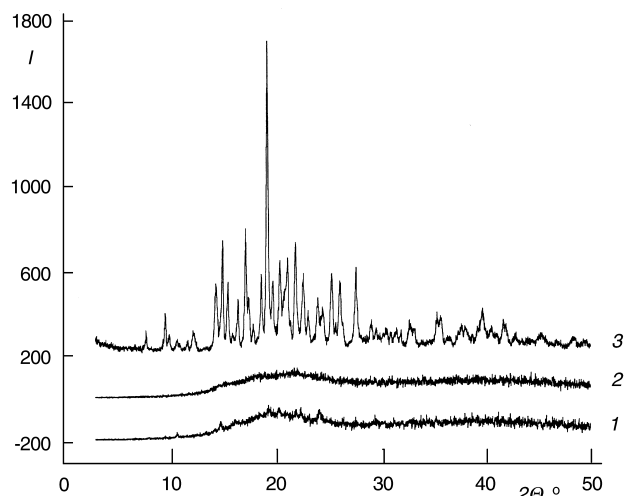
Vzorek	T_g [°C]	T_m [°C]	ΔH_m [J.g ⁻¹]
Isomalt	74,90	127,30	112,30
Isomalt	76,70	127,30	107,70
Průměr	75,80	127,30	110,00
1	50,20	75,70	1,20
2	53,90	–	–
3	53,60	73,70	0,30
4	53,00	78,80	0,90
5	53,00	82,10	0,40
6	53,30	82,00	0,40
7	27,60	155,00	1,90
8	63,00	–	–

Tabulka III

Výsledky diferenciální skanovací kalorimetrie kandytů po 7 dnech skladování při relativní vlhkosti vzduchu 65 %

Vzorek	T_g [°C]	T_m [°C]	ΔH_m [J.g ⁻¹]	T_{m2} [°C]	ΔH_{m2} [J.g ⁻¹]
1	49,00	–	–	95,90	13,80
2	53,40	–	–	96,60	23,30
3	55,80	–	–	80,80	1,20
4	54,60	70,60	–	78,40	0,30
5	49,60	82,10	0,30	96,90	6,70
6	54,90	81,50	0,21	94,20	6,10

Na termogramech vzorků kandytů měřených před i po skladování se vyskytují nevýrazné endotermní píky. Jejich poloha na teplotní škále a velmi malé entalpické zabarvení ukazují na to, že při těchto teplotách pravděpodobně probíhá tání nedokonale vyvinutých zárodečných krystalických struktur, které vznikají při relaxaci kandytů při laboratorní teplotě (tab. II a III). Teploty T_g byly stanoveny pro povrchovou vrstvu.



Obr. 6. RTG difraktogramy vzorků před (2) a po skladování (1) a RTG difraktogram isomaltu (3)

Pro srovnání jsou v tabulce II uvedeny teploty skelného přechodu T_g a popřípadě teplota tání T_m kandytů vyrobených ze sacharosy a škrobového (7) resp. maltosového (8) sirupu¹⁴. Teplota skelného přechodu kandytu vyrobeného ze škrobového sirupu je nízká 27,6 °C a je možno očekávat, že tato cukrovinka se bude během skladování nebo prodeje roztékat. Naopak kandyt vyrobený z maltosového sirupu má vysokou hodnotu $T_g = 63$ °C.

Rentgenová difrakce

Pomocí rentgenové difrakce byl vzorek proměřen před a po skladování (obr. 6). Pro srovnání je zde uveden i difraktogram krystalického isomaltu. Vzorek před skladováním se zde jeví jako zcela amorfní. Rentgenová difrakce neprokázala výraznější výskyt krystalů ani ve vzorku po týdenním skladování v prostředí s 65% vlhkostí.

Závěr

Teplota skelného přechodu a výskyt krystalů v kandytech ovlivňuje jejich kvalitu a skladovatelnost. Pokud je teplota skelného přechodu nižší než skladovací teplota, může docházet ke krystalizaci skelného materiálu, k roztékání výrobku a ztrátě jeho tvaru během skladování. Obsah vody, složení a hygroskopicitu kandytů ovlivňuje významně teplotu skelného přechodu.

Isomalt je ideální modelový materiál pro výrobu kandytů s ohledem na jejich trvanlivost. Má nízkou hygroskopicitu a dobrou stabilitu skelného stavu, vzhledem k vysoké teplotě skelného přechodu. V současné době získává toto sladidlo stále větší využití v cukrovinkách se sníženou energetickou hodnotou, které nezpůsobují kazivost zubů.

Polarizační mikroskopie a rentgenová difrakce jsou důležitější metody, které umožňují sledovat výskyt krystalů během skladování kandytů. Polarizační mikroskopie překvapivě prokázala přítomnost krystalů již krátce po výrobě a potom jejich nárůst během skladování při laboratorní teplotě a relativní vlhkosti vzduchu 65 %. Povrchové vrstvy se jeví jako více krystalické. Rentgenovou difrakcí se přítomnost krystalů nepodařilo prokázat a vzorky před i po skladování se jeví jako amorfní.

Pomocí diferenciální skanovací kalorimetrie lze zaznamenat fázové změny, krystalizaci a tání vzorku, nebo skelný přechod. Je to metoda dostatečně efektivní pro zachycení velmi malých změn energie v relativně širokém teplotním rozsahu. Podařilo se změřit hodnoty skelného přechodu kandytů vyrobených z isomaltu před skladováním a po skladování při relativní vlhkosti vzduchu 65 % a laboratorní teplotě a zaznamenat entalpické změny způsobené táním přítomných krystalických struktur.

Seznam zkratk a symbolů

T_{m1}, T_{m2}	teploty tání, °C
T_g	teplota skelného přechodu, °C
$\Delta H_{m1}, \Delta H_{m2}$	tepla tání, J.g ⁻¹

LITERATURA

- Čopíková J.: *Chemie a analytika sacharidů*. Skriptum VŠCHT, Praha 1997.
- Roos Y. H.: *Phase Transition in Foods*. Academic Press, San Diego 1995.
- Sperling, L. H.: *Introduction to Physical Polymer Science*. Wiley, New York 1986.
- Gabarra P., Hartel R. W.: *J. Food Sci.* 63 (3), 523 (1998).
- Klacik K.: *The Manufacturing Confectioner* 73, 59 (1993).
- Anderson L. J.: *The Manufacturing Confectioner* 75, 33 (1995).
- Fritzsching B.: *The Manufacturing Confectioner* 75, 65 (1995).
- Ginzburg A. S., Savinová I. M.: *Vlastnosti potravinářských výrobků pro sdílení vody*. SNTL, Praha 1989.
- Raudonus J., Bernard J., Janssen H., Kowalczyk J., Carle R.: *Food Res. Int.* 33(1), 41 (2000).
- <http://www.isomalt.de>, staženo 10.4.2003.
- <http://www.cerestar.com>, staženo 10.4.2003.
- Cammenga H. K., Zielasko B.: *Termochim. Acta* 271, 149 (1996).
- Ndindayino F., Henrist D., Kiekens F., Van der Mooter G., Vervaeet C., Remon J. P.: *Int. J. Pharm.* 235, 149 (2002).
- Šmídová I., Čopíková J., Maryška M., Sikora A.: *XXXIV. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 26. – 28. 5. 2003*, Sborník příspěvků, str. 296. VÚPP, Praha 2003.

I. Šmídová^a, J. Čopíková^a, A. Sikora^b, and M. Maryška^c (^a*Department of Chemistry and Technology of Saccharides, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,* ^c*Department of Glass and Ceramics, Institute of Chemical Technology, Prague*): **CrySTALLIZATION and Glass Transition of Candies from IsoMalt**

The main purpose of the present contribution is the study of the glassy state and the presence of crystals in hard Isomalt candies. Crystallization in the glassy state of hard

candies occurs as a result of the bad formulation, processing or storage and can be detrimental to the product quality. Samples were measured two weeks after the date of production and then after storage in a closed space with relative humidity 65 %. Differential scanning calorimetry was used to determine the glass transition temperature T_g and the amount of crystals. Polarisation microscopy and X-ray diffractometry were used to show the undesirable presence of crystals. The saccharide composition of samples was determined by HPLC and the water content by the Karl Fischer method. Water absorption after storage was determined by weighing.



Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Fakulta ekonomicko-správní

pořádá veletrh pracovních příležitostí

KONTAKT 2004

dne 29.4.2004 v Aule Univerzity Pardubice

Program:

8:00–10:00 registrace firem
 10:00–15:00 ústní prezentace v aule
 firemní prezentace u stánků

Kontakt 2004 je prezentací firem působících v ČR s cílem informovat studenty o profilech firem a možnostech uplatnění absolventů. K dispozici bude katalog s informacemi o zúčastněných firmách.

Bližší informace o veletrhu, přihlášky k účasti a podmínky účasti je možné získat na děkanátu Fakulty chemicko-technologické, www.upce.cz, kontaktní osoby: doc. Ing. Ladislav Svoboda, CSc. a Ing. Iva Ulrichová, CSc., nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, dekanat@upce.cz, tel. 466 037 514, –507.

ÚČINOK BISKVARTÉRNÝCH AMÓNIOVÝCH SOLÍ NA RAST A METABOLICKÉ PROCESY *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES *ENTERICA* SÉROVAR TYPHIMURIUM DT104

TOMÁŠ MAJTÁN¹, LUBICA MAJTÁNOVÁ^{2*}
a DUŠAN MLYNARČÍK³

¹Ústav molekulárnej biológie SAV, Dubravská cesta 21, 845 51 Bratislava, ²Ústav preventívnej a klinickej medicíny, Limbová 14, 833 01 Bratislava, ³Farmaceutická fakulta UK, Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Kalinčiaková 8, 832 32 Bratislava
majtanova@upkm.sk

Došlo 27.8.02, prepracované 14.10.03, prijaté 21.10.03.

Kľúčové slová: biskvartérne amóniové zlúčeniny, ¹⁴C-prekurzory, respirácia, *Salmonella enterica* subspecies *Enterica* serovar Typhimurium

Úvod

V 90. rokoch minulého storočia sa medzinárodne objavili kmene *Salmonella enterica* subspecies *Enterica* serovar *Typhimurium* definitívneho fágotypu 104 (*S. Typhimurium* DT104) ako významná príčina potravou prenášaných ochorení ľudí. Kmene tohto fágového typu sa po prvý raz objavili v Anglicku¹, ale v nasledujúcich rokoch sa izolovali tiež v ďalších štátoch ako v Nemecku², USA³, Kanade⁴, Taliansku⁵, Českej republike⁶, Rakúsku⁷ a v Slovenskej republike⁸.

Kmene *S. Typhimurium* DT104 predstavujú klon, ktorý je charakteristický svojou multirezistenciou voči antibiotikám. Väčšina izolátov sa vyznačuje pentarezistenciou voči ampicilínu, chloramfenikolu, streptomycínu, sulfonamidom a tetracyklínu a predstavujú rezistentný typ ACSSuT. Gény kódujúce rezistenciu sú kódované chromozomálne na integrónoch. Okrem charakteristickej pentarezistencie sa vyskytujú aj kmene so zníženou alebo naopak zvýšenou rezistenciou, ale aj kmene citlivé voči antibiotikám.

Biskvartérne amóniové soli (BQAS) patria do skupiny kationových povrchovo aktívnych zlúčenín. BQAS sa zaraďujú k membránovo aktívnym zlúčeninám viažucich sa na cytoplazmovú membránu a ovplyvňujúcich metabolizmus bunky⁹⁻¹¹. V dôsledku ich povrchovej aktivity boli úspešne použité na elimináciu plazmidov pKM101 a F⁺lac z kmeňov *S. Typhimurium* a *E. coli*¹².

V článku referujeme o účinku BQAS odvodených od kyseliny L-vínnej na rast, biosyntetické procesy (syntéza nukleových kyselín a proteínov) a na respiráciu buniek multirezistentného kmeňa *S. Typhimurium* DT104.

*korešpondujúci autor

Experimentálna časť

Bakteriálny kmeň

Kmeň *S. Typhimurium* DT104 bol izolovaný od pacienta s gastroenteritídou a fágotyp bol identifikovaný v Národnom referenčnom centre pre fagotypizáciu salmonel na Ústave preventívnej a klinickej medicíny v Bratislave. Kmeň bol rezistentný voči ampicilínu, chloramfenikolu, streptomycínu, sulfonamidu a tetracyklínu.

Študované zlúčeniny

Použili sa chromatograficky čisté biskvartérne amóniové soli homologického radu *N,N'*-bis[2-(alkyldimethylamnio)etyl]amidy kyseliny L-vínnej zosyntetizované doc. Lackom na Farmaceutickej fakulte UK v Bratislave. Ich štruktúra je znázornená v schéme 1.

Ako kultivačné médium sa použilo minimálne syntetické médium¹³ na prípravu bakteriálnych suspenzií na stanovenie antibakteriálnej aktivity, inkorporácie ¹⁴C-prekurzorov a respirácie.

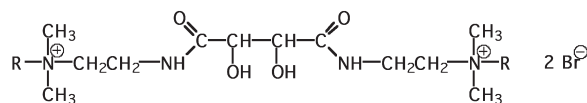


Schéma 1. Štruktúra študovaných zlúčenín

Určenie antibakteriálnej účinnosti

Bakteriálna suspenzia sa pripravila z inokula kmeňa *S. Typhimurium* DT104 ($A_{600} = 0,8$) inokulovaním 0,4 ml do 6,5 ml syntetického kultivačného média v L-skúmavkách, ktoré súčasne slúžili ako kyvety na meranie absorbancie. Študované BQAS rozpustené a zriedené do požadovaných koncentrácií v sterilnej destilovanej vode boli pridané v množstve 0,1 ml. Kultivácia prebiehala za podmienok intenzívnej aerácie pri 37 °C, 24 h. Rast sa sledoval spektrofotometricky pri 600 nm (Specol, Carl Zeiss, Jena, Nemecko).

MIC sa určila ako najnižšia koncentrácia látky, ktorá inhibovala rast bakteriálnej kultúry. Hodnoty ED₅₀ sa vypočítali matematicko-grafickou metódou z rastových kriviek po 8 h kultivácie. Hodnoty ED₅₀ predstavujú koncentráciu látky, ktorá vyvolala 50% potlačenie rastu.

Inkorporácia ¹⁴C-prekurzorov

0,4 ml suspenzie bakteriálneho kmeňa ($A_{600} = 1,0$) sa inokulovalo do 10 ml syntetického média a suspenzie sa in-

kubovali za podmienok intenzívnej aerácie pri 37 °C do logaritmickej fázy rastu ($A_{600} = 0,8-1,0$). Suspenzia sa rozdelila do skúmaviek po 1 ml, ku ktorej sa pridalo 10 μ l testovanej zlúčeniny v požadovanej koncentrácii. Zmesi sa predinkubovali 10 min za podmienok intenzívnej aerácie pri 37 °C. Do prvej série skúmaviek, v ktorej sa zistovala inhibícia syntézy nukleových kyselín, sa pridalo 5 μ l [14 C]adenínu a do druhej série skúmaviek, kde sa sledovala inhibícia syntézy proteínov, sa pridalo 10 μ l [14 C]leucínu. Inkubácia s prekuzormi trvala 1 h pri 37 °C za podmienok intenzívnej aerácie. Obe série skúmaviek sa potom preniesli na 30 min do ľadového kúpeľa, pričom do každej skúmavky sa pridal 1 ml ľadovej 10% kyseliny trichlóroctovej. Po odstredení sa precipitáty premyli 1 ml ľadovej 5% kyseliny trichlóroctovej. K precipitátom sa po odstredení a odstránení supernatantu pridalo 5 ml scintilačnej kvapaliny a rádioaktívita sa merala na scintilačnom počítači (Rack-Beta, LKB, Švédsko).

Respirácia

Respirácia sa určila polarograficky použitím Clarkovej elektródy na oxygrafe (Gilson Medical Electronics, Yellow Springs, USA). Nočná kultúra študovaného kmeňa v exponenciálnej fáze rastu ($A_{600} = 0,8-1,0$) sa scentrifigovala, bunky sa premyli dvakrát TRIS – tlmivým roztokom (pH 7,4) a koncentrovali sa na hustotu zodpovedajúcu 80 mg suchej váhy na 1 ml. Do nádoby oxygrafu sa pipetovalo 1,5 ml TRIS – tlmivého roztoku. Spotreba kyslíku sa monitorovala, keď systém dosiahol teplotu 37 °C. Suspenzia buniek bola pridaná za konštantného miešania. Monitorovanie trvalo 10 min a lineárna časť krivky sa použila na výpočet rýchlosti spotreby kyslíku. Rýchlosť respirácie sa vyjadriala v nanomóloch spotrebovaného kyslíku za minútu zodpovedajúcu suchej váhe buniek.

Pri určovaní exogénnej respirácie sa použili nasledovné substráty: glukóza, octan sodný, glycerol, jantaran sodný, glutamát sodný, asparagín, 2-oxoglutarát sodný, pyruvát pripravené ako 0,2 M roztoky v TRIS – tlmivom roztoku (pH 7,4).

Výsledky a diskusia

Kvartérne amóniové soli (QAS) predstavujú farmaceuticky významnú skupinu zlúčenín s povrchovo aktívnymi, solubilizačnými a antimikrónnymi vlastnosťami. Viazu sa na cytoplazmovú membránu buniek, ktoré týmto spôsobom poškodzujú, a pritom zasahujú do metabolických procesov buniek. Je známe, že biskvartérne amóniové soli (BQAS) sú účinnejšie na gramnegatívne baktérie¹⁴, avšak v praxi sa uplatňujú prevažne zlúčeniny s relatívne jednoduchou štruktúrou¹⁵.

Študované BQAS predstavujú deriváty kyseliny L-vínnej s rôznou dĺžkou alkylového reťazca. Ich antibakteriálna aktivita na testovaný multirezistentný kmeň *S. Typhimurium* DT104 vyjadrená hodnotami MIC a ED₅₀ je znázornená v tab. I. V rámci homologického radu BQAS boli na testovaný

vaný kmeň najúčinnejšie látky substituované dodecylom (MIC = 3,125–6,25 μ g.ml⁻¹) a tetradecylom (MIC = 6,25–12,5 μ g.ml⁻¹), čo korelovalo aj s hodnotami ED₅₀. Látka substituovaná najkratším alkydom – oktylom – bola na testovaný kmeň neúčinná. Hodnota jej MIC bola vyššia ako 400 μ g.ml⁻¹. Pri hodnotení antibakteriálnej aktivity sa prejavil „cut-off“ efekt, keď so zväčšujúcim sa alkydom rástla antimikrónna aktivita až po optimum. Ďalším predĺžovaním alkydu však antimikrónna aktivita klesala. Tento efekt je známy pri rozličných typoch zlúčenín a dokázal sa aj v homologických radoch kvartérnych mono- aj bisamóniových zlúčenín na viacerých bakteriálnych kmeňoch^{10,11,15-18}. Rovnako sa menili hodnoty ED₅₀, ktoré sú presnejšie pri určovaní antimikrónnej aktivity ako MIC, pretože sa určujú po 8-hodinovej submerznej kultivácii, t.j. v priebehu exponenciálnej fázy rastu. Podobne ako popísali

Tabuľka I

Antibakteriálna účinnosť bisamóniových solí na *S. Typhimurium* DT104

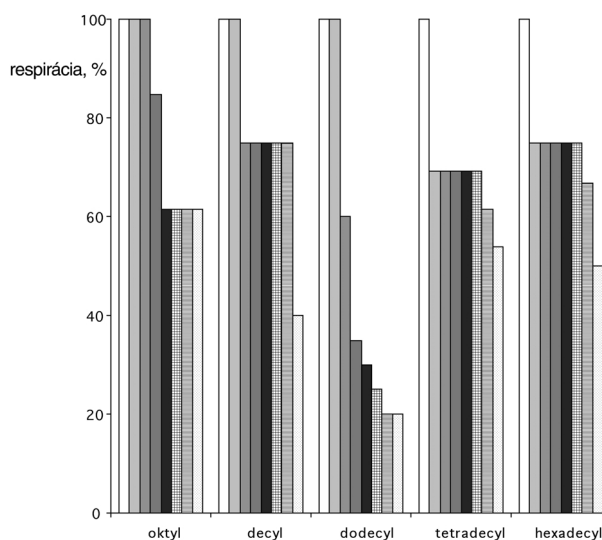
Číslo	Alkyl	Antibakteriálna účinnosť [μ g.ml ⁻¹]	
		MIC	ED50
1	oktyl	> 400	–
2	decyl	12,5–25	20,323
3	dodecyl	3,125–6,25	2,113
4	tetradecyl	6,25–12,5	8,851
5	hexadecyl	50–100	45,186

Majtán a Majtánová¹¹ pri hodnotení antimikrónnej aktivity BQAS dvoch homologických radov: A – bis[2-(alkyldimetylamónio)etyl]-glutarát-dibromidov a B – bis[2-(alkyldimetyldiamónio)etyl]-alkandioát-dibromidov na *Enterobacter cloacae* aj v aktivite voči testovanému kmeňu *S. Typhimurium* DT104 boli zo študovaných zlúčenín najúčinnejšie látky substituované decylom a dodecylom. Získané výsledky potvrdzujú skutočnosť známu z rozsiahleho výskumu QAS, že pre ich antimikrónnu účinnosť je rozhodujúca popri kladne nabitých „hlavách“ molekuly s kvartérnym dusíkovým atómom najmä dĺžka alkylového reťazca. Tá má rozhodujúci vplyv na hydrofilno-lipofilnú rovnováhu molekuly. Podľa súčasných predstáv o spôsobe interakcie molekúl QAS s miestom ich účinku – cytoplazmovou membránou, dĺžka hydrofóbneho „chvostu“ molekuly rozhoduje o vzniku, resp. vyplnení prázdneho priestoru vo vnútri fosfolipidovej dvojvrstvy membrány a o stupni jej poškodenia. To vysvetľuje aj vyššiu účinnosť bisamóniových solí v porovnaní s monoamóniovými.

BQAS v dôsledku svojej membránovej aktivity zasahujú aj do metabolizmu bakteriálnych buniek. Ovplyvňujú procesy energiu vyžadujúce bunkové dýchanie – syntézu nukleových kyselín a proteínov, ako aj procesy energiu produkujúce. Syntetické médium Staples je vhodné na sledovanie inkorporácie [14 C]adenínu a [14 C]leucínu. Bunky testovaného kmeňa *S. Typhimurium* DT104 boli v exponenci-

álnej fáze rastu. Účinok študovaných látok je vyjadrený hodnotami IC_{50} (koncentrácia zlúčeniny v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ potrebná na zníženie rýchlosti inkorporácie sledovaných prekursorov o 50 %). Výhodnejší parameter pre vyjadrenie účinnosti predstavujú R hodnoty (pomer IC_{50} adenínu a IC_{50} leucínu). Hodnoty IC_{50} ako aj R hodnoty študovaného homologického radu BQAS sú uvedené v tab. II. Študované BQAS prejavili výraznejšiu inhibíciu syntézy nukleových kyselín v porovnaní s proteosyntézou, čo vyjadrujú hodnoty R . Táto hodnota bola u všetkých študovaných zlúčenín nižšia ako 1, čo je typické pre biologicky aktívne látky zasahujúce do energetického metabolizmu buniek^{19–21}. Aj v prípade účinku študovaných BQAS na rýchlosť inhibície inkorporácie rádioaktívnych prekursorov sa prejavil „cut-off“ efekt. Najúčinnějšíe zlúčeniny boli látky substituované decylom a dodecylom. Proteosyntéza bola menej citlivá oproti syntéze nukleových kyselín. Zistili sme, že podobne ako na rast baktérií aj na syntézu makromolekúl mala vplyv dĺžka alkylového reťazca, čím sa potvrdili závery predchádzajúceho výskumu²², že krátkoreťazcové analógy nepôsobia na membránu baktérií a neinhibujú metabolické procesy.

Účinok BQAS na endogénnu respiráciu buniek *S. Typhimurium* DT104 je znázornený na obr. 1. Bunky testovaného kmeňa z exponenciálnej fázy rastu mali pomerne vy-



Obr. 1. Účinok N,N' -bis[2-(alkyldimetylamonio)etyl]amidov kyseliny L-vínnej na endogénnu respiráciu *S. Typhimurium* DT104

□ 0 □ 1,56 □ 3,12 □ 6,25 ■ 12,5 ■ 25 ■ 50 ■ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

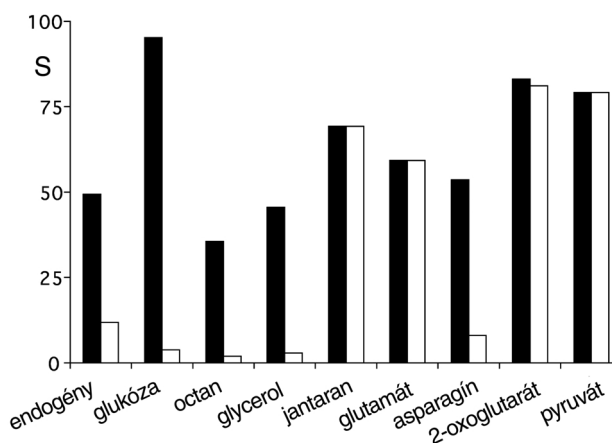
Tabuľka II

Účinok študovaných bisamóniových solí na inkorporáciu ^{14}C -prekursorov do buniek *S. Typhimurium* DT104

Číslo	Alkyl	IC_{50} , [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]		R^a
		$[^{14}\text{C}]\text{adenín}$	$[^{14}\text{C}]\text{leucín}$	
1	oktyl	473,94	1706,8	0,28
2	decyl	22,5	46,4	0,485
3	dodecyl	8,67	10,44	0,830
4	tetradecyl	43,97	55,95	0,786
5	hexadecyl	176,9	219,8	0,800

^a $R = IC_{50}$ adenín/ IC_{50} leucín

sokú endogénnu respiráciu. V študovanom homologickom rade zlúčenín sa ukázala závislosť inhibície endogénnej respirácie od ich zvyšujúcej sa koncentrácie, pričom zlúčeniny substituované tetradecylom a hexadecylom už v koncentrácii $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ potlačili dýchanie buniek na 69,2 %, resp. 75 %. Najúčinnějšía zlúčenina v inhibícii endogénnej respirácie bol zlúčenina substituovaná dodecylom, ktorá už v koncentrácii $3,125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ potlačila dýchanie na 60 %. Majtánová a Majtán¹⁰ pri sledovaní vplyvu BQAS typu bis[2-(alkyldimetyldiamónio)etyl]-glutarát-dibromidov na endogénnu respiráciu *S. Typhimurium* tiež popísali závislosť účinku od koncentrácie a dĺžky reťazca alkylu. Zdá sa, že inhibícia respirácie však závisí na veľkosti celej molekuly. Ak bočný reťazec zlúčeniny je adekvátne dlhý, môže vytvárať veľké medzery vo fosfolipidovej dvojvrstve membrán, a tak redukovať jej normálnu funkciu²³.



Obr. 2. Účinok látky č. 3 viz tab. II ($R = \text{dodecyl}$, $c = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na respiráciu buniek *S. Typhimurium* DT104 v prítomnosti roztokov (0,2 M) rôznych substrátov v TRIS-tlmiavom roztoku (pH 7,4), $S = \text{spotreba } \text{O}_2 \text{ (nmol } \text{O}_2 \text{ min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ sušiny)}$

■ bez inhibitora □ s inhibitorom

Účinok najúčinnějšíe zlúčeniny ($R = \text{dodecyl}$) na exogénnu respiráciu *S. Typhimurium* DT104 je znázornený na obr. 2. Citlivosť exogénnej respirácie sa aktivitu tejto zlúčeniny závisela aj od substrátu. Všetky použité substráty boli buď intermediáty Krebsovho cyklu alebo do neho vstupujú po predchádzajúcej degradácii. V tomto prípade aktívne zlúčeniny môžu znižovať respiráciu nielen degradáciou substrátu alebo vstupovaním do dýchacieho reťazca, ale aj ovplyvňovaním transportu substrátu do bunky. Ako vyplýva z obr. 2,

najvyššia inhibícia respirácie testovaného kmeňa *S. Typhimurium* DT104 sa zistila v prítomnosti týchto exogénnych zdrojov uhlíku: glukózy, octanu, glycerolu a asparagínu, t.j. substrátov, ktoré nie sú priamo intermediáty Krebsovho cyklu. V prítomnosti substrátov glukózy, glycerolu a asparagínu bola tiež zistená najvyššia inhibícia respirácie *S. Typhimurium* po účinku zlúčeniny substituovanej hexadecylom z homologického radu BQAS bis[2-(alkyldimetyldiamónio)etyl]-glutarát-dibromidov¹⁰.

Študované BQAS potlačili rast *S. Typhimurium* DT104 pravdepodobne zásahom do energiu požadujúcich a energiu poskytujúcich procesov bakteriálnych buniek ako dôsledok ich zásahu do integrity biologických membrán.

LITERATÚRA

- Threlfall E. J., Frost A. J., Ward L. R., Rowe B.: *Vet. Rec.* 134, 577 (1994).
- Almuth L., Prager R., Streckel W., Rabsch W., Gericke B., Seltmann G., Helmuth R., Tschäpe H.: *Robert Koch Inst. Info.* 1, 10 (1997).
- Besser T. E., Gray C. C., Gray J. M., Hancock D. D., Rice D., Pritchett L. C., Erickson E. D.: *Vet. Rec.* 140, 75 (1997).
- Poppe C., McFadden K. A., Demczuk W. H.: *Int. J. Food Microbiol.* 30, 325 (1996).
- Rubino S., Muresu E., Solinas M., Sanotan M., Paglietti B., Azara A., Schiaffino A., Santona A., Maida A., Cappuccinelli P.: *Epidemiol. Infect.* 120, 215 (1998).
- Hribňáková M.: *Zprávy CEM*, str. 269. Praha 1998.
- Prager R., Liesegang A., Rabsch W., Gericke B., Thiel W., Voight W., Helmuth R., Ward L., Tschäpe H.: *Zentralbl. Bl. Bakteriol.* 289, 399 (1999).
- Majtánová L., Majtán V.: *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 51, 8 (2002).
- Mlynarčík D., Denier S. P., Hugo W. B.: *Microbios* 30, 27 (1981).
- Majtán V., Majtánová L.: *Microbios* 87, 89 (1996).
- Majtán V., Majtánová L.: *Biologia* 55, 627 (2000).
- Sýkora P., Čepčíková V., Foltýnová Z., Horniak L., Ebinger L.: *Folia Microbiol. (Prague)* 36, 240 (1991).
- Staples S. J., Asher S. E., Giannella R. A.: *J. Biol. Chem.* 255, 4712 (1980).
- Imam T., Devínsky F., Lacko I., Mlynarčík D., Krasnec L.: *Pharmazie* 38, 308 (1983).
- Mlynarčík D., Lacko I., Devínsky F.: *Experientia* 35, 1044 (1979).
- Devínsky F., Masárová L., Lacko I., Mlynarčík D.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 49, 2819 (1984).
- Devínsky F., Lacko I., Bittererová F., Mlynarčík D.: *Chem. Pap.* 41, 803 (1987).
- Majtán V., Majtánová L., Mlynarčík D.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 45, 198 (1995).
- Majtán V., Drobnica L.: *Folia Microbiol.* 27, 43 (1982).
- Miko M., Devínsky F.: *Drug Metab. Drug Interact.* 9, 333 (1991).
- Miko M., Devínsky F.: *Drug Metab. Drug Interact.* 10, 237 (1992).
- Kopecká-Leitmanová A., Devínsky F., Lacko I., Mlynarčík D.: *Drug Metab. Drug Interact.* 7, 29 (1989).
- Balgavý P., Devínsky F.: *Adv. Colloid Interface Sci.* 66, 23 (1996).

T. Majtán¹, Lubica Majtánová², and Dušan Mlynarčík³ (¹*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Dúbravská cesta 21*, ²*Institute of Preventive and Clinical Medicine, Slovak Academy of Sciences, Limbová 14*, ³*Department of Cell and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Kalinčiaková 8, Bratislava, Slovak Republic*): **The Effect of Bisquaternary Ammonium Salts on the Growth and Metabolic Processes of *Salmonella enterica* Subspecies *Enterica* Serovar *Typhimurium* DT104**

The effect of five bisquaternary ammonium salts of a homologous series of *N,N'*-bis[2-(alkyldimethylammonio)ethyl]-L-tartaramide on the growth, synthesis of nucleic acids and proteins, and respiration of *Salmonella typhimurium* DT104 was studied. The tested strain was resistant against ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides and tetracyclin. The highest antibacterial activity was found for dodecyl (MIC 3.125–6.25 µg.ml⁻¹) and tetradecyl compounds (MIC 6.25–12.5 µg.ml⁻¹). The studied compounds showed a considerable inhibition of nucleic acid synthesis as expressed by percentage of inhibition of [¹⁴C]adenine incorporation compared with proteosynthesis. In the antibacterial activity as well as in influencing the incorporation rate of radioactive precursors, the well-known cut-off effect was shown. A pronounced inhibition of endogenous respiration of tested *S. typhimurium* cells was shown by the tetradecyl and hexadecyl compounds at the 1.56 µg.ml⁻¹ concentration (to 69.2 % and 75 %, respectively), the highest by the dodecyl compound (60 % of the control at 3.125 µg.ml⁻¹). The latter compound inhibited also exogenous respiration, most in the presence of glucose, acetate, glycerol and aspartate as the sources of carbon.

STUDIUM STABILITY *p*-AMINOFENOLU JAKO DOMINANTNÍHO ROZKLADNÉHO PRODUKTU PARACETAMOLU

LENKA HANYŠOVÁ, PETR KASTNER
a JIŘÍ KLIMEŠ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Hanysova@faf.cuni.cz

Došlo 5.9.03, přijato 26.9.03.

Klíčová slova: HPLC, *p*-aminofenol, fotostabilita, derivatizace

Úvod

Paracetamol (*N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid) je hodnotné nesteroidní léčivo světově užívané při bolestech hlavy, zad a při redukci horečky u bakteriálních či virových infekcí¹⁻³.

V současné době jsou kladeny vysoké požadavky na stabilitu léčiv, se kterou úzce souvisí i čistota. Mezi nejčastější rozkladné reakce v tekutých lékových formách patří hydrolytické štěpení esterové a amidické vazby. Ze stabilitních studií paracetamolu je patrné, že paracetamol v roztoku podléhá alkalické i kyselé hydrolyze vazby N-C, viz. schéma 1 (cit.⁴⁻⁶). Koshy a Lach zkoumali vliv různého pH na hydrolytický rozklad paracetamolu v roztoku, který byl temperován na 70 °C po dobu 20, 40, 60, 80 a 90 hodin. Při pH 2 a 9 byl roztok temperován na 80 a 90 °C a spektrofotometrické stanovení bylo ovlivněno změnou zbarvení díky oxidačním produktům *p*-aminofenolu⁷. Čistá substance paracetamolu je poměrně stabilní i při teplotě 45 °C, ale přítomnost *p*-aminofenolu i v malých koncentracích způsobuje charakteristické barevné změny substance od růžové přes hnědou až na černošedou⁸⁻¹⁰.

p-Aminofenoly se totiž dlouhodobým vystavením na vzduchu a světle ochotně oxidují na chinony, chinoniminy a semi-chinoniminy^{8,9}.

Stabilitou *p*-aminofenolu v 50% methanolu a v 0,5% kyselině octové po dobu 24 a 48 hodin se zabýval Bloomfield, vzorky byly skladovány za laboratorních podmínek z dosahu přímého slunečního světla¹¹.

V této práci byl sledován vliv teploty, světla a UV záření na stabilitu *p*-aminofenolu.

Ačkoli je paracetamol látkou široce užívanou, jejíž používání je vžito i v mnoha volně prodejných přípravcích, při předávkování či enzymatické indukci aktivity hepatálního cytochromu P450 může docházet ke kumulaci toxických metabolitů paracetamolu, které mohou způsobit velmi

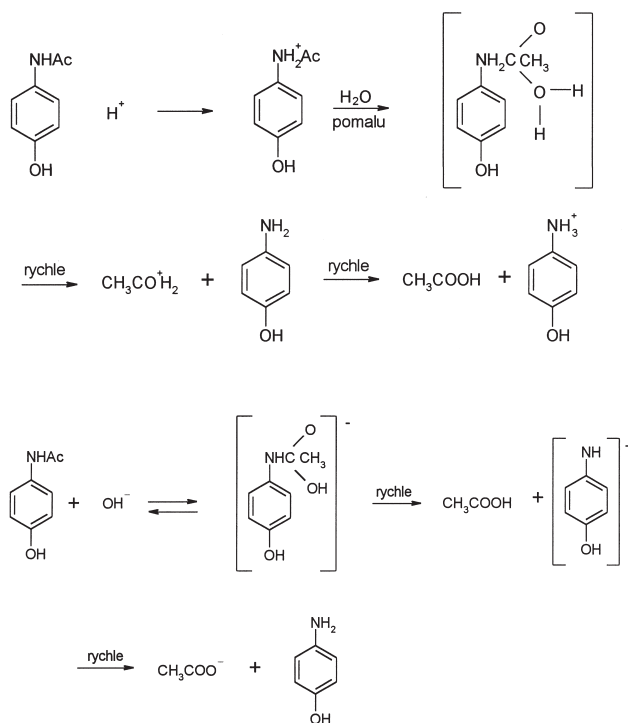


Schéma 1. Mechanismus kyselé a alkalické hydrolyzy paracetamolu

vážné poškození jater. Jeho toxicitou, metabolismem a stabilitou se zabývá řada prací¹²⁻¹⁹. Hlavní příčinou jeho toxicity je jeho metabolit a zároveň jeho hlavní rozkladný produkt, *p*-aminofenol.

Jeho toxicita je běžnou příčinou akutního jaterního selhání a to vede k hlubokému nabourání fyziologických funkcí a je charakterizováno vasoplegií, encefalopatií a koagulopatií. Je běžně komplikováno renálním selháním, mozkovým edémem a multiorgánovou disfunkcí. Mortalita je vysoká a pacienti často vyžadují služby víceoborových specialistů na intenzivní péči a transplantaci jater²⁰.

S ohledem na riziko spojené s jeho přítomností v léčivých přípravcích byla zaměřena pozornost na jeho stanovení ve velmi nízkých koncentracích. K tomu byla vypracována vhodná metodika HPLC za použití derivatizace volné aminoskupiny.

Experimentální část

Chemikálie

p-Aminofenol, dansylchlorid, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl chlorid, *o*-ftaldialdehyd, 2-sulfanylethanol (Sigma Aldrich), kyselina fosforečná, kyselina boritá, hydroxid sodný, ethanol p. a., acetonitril p. a., methanol p. a., kyselina octová p. a. (Lachema a. s.), destilovaná voda.

Separace *p*-aminofenolu

K separaci *p*-aminofenolu byly použity kolony Symmetry:

1. s reverzní fází C18, 150 × 4,6 mm, 5 μm a jako mobilní fáze byla použita methanol/0,6 % CH₃COOH (5–15 : 95–85, v/v), průtoková rychlost byla 1,2 ml.min⁻¹.
2. s reverzní fází C8, 250 × 4,6 mm, 5 μm a v tomto případě byla zkoušena mobilní fáze methanol/0,02 mol.l⁻¹ H₃PO₄ (30 : 70, v/v) a průtoková rychlost byla 0,8 ml.min⁻¹. Dále byla zkoušena mobilní fáze acetonitril/voda (80 : 20, v/v), průtoková rychlost byla 0,9 ml.min⁻¹.

Chromatografické záznamy byly měřeny při vlnových délkách 282 nm – absorpční maximum *p*-aminofenolu a 243 nm – absorpční maximum oxidačního produktu *p*-aminofenolu. Vzorky byly nastříkány na kolonu v objemech 10 μl. Separace probíhala při teplotě 25 °C.

Při zjišťování fotostability *p*-aminofenolu v roztoku byla použita UV lampa (Camag, Switzerland) s nastavenou vlnovou délkou 254 nm, intenzita záření byla 1200 μW.cm⁻².

Roztok *p*-aminofenolu byl v křemenné baňce.

Hodnocení *p*-aminofenolu

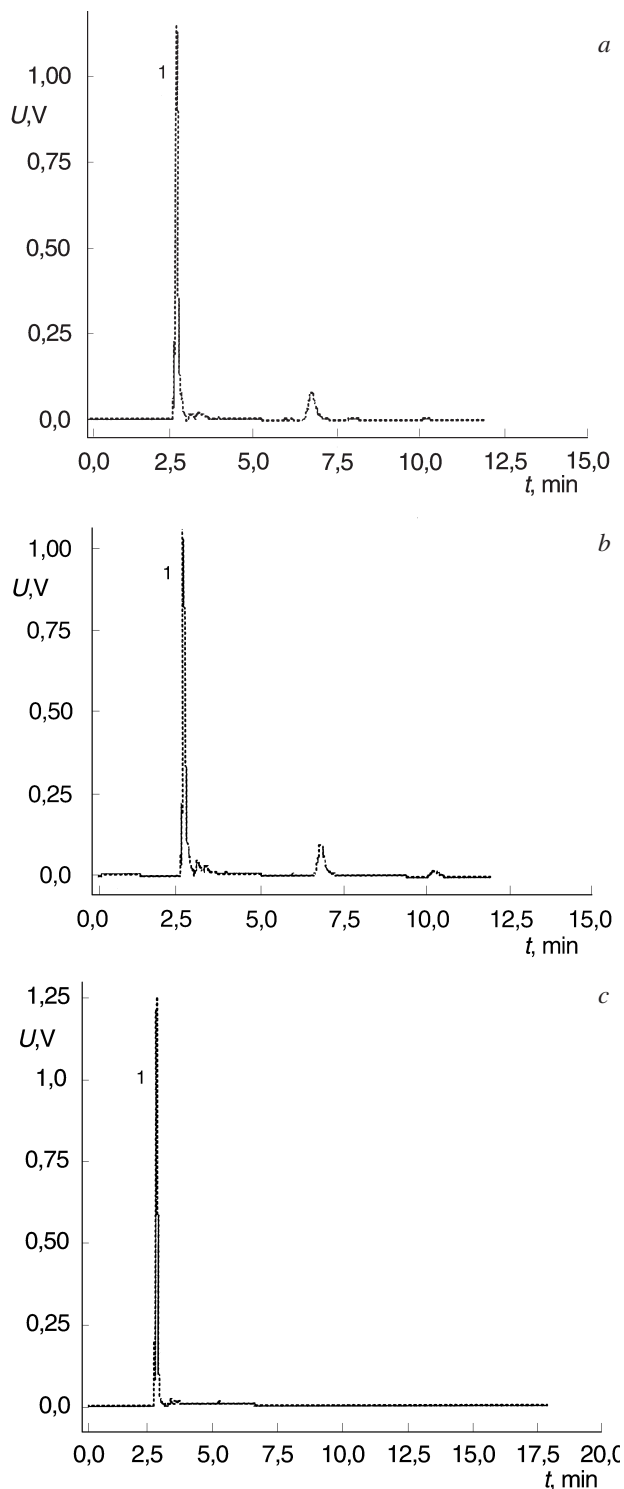
K hodnocení derivátu *p*-aminofenolu byla použita kolona Separon SGX s reverzní fází C 18, 250 × 4,6 mm, 7 μm a jako mobilní fáze byla použita methanol/voda (60 : 40, v/v) s upravenou hodnotou pH na 7,40 pomocí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH. Průtoková rychlost byla 0,9 ml.min⁻¹.

Chromatografické záznamy derivátu byly měřeny fluorescenčním detektorem při excitačním maximu 333 nm a emisní maximum bylo 450 nm. Vzorky byly nastříkány v objemech 20 μl. Separace probíhala při teplotě 20 °C.

Použité přístroje byly součástí sestavy HPLC firmy SHIMADZU: System kontroler SCL-10A_{VP}, UV-VIS detektor SPD-10A_{VP}, fluorescenční detektor RF-10AXL, pumpa LC-10AD_{VP}, low pressure gradient flow control valve FCV-10AL_{VP}, on-line degasser DGU-14A, pec pro kolonu CTO-10AS_{VP}, PC Pentium III s chromatografickým softwarem Class-VP.

Výsledky a diskuse

Při zjišťování vhodných chromatografických podmínek pro hodnocení *p*-aminofenolu jsme použili delší kolonu 250 mm s reverzní fází C8, přičemž mobilní fáze obsahovala menší podíl organické složky, abychom docílili prodloužení retenčních faktorů alespoň do 3. minuty. Při použití mobilní fáze acetonitril/voda (80 : 20, v/v) byl retenční čas *p*-aminofenolu 1,9 min a byla horší reprodukovatelnost při kvantifikaci *p*-aminofenolu než při použití mobilní fáze methanol/0,02 mol.l⁻¹ H₃PO₄ (30 : 70, v/v). Pro ověření selektivity této metody pro separaci *p*-aminofenolu a jeho oxidačních produktů bylo provedeno měření i při vlnové délce 243 nm, což bylo absorpční maximum oxidačních produktů *p*-aminofenolu. Tyto rozkladné produkty měly odlišné retenční charakteristiky než *p*-aminofenol.



Obr. 1. Chromatografický záznam analýzy *p*-aminofenolu v roztoku 50% methanolu; a) po 48 h při laboratorní teplotě za nepřístupu světla, b) po 48 h působení UV záření, c) po 48 h při 7 °C. Podmínky analýzy: kolona s reverzní fází C8, 250 × 4,6 mm, 5 μm a jako mobilní fáze byla použita směs methanol/0,02 mol.l⁻¹ H₃PO₄ (30 : 70, v/v) a průtoková rychlost byla 0,8 ml.min⁻¹, detekce při 282 nm. Pík č. 1 – *p*-aminofenol

Bylo provedeno hodnocení HPLC obsahu *p*-aminofenolu v roztoku 50% methanolu při různém skladování, viz obr. 1a, b, c.

Obsah *p*-aminofenolu byl zjišťován metodou vnějšího standardu, který byl čerstvě připraven, jen v případě hodnocení fotostability působením UV záření o vlnové délce 254 nm byl použit jako vnější standard roztok *p*-aminofenolu

Tabulka I
Úbytek *p*-aminofenolu v methanolickém roztoku (0,2 mg.ml⁻¹) při 7 °C, bez přístupu světla

Čas [h]	<i>c</i> [μg.ml ⁻¹] ^a	Obsah <i>p</i> -aminofenolu ^b [%]
0	199,98	99,99
1	199,76	99,87
4,5	199,29	99,64
24	195,12	97,56
31	193,55	96,78
46	191,07	95,54
75	185,95	92,98
96	181,68	90,84
125	173,22	86,61
148	166,58	83,29
168	157,66	78,83
199	147,84	73,92
219	139,16	69,58
293	135,78	67,89

^a Aktuální koncentrace, ^b obsah v % vzhledem k vnějšímu standardu

Tabulka II
Úbytek *p*-aminofenolu v methanolickém roztoku (0,2 mg.ml⁻¹) ve tmě při 20 °C

Čas [h]	<i>c</i> [μg.ml ⁻¹] ^a	Obsah <i>p</i> -aminofenolu ^b [%]
0	198,89	99,45
2,5	197,52	98,75
3	197,01	98,50
7	193,9	96,59
15	189,76	94,87
21	185,82	92,91
25	183,15	91,57
47	174,54	87,27
57	170,37	85,18
76	166,10	83,05
110	163,90	81,95
125,5	155,30	77,65
148	143,66	71,83
196	130,58	65,29
220	116,50	58,25

^a Aktuální koncentrace, ^b obsah v % vzhledem k vnějšímu standardu

uchovávaný při 7 °C. V případě, že byl roztok uchovávaný při 7 °C v lednici, během dvanácti dnů byl sledován úbytek *p*-aminofenolu až na 67,89 %, viz tabulka I.

Dále byl roztok ponechán bez světla při laboratorní teplotě a byl sledován úbytek *p*-aminofenolu po dobu deseti dnů až na 58,25 %, viz tabulka II. Fotolytický rozklad byl sledován po dobu 48 hod, viz tabulka III.

Tabulka III
Úbytek *p*-aminofenolu v methanolickém roztoku (0,2 mg.ml⁻¹) působením UV záření

Čas [h]	<i>c</i> [μg.ml ⁻¹] ^a	Obsah <i>p</i> -aminofenolu ^b [%]
0	199,99	99,99
7	192,04	96,02
22,5	179,84	89,92
24	179,55	89,77
31	174,06	87,03
32	170,92	85,46
34	169,39	84,69
48	158,34	79,17

^a Aktuální koncentrace, ^b obsah v % vzhledem k vnějšímu standardu

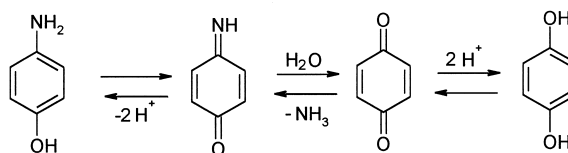
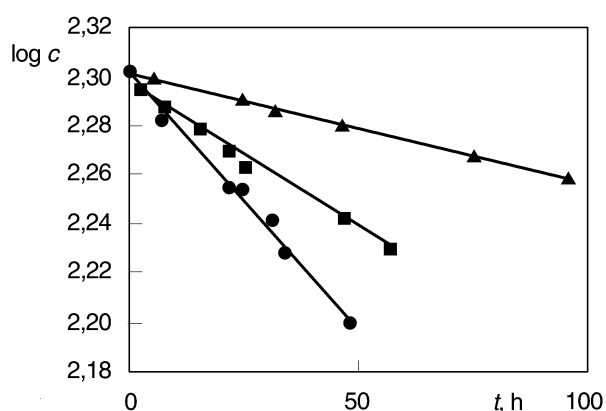


Schéma 2. Mechanismus oxidace *p*-aminofenolu ve vodných roztocích

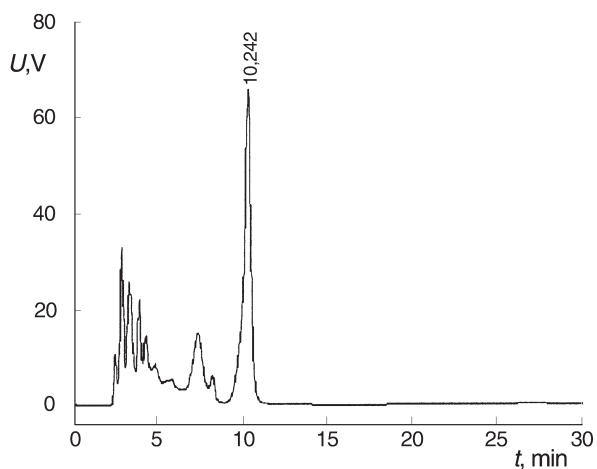
Nestabilitu *p*-aminofenolu v roztoku zachycuje reakční schéma 2 (cit.²¹).

Na základě zjištěných hodnot koncentrace nerozloženého *p*-aminofenolu v čase odběru vzorku byly vypočteny kinetické charakteristiky oxidačního procesu v tom časovém úseku, kdy byly závislosti hodnot log *c* na čase lineární. Tento časový úsek vyjadřuje graf na obr. 2.

Pro zvýšení citlivosti byla zkoušena derivatizace *p*-aminofenolu. K derivatizaci byla použita derivatizační činidla – dansylchlorid, 9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chlorid a *o*-ftaldialdehyd. V prvních dvou případech byl *p*-aminofenol v acetonitrilu s nadbytkem činidla zahříván pod zpětným chladičem 30, 40 a 60 min na teplotu 60 °C. Po odfoukání acetonitrilu pod dusíkem a po rozpuštění zbytku v mobilní fázi byly vzorky nastříkované na kolonu s reverzní fází C 18, kterou protékala mobilní fáze methanol/ 0,05 mol.l⁻¹ H₃PO₄ (50 : 50, v/v) rychlostí 0,8 ml.min⁻¹. Měření probíhalo při vlnové délce 220 nm. Z hlediska separace byly tyto chromatografické podmínky optimální, ale nepodařilo se optimalizovat podmínky derivatizace tak, aby reakce probíhala kvantitativně a reprodukovatelně. Proto bylo použito k derivatizaci další činidlo, *o*-ftaldialdehyd.



Obr. 2. Závislost logaritmu koncentrace *p*-aminofenolu v methanickém roztoku na čase; standard v lednici – rychlostní konstanta $k = 9,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, vzorek ve tmě $k = 2,745 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, vzorek pod UV lampou $k = 4,769 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
 ● UV lampa, ■ bez přístupu světla a při laboratorní teplotě, ▲ 7 °C, bez přístupu světla



Obr. 3. Chromatografický záznam analýzy derivátu *p*-aminofenolu ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Podmínky analýzy: kolona Separon SGX s reverzní fází C 18, $250 \times 4,6 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$ a jako mobilní fáze byla použita methanol/voda ($60 : 40, \text{ v/v}$) s upravenou hodnotou pH na 7,40 pomocí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaOH}$. Průtoková rychlost byla $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Vzorky byly měřeny při excitačním maximu 333 nm a emisní maximum bylo 450 nm. Pík s retenčním časem 10,24 min vyjadřuje derivát a všechny píky do osmé minuty pocházejí z činidla.

Při přípravě derivatizačního činidla se vycházelo z literatury²². 30 mg *o*-ftaldialdehydu bylo rozpuštěno v 0,5 ml ethanolu a po přidání 20 μl 2-sulfanyethanolu byl obsah doplněn borátovým pufrům o hodnotě pH 8,5 na 5 ml. Tento zásobní roztok byl naředěn borátovým pufrům dvacetkrát.

Vzorky pro analýzu byly připraveny tak, že 0,5 ml roztoku činidla bylo doplněno do 2 ml methanického roztoku

kem *p*-aminofenolu tak, aby výsledné koncentrace *p*-aminofenolu byly 4; 1; 0,5; 0,25; 0,125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Reakce činidla s *p*-aminofenolem probíhala 60 s za intenzivního třepání těsně před nástřikem vzorku na kolonu. Byla zkoušena mobilní fáze methanol : H_2O v různém poměru o hodnotě pH od 3,6 až 7,5. S nárůstem organické složky v mobilní fázi se snižoval retenční čas a při vyšším pH mobilní fáze se také retenční čas posouval k nižším hodnotám, což bylo vzhledem k nízké stabilitě derivátu výhodné. Při hodnotě pH 6,6 byl retenční čas derivátu 33 min a při pH 7,4 už jen 11 min, což se ukázalo jako optimální, protože doba analýzy byla dostatečně krátká a zároveň byl nadbytek derivatizačního činidla dobře separován od produktu derivatizace, viz obr. 3.

Pro výpočet detekčního limitu byla sestrojena kalibrační křivka potvrzující linearitu v koncentračním rozmezí $0,125\text{--}10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s korelačním koeficientem $R = 0,9998$. Detekční limit pro stanovení *p*-aminofenolu byl $1,00554 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Práce byla vypracována za podpory výzkumného záměru MSM 111600001.

LITERATURA

- Mohamed F. A., Abdullah M. A., Shammatt S. M.: *Talanta* 44, 61 (1997).
- Reynolds J. (Ed.): *Martindale 31. Royal Pharmaceutical Society*. London 1996.
- Rodenas V., García M. S.: *Talanta* 52, 517 (2000).
- Thompson D. C., Perera K., London R.: *Drug Metab. Dispos.* 24, 866 (1996).
- Noble M., Clough G. F.: *Hepatology Nutrition* 4, 58 (2001).
- Song H., Chen T. S.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 34 (2001).
- Yoshida R., Oikawa S., Ogawa Y., Miyakoshi Y.: *Mutat. Res.* 415, 139 (1998).
- Hahn J. H., Quinn J. F (Monsanto Chemical Co.): U. S. 3,042,719 (Cl. 260–562).
- Carmel G. W., Angelis J. (Warner-Lambert Pharmaceutical Co.): U. S. 2,998,450 (Cl. 260–562).
- Florey K. (Ed): *Analytical profiles of drug substances 3*. Academic Press, New York 1974.
- Bloomfield M. S.: *Talanta* 58, 1301 (2002).
- Weeks B. S., Gamache P., Klein N.W., Hinson J.A., Bruno M., Khairallah E.: *Teratog., Carcinog., Mutagen.* 10, 361 (1990).
- Ray S. D., Kamendulis L. M., Gurule M. W., Yorkin R. D., Corcoran G. B.: *FASEB J.* 7, 453 (1993).
- Ellis E. F., Dodson L. Y., Police R. J.: *J. Neurosurg.* 75, 774 (1991).
- Dimova S., Stoytchev T.: *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 19, 311 (1994).
- Bonkovsky H. L., Kane R. E., Jones D. P., Galinsky R. E., Banner B.: *Hepatology* 19,1141 (1994).

17. James R. C., Harbison R. D., Roberts S. M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 118, 159 (1993).
18. Prasad J. S., Chen N. Q., Liu Y. X., Goon D. J., Holtzman J. L.: *Biochem. Pharmacol.* 40, 1989 (1990).
19. Shizuka Haruo: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 42, 57 (1969).
20. Shizuka Haruo: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 42, 52 (1969).
21. J. Zhang, S. Yao, L. Nie, W. Wei: *J. Anal. Sci.* 16, 87 (2000).
22. www.webprostor.cz/veda_a_vyzkum/HPLC/AMK/OPA_other.htm, staženo.

L. Hanyšová, P. Kastner, and J. Klimeš (*Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of*

Pharmacy, Charles University, Hradec Králové): **Study of Stability of 4-Aminophenol as Dominant Decomposition Product of Paracetamol**

An HPLC method for determination of very low concentrations of 4-aminophenol was elaborated, and the kinetics of its decomposition at low temperatures and at laboratory temperature in the absence of light or under irradiation at 254 nm were compared. To increase the sensitivity of the method, derivatization of 4-aminophenol with various reagents was tested. Phthalaldehyde proved to be the best; its reaction at laboratory temperature in the presence of 2-sulfanylethanol is very fast. The derivatization conditions were optimized.

RECENZE

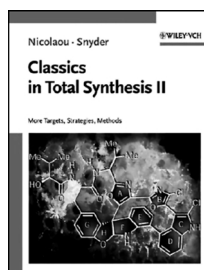
A. Gossauer:
Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Part 86, Monopyrrolic Natural Compounds Including Tetramic Acid Derivatives, (W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby, eds)
 vydaná Springer, Wien jako 1. vydání 2003.
 Stran 222. Cena USD 149; 139,10 €. ISBN 3-211-83889-9.

Kniha se soustřeďuje na přehled informací o přírodních látkách s jedním pyrrolovým jádrem, včetně derivátů 4-hydroxy-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-onu (tetramic acid). Tato klasická série je publikována nakladatelstvím Springer od roku 1938. Její součástí zahrnují příspěvky z nejrůznějších oblastí chemie přírodních látek, ať již se týká jejich původu, výskytu, chemie, syntézy, biochemie, funkce či použití různých druhů přírodních látek počínaje malými molekulami až k biopolymerům. Každá tato součást je napsána uznávanou autoritou v oboru a přináší souborný a současný přehled příslušné zvolené oblasti.

Autor, Albert Gossauer, není v literatuře nováčkem, je autorem rozebrané knihy *Die Chemie der Pyrrole* (1974) a soudobé *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle: Eine Einführung in die organische Chemie* (2003). V této své poslední přehledné práci ze známé série *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* o přírodních látkách s jedním pyrrolovým jádrem uvádí kritický rozbor 890 literárních citací a to až do roku 2001. Práce je roztržena na kapitoly podle biologického původu pyrrolových sloučenin na látky původem z obratlovců, bezobratlých, rostlin, hub a bakterií. U řady sloučenin se zabývá nejpravděpodobnějším metabolismem vzniku a přeměn dané látky. V řadě případů poskytuje i syntetické podrobnosti o popsaných syntézách. Přehledně podává i biogenetické zdroje pro jednotlivé pyrrolové deriváty. Typografická a grafická stránka knihy jsou na dobré úrovni, autor se dobře vypořádává se stereochemií. Slabší je grafická strana pokusu o trojrozměrnou reprezentaci molekuly na jediném obrázku uvedeném v knize. Literární citace uvádějí názvy prací, takže mohou být vcelku dobrým vodítkem pro hlubší studium literatury. Kniha je vybavena jmenným a předmětovým rejstříkem.

Příručka poskytne mimořádně užitečné informace jak organickému chemikovi, biologovi, technologovi, farmakologovi, ale i farmaceutům a lékařům, je významným zdrojem informací a citací, ale může být použita i někým, kdo není expertem v oboru, ale chce se orientovat v dané oblasti.

Pavel Drašar



K. C. Nicolaou, S. A. Snyder:
Classics in Total Synthesis II, More Targets, Strategies, Methods
 vydaná Wiley-VCH, Weinheim jako 1. vydání 2003.

Stran 639. Cena 69.- EUR / 102.- SFR. brožovaná vazba, ISBN 3-527-30684-6; 99.- EUR / 146.- SFR pevná vazba, ISBN 3-527-30685-4.

Klasikové v totální syntéze, díl druhý, s podtitulem „více cílů, strategií a metod“, je dlouho očekávaným následovníkem svého prvního dílu vzniklého z pera dvojice Nicolaou a Sorensen r. 1966. V tomto vítaném novém dílu pánové K. C. Nicolaou a Scott A. Snyder diskutují velmi podrobně nejvýznamnější události v oblasti totální syntézy přírodních látek od r. 1990 do začátku 21. století, kam patří jevy a události jako domino reakce, kaskádové sekvence, biomimetické strategie, asymetrická katalýza. Tyto oblasti jsou systematicky vysvětlovány na příkladu zvolené syntézy. Práce se věnuje převratným novinkám v syntetických technologiích i diskusi stran jejich mechanismu a možností využití. Nové reakce, jako například olefinová metathese, jsou uvedeny téměř ve formátu mini-review. Velké množství odkazů na literaturu uváděných u každé z 22 kapitol zvlášť jsou možným zdrojem dalšího poučení čtenáře.

Studenti, učitelé, ale i výzkumníci v oblasti syntetické a medicínské chemie najdou v této knize nepostradatelného společníka a mnoho doplňujícího materiálu k prvnímu dílu Klasiků (*Classics in Total Synthesis*).

Z obsahu vyjmenujme heslovitě Isochrysohermidin (Boger), Swinholide A (Paterson), Dynemicin A (Myers), Ecteinascidin 743 (Corey), Resiniferatoxin (Wender), Epothilone A (Nicolaou), Manzamine A (Winkler/Martin), Vancomycin (Nicolaou/Evans), Everninomicin 13,384-1 (Nicolaou), Bisorbicillinoids (Nicolaou), Aspidophytine (Corey), CP-Molecules (Nicolaou), Colombiasin A (Nicolaou), Quinine (Stork), Longithorone A (Shair), FR-182877 (Sorensen), Vinblastine (Fukuyama), Quarigemine C a Psycholeine (Overman), Diazonamide A (Nicolaou), Plicamine (Ley).

Tak jak učinily všechny atributy prvního dílu Klasiků tuto knihu jedinečnou a populární jako učební pomůcka, toto její „pokračování“ přináší nejnovější „finesy“ pokroku v organické chemii a syntéze jako překrásné dílo popisující některé práce vynikajících organických chemiků současnosti.

Kvalitní typografie, která barevně zdůrazňuje vybraný materiál, fotografie klasiků oboru, homogenní kresba strukturních vzorců se správně vyznačenou stereochemií (IUPAC) činí z knihy opravdu cennou a uživatelsky příjemnou pomůcku.

Pavel Drašar

OBSAH

ÚVODNÍK	115
REFERÁTY	
Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého	116
Z. Kupková a L. Beneš	
Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii	123
M. Mihaljevič, L. Strnad a O. Šebek	
CHEMICKÝ PRŮMYSL	
Možnosti rozšíření programu pro simulaci chemických procesů	131
J. Poživil a J. Chudoba	
Teoretický výpočet vzniku metánu z komunálního odpadu	137
P. Horbaj	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Krystalizace a skelný přechod kandytů vyrobených z isomaltu	142
I. Šmídová, J. Čopíková, A. Sikora a M. Maryška	
Účinek biskvartérnych amóniových solí na rast a metabolické procesy <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> sérovar <i>Typhimurium</i> DT104	148
T. Majtán, L. Majtánová a D. Mlynarčík	
Studium stability <i>p</i>-aminofenolu jako dominantního rozkladného produktu paracetamolu	152
L. Hanyšová, P. Kastner a J. Klimeš	
RECENZE	157

CONTENTS

EDITORIAL	115
REVIEW ARTICLES	
Chemical Properties, Biological Effects and Methods of Detection of Nitric Oxide	116
Z. Kupková and L. Beneš	
Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in Geochemistry	123
M. Mihaljevič, L. Strnad, and O. Šebek	
CHEMICAL INDUSTRY	
Possibilities of Program Extension for Simulation of Chemical Processes	131
J. Poživil and J. Chudoba	
Theoretical Calculation of Methane Formation from Municipal Waste	137
P. Horbaj	
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Crystallization and Glass Transition of Candies from Isomalt	142
I. Šmídová, J. Čopíková, A. Sikora, and M. Maryška	
The Effect of Bisquaternary Ammonium Salts on the Growth and Metabolic Processes of <i>Salmonella enterica</i> Subspecies <i>Enterica</i> Sero var <i>Typhimurium</i> DT104	148
T. Majtán, L. Majtánová, and D. Mlynarčík	
Study of Stability of 4-Aminophenol as Dominant Decomposition Product of Paracetamol	152
L. Hanyšová, P. Kastner, and J. Klimeš	
BOOK REVIEWS	157

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 98 (2004), čís./no. 3 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 128, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 114
 •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. Berek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hettflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: M. Bláhová, M. Ferles, B. Valter, I. Valterová, Webové stránky: R. Liboska, P. Zámotný • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, J. Churáček, 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 OPŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/ INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: 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 A REPRO: Petr Martin - AGEMA, Lípová 4, 120 00 Praha 2, • Copyright © 2004 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 140 Kč, roční plné předplatné 2004 (12 čísel) 1440 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 720 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 2004 (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.