

**Udržitelný výzkum, vývoj a výuka v oblasti chemie**

Nerovnoměrnost vývoje ve většině oblastí lidské činnosti neustále nastoluje otázku vhodného směru a tempa vývoje a jeho udržitelnosti. V současné době je tato otázka pochopitelně intenzivně diskutována i v chemických kruzích. Z evropské iniciativy vznikla Evropská technologická platforma pro udržitelnou chemii (The European Technology Platform for Sustainable Chemistry), zkráceně nazývaná SusChem - viz <http://www.suschem.org/>. Jejím cílem je při zachování podmínek udržitelného rozvoje naplnění cílů Lisabonské strategie a tedy - mimo jiné - i podpora výzkumných a inovačních aktivit v rámci Evropské unie v oblasti chemie a chemického průmyslu. Zásluhou Svazu chemického průmyslu ČR byla v prosinci 2005 ustavena Česká technologická platforma pro udržitelnou chemii (ČTP SusChem viz <http://www.schp.cz/html/index.php?lng=1&s1=1&s2=6&s3=5>), jejímž úkolem je podpora aktivit a iniciativ organizací působících ve prospěch rozvoje chemie a chemického průmyslu v České republice a s tím spojených vědeckých, výzkumných, technologických a inovačních aktivit. Jako tři nejdůležitější oblasti byly vybrány průmyslová biotechnologie, materiálové technologie a reakční a procesní design. Bez nadsázky lze říci, že všechny tyto oblasti jsou dostatečně akcentovány ve výuce prakticky všech chemicky zaměřených vysokých škol. Pro mne jako člověka s „univerzitním“ myšlením a zaměřením je neobyčejně poučné seznámit se se způsobem práce a stylem uvažování v této oblasti a doufám, že řada zajímavých myšlenek a podnětů, které se objevily na celé řadě workshopů pořádaných ČTP SusChem v oblasti Strategické výzkumné agendy a které mohou být zajímavé i pro celou naši chemickou veřejnost, se objeví na stránkách Chemických listů.

Nad otázkou udržitelnosti rozvoje našeho chemického průmyslu v období globalizace, převahy zahraničního kapitálu v této oblasti a přesunu průmyslových výrobních kapacit na východ, se musí zamyslet povolanější a také to dělají. Na mne zbývá několik poznámek z oblasti udržitelného výzkumu a výuky. V oblasti výzkumu nebezpečí „přehřátí“ zná-

mé z procesů ekonomických v zásadě nehrozí. Mnohem složitější je otázka preference základního a aplikovaného výzkumu. Nedovedu si představit „udržitelný“ aplikovaný výzkum bez jeho zásobování výsledky výzkumu základního. A vůbec se nebojím, že výsledky opravdu kvalitního základního výzkumu nenajdou i praktické uplatnění, i když doba od nového poznatku k jeho uplatnění se pochopitelně může výrazně lišit. Bohužel sázení stromků, z nichž jednou vyroste les, který přinese prospěch všem, není v současném světě orientovaném na rychlý a okamžitý zisk příliš populární. Tím spíše by celá naše vědecko-výzkumná a vysokoškolská základna měla na nutnost tohoto procesu upozorňovat. V materiálech Královské chemické společnosti jsem nedávno našel zajímavou myšlenku: Jedním z nejdůležitějších cílů základního výzkumu je příprava lidí schopných provádět ho na stále vyšší úrovni. Této myšlenky bychom se měli držet i při vysokoškolské výuce a výzkumu, při orientaci zadávaných bakalářských, diplomových i doktorských prací. Příprava kvalitního vědeckého a výzkumného pracovníka může být skutečně z celospolečenského hlediska prospěšnější nežli krátkodobý prospěch získaný tzv. praktickým zaměřením výše zmíněných kvalifikačních prací. Při dnešním stupni rozvoje výrobních sil, kdy několik procent populace dokáže vytvořit všechny materiálové statky potřebné k bezproblémovému chodu společnosti, je spíše otázkou politického rozhodnutí, v jakých „neproduktivních“ oblastech bude většina populace zaměstnána. Finanční prostředky samy o sobě pochopitelně nemohou zajistit ani kvalitní výzkum ani kvalitní výuku. Ale finanční prostředky vhodně investované do těchto oblastí mohou zajistit, aby nejnadanější vrstva populace věnovala své schopnosti vědě a výzkumu raději nežli obchodu, pojišťovnictví a dalším nyní tak populárním „ziskovým“ odvětvím. A jsem přesvědčen, že tato investice by se vrátila rychleji nežli řada pochybných investic nyní tak detailně probíraných ve veřejných médiích.

Jiří Barek

# NANOKOMPOZITY POLYAMIDŮ S VRSTEVNATÝMI SILIKÁTY

RUDOLF PUFFR<sup>a</sup> a JIŘÍ BROŽEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského náměstí 2, 162 06 Praha 6, <sup>b</sup> Ústav polymerů, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28, Praha 6

Jiri.Brozek@vscht.cz

Došlo 24.6.09, přijato 6.8.09.

Klíčová slova: nanokompozity, polyamidy, vrstevnaté silikáty, syntéza, vlastnosti

## Obsah

1. Úvod
2. Polyamidy
3. Vrstevnaté silikáty
4. Příprava nanokompozitů
  - 4.1. Polymerační metody
  - 4.2. Míšení v tavenině
  - 4.3. Metoda z roztoku
5. Vlastnosti nanokompozitů
  - 5.1. Struktura a morfologie
  - 5.2. Mechanické vlastnosti
  - 5.3. Termické vlastnosti
  - 5.4. Bariérové vlastnosti
6. Závěr

## 1. Úvod

V současné době se v řadě vědních disciplín a výrobních technologií objevuje velice často předpona nano. Tím je označována velikost zájmových objektů v rozměrech řádu nanometru. Na této úrovni získávají systémy až neočekávané vlastnosti. Jejich výzkum a vývoj patří k nejrychleji se rozvíjejícím oblastem v posledním dvaceti letech<sup>1</sup>.

K přípravě polymerních nanokompozitů (NC) se používají taková plniva, většinou anorganická, u kterých částice dispergované v matici polymeru mají alespoň jeden rozměr v řádu nanometru. V důsledku velkého povrchu těchto nanoplňiv postačí jen několik procent pro výrazné zlepšení mnohých vlastností daných polymerů. Podle tvaru lze plniva rozdělit na isodimensionální částice (např. pyrogenní SiO<sub>2</sub>), vlákna (whiskery – monokrystalická celulosová vlákna, uhlíkaté nanotrubičky) a destičkovité částice (grafit, vrstevnaté silikáty). Syntézy a vlastnosti jejich polymerních nanokompozitů jsou popsány v řadě mono-

grafií a přehledných článků<sup>2–9</sup>. V tomto přehledu se omezíme na nanokompozity polyamidů s vrstevnatými silikáty.

## 2. Polyamidy

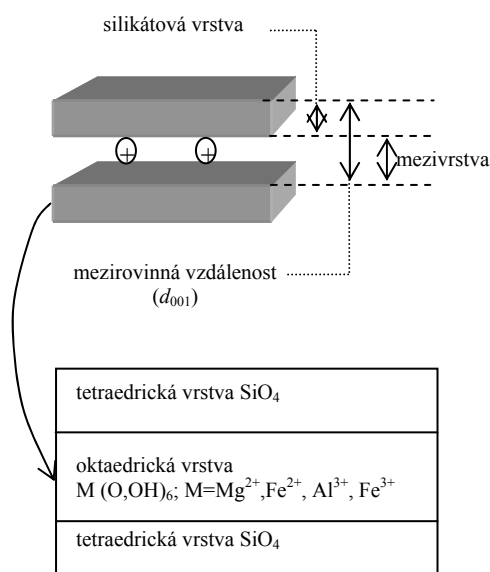
Lineární alifatické polyamidy (PA), v USA i v některých jiných anglosaských zemích označované jako Nylony (Ny), se řadí mezi nejdůležitější polymery, jak pro některé výjimečné vlastnosti, tak objemem celosvětové roční produkce přes 7 Mt (na PA6 připadá cca 55 %, na PA66 cca 40 %). V makromolekulách polyamidů se pravidelně opakuje amidová vazba -CO-NH- a jednotlivé typy alifatických polyamidů se liší počtem methylenových skupin mezi skupinami amidovými. První syntetický polyamid 66 byl vyroben v USA v roce 1938. Polyamidy se převážně používají ve vláknářském průmyslu, ale jejich aplikace jako konstrukčních materiálů v různých odvětvích rapidně roste<sup>10a</sup>. Jednotlivé typy alifatických polyamidů se identifikují názvem nebo symbolem (PA nebo Ny) a číselným údajem, který odpovídá počtu atomů uhlíku v monomeru (monomerech) použitých pro syntézu daného polyamidu. Vyrábějí se polykondenzací diaminů a dikarboxylových kyselin (např. PA46, PA66 a PA612), polykondenzací aminokyselin (PA11) nebo polymerací cyklických monomerů – laktamů (PA6, PA12)<sup>10–12</sup>.

Na náročnější aplikace se stále více prosazují dražší polyamidy aromatické (např. Nomex, Kevlar). Polyamidy se zpracovávají vstřikováním nebo vytlačováním. Zvláštní postavení mají technologie využívající vysoké rychlosti aniontové polymerace, která dovoluje spojit do jednoho technologického celku polymeraci a tváření výrobku, tzv. polymerační odlévání (monomer casting) ve statických nebo rotujících formách, reakční injekční vstřikování (RIM) a reakční extruze. Tyto technologie umožňují výrobu rozměrných výrobků různých tvarů, jako desek, trubek, ozubených kol i nádrží na pohonné hmoty.

Polyamidy se vyznačují vynikajícími mechanickými vlastnostmi, vysokým modulem pružnosti, vysokou tvrdostí, poměrně vysokou houževnatostí a odolností vůči oděru. Vlastnosti těchto materiálů je možno dále modifikovat při jejich výrobě kombinací různých diaminů a dikyseliny, případně i laktamů a získat tak škálu materiálů s rozličnými vlastnostmi. S přísadou mikroplniv (např. skleněných vláken, grafitu, vápence) jsou běžně vyráběny plněné polyamidy, jejichž výsledné vlastnosti závisí na typu a koncentraci (10–40 %) plniva.

## 3. Vrstevnaté silikáty

Pro syntézu polyamidových NC se nejvíce uplatňují botnatelné hydrofilní fylosilikáty, které tvoří podstatný



Obr. 1. Příklad struktury vrstevnatého silikátu (MMT)

podíl jílu, zvláště minerály skupiny smektitů<sup>2–6,8,9</sup>. V literatuře nanokompozitů je jíl (clay) častým synonymem pro vrstevnatý silikát (VS).

Morfologie částice VS má několik úrovní (obr. 1). Nejmenším útvarem je silikátová záporně nabitá vrstva o tloušťce ~ 1 nm s příčnými rozměry dosahujícími desítek nm až několik  $\mu\text{m}$  v závislosti na typu silikátu, jeho zdroji a metodě zpracování. Krystal tvoří několik jednotek až desítek paralelně uložených vrstev (mezirovinná vzdálenost  $d_{(001)} \sim 1 \text{ nm}$ ), které jsou vzájemně elektrostaticky poutány nestrukturními, snadno vyměnitelnými povrchovými kationty. Primární částice minerálu, velikosti až několik  $\mu\text{m}$ , vznikají již méně pravidelným vrstvením krystalů. Tyto primární částice se shlukují až do milimetrových agregátů.

Vrstvu silikátu tvoří 1 nebo 2 vrstvy tetraedrů SiO<sub>4</sub> spojených společnými kyslíkovými atomy s vrstvami oktaedrů M(O,OH)<sub>6</sub>, kde M jsou buď dvojmocné (Mg, Fe) nebo trojmocné (Al, Fe) kationty. Záporný náboj vznikají-

cí uvnitř vrstvy isomorfní substitucí centrálních a Si kationtů za kationty s nižším mocenstvím je dislokován na kyslíkové atomy obou povrchů a kompenzován různými povrchovými kationty. Velikost náboje CEC (cation exchange capacity) se pohybuje od 1 do 130 meq/100 g silikátu a liší se i u daného minerálu od ložiska k ložisku. Mezirovinné kationty (většinou Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>) jsou hydratovatelné. Botnání prostoru mezi vrstvami může vést až k zániku krystalů způsobenému úplnou separací a rozptýlením vrstev do daného prostředí (delaminace či exfoliace). Jiné polární molekuly, na rozdíl od vody, mohou mezirovinně krystalu pouze omezeně nabobtnat (interkalovat) za vzniku interkalátu se zvětšenou hodnotou  $d_{(001)}$ .

Nejčastěji používaným, levným VS je minerál montmorillonit (MMT), majoritní podíl bentonitů, jejichž roční světová produkce dosahuje desítek milionů tun. Několik největších světových ložisek a producentů rafinovaného sodného montmorillonitu (NaMMT) je uvedeno v tab. I. V nepoměrně menší míře se pro přípravu NC používají i ostatní minerály skupin smektitů a saponitů, např. hektorit nebo skupiny slíd, některé z nich i syntetické (např. fluorohektorit).

Syntézu NC s exfoliovaným VS ve vodném prostředí lze uskutečnit jen u malé skupiny velmi polárních polymerů. Proto byly hledány metody modifikace (organofilizace) VS, které by umožnily jejich použití pro méně polární až nepolární polymery. Cílem je nejen hydrofobizovat povrch vrstev silikátu, ale i zvětšit jejich vzájemnou vzdálenost a zabezpečit takové interakce mezi silikátem, modifikátorem a polymerem, aby výsledný NC byl termodynamicky stabilní.

Organofilizace se provádí ve vodné suspenzi VS nejčastěji výměnou Na<sup>+</sup> za různé organické kationty, převážně amoniové<sup>8</sup>, které mají obvykle dlouhý alkyl a občas i polární substituenty<sup>9</sup>. Firma Southern Clay Product vyrábí sérii organofilizovaných VS s obchodním názvem Cloisite<sup>®</sup> s deriváty aminů přírodního původu obsahující směsi nestejně dlouhých nasycených i nenasycených uhlovodíkových řetězců: amin z kokosových ořechů s převažující délkou řetězců 12 uhlíků, „tallow“ z rafinovaného živočišného vosku s ~ C-18 a z řepkového semene s C-22 (cit.<sup>13</sup>). V daleko menší míře je popsáno použití dusíkatých heterocyklických, fosfoniových a neiontových modifikátorů. S rostoucí molární hmotností organického kationtu

Tabulka I  
Zdroje a dodavatelé sodného montmorillonitu

Název	Výrobce	Ložisko	CEC <sup>a</sup> (meq/100g)
Kunipia P <sup>®</sup> a F <sup>®</sup>	Kunimine Industries Co., Ltd.	Yamagata, Jap.	119
Cloisite <sup>®</sup> Na <sup>+</sup>	Southern Clay Products Inc.	Wyoming, USA	92
Na <sup>+</sup> - MMT (BP-180)	Zhejijang Fenghong Clay Chemicals Co., Ltd.	Liu Fang Zi, Čína	85
Nanofil 757	Süd Chemie	Bavorsko, SRN	68

<sup>a</sup> Výměnná kapacita

(obvykle 200 až 400 g mol<sup>-1</sup>) u těchto organických interkalátů (OVS) se zvětšuje vzdálenost mezi vrstvami (o 0,4 až 1,0 nm) a strmě klesá jejich vzájemná elektrostatičká přitažlivost. Volná energie exfoliace, která překonává jen zbývající slabé dispersní van der Waalsovy síly, se oproti původním VS několikrát zmenší. Tím je umožněna další interkalace různými organickými molekulami, hlavně monomery nebo polymerem, která vede až k exfoliaci OVS. V některých případech se OVS ještě kointerkalují polárními neiontovými sloučeninami, např. epoxidem (zvětšujícím  $d_{(001)}$  na 4 nm)<sup>14</sup>. Vzácně se organofilizace provádí pouhou interkalací VS neiontovými sloučeninami. Hydroxylové skupiny centrálních kationtů na bočních hranách vrstev se někdy blokují organickými silany, zvláště při přípravě NC nepolárních polymerů.

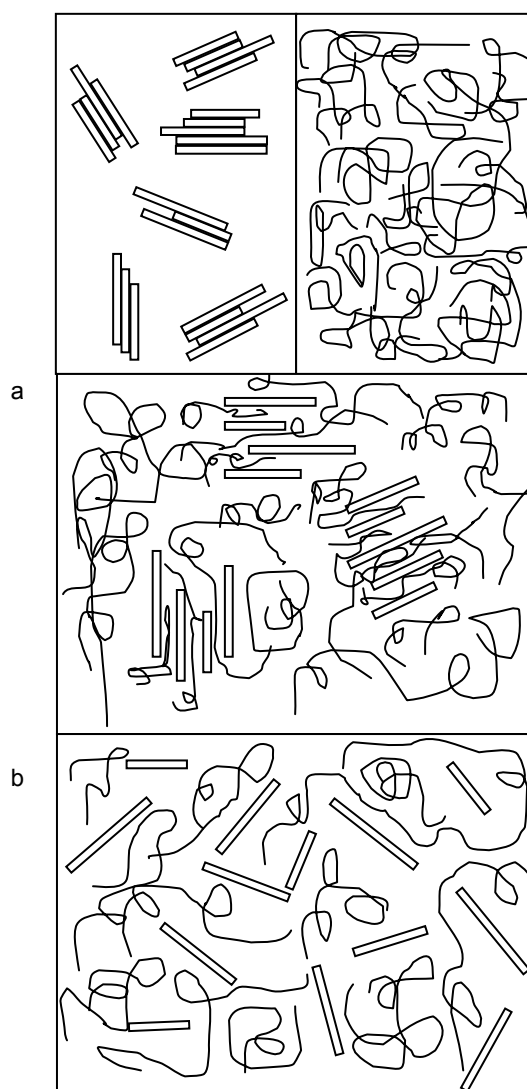
Organofilizace VS přináší i některé nevýhody:

(1) zvyšuje cenu plniva; (2) dostupnost modifikátorů je omezena; pouze několik typů alkylamoniových solí je komerčně využíváno ve větší míře jako změkčovadla a jejich toxicita, byť slabá, zpochybňuje uplatnění v aplikacích přicházejících do přímého kontaktu s potravinami; (3) vysoký obsah plastifikujícího modifikátoru (cca 20–50 hm.%) částečně snižuje ztužující efekt silikátových vrstev v polymeru a (4) produkty termické degradace modifikátoru, vznikající u některých OVS již od teploty 160 °C (cit.<sup>4,9</sup>), mohou nepříznivě ovlivnit vlastnosti NC.

#### 4. Příprava nanokompozitů

Cílem všech syntéz NC je dosažení úplné exfoliace silikátových vrstev pro uvolnění jejich maximálního povrchu a zajištění co nejlepší kompatibility fází (obr. 2).

Tvorbu NC lze z termodynamického hlediska považovat za dvoustupňový proces – oddálení vrstev silikátu a solvataci nově vzniklého povrchu polymerem. Ztráta entropie polymerního klubka vměstnaného mezi vrstvy je přibližně kompenzována ziskem z jejich oddalování. Rozhodující roli pak hrají energie všech vzájemných interakcí mezi polymerem, silikátem i případným modifikátorem. Obtížné experimentální sledování těchto dějů si vynutilo aplikace různých simulačních metod, které poskytly informace o interakcích, dynamice a struktuře<sup>9,15–17</sup>. Například bylo zjištěno, že velká vazebná energie mezi maticí Nylonu 66 a NaMMT se zmenšuje u organofilizovaných MMT (OMMT) téměř lineárně s rostoucím objemem kvarterního amoniového kationtu, jímž je povrch zakrýván. To je způsobeno tím, že kladný náboj kationtu je převážně delokalizován na všechny jeho vodíkové atomy a ty také mají tendenci interagovat s parciálním záporným nábojem kyslíkových atomů tvořících povrch MMT vrstev<sup>15</sup>. Při porovnání interakcí nanokompozitů Ny6/OMMT s N kationtem odvozeným od kyseliny  $\omega$ -aminododekanové, 1-aminododekanu a 1,12-diaminododekanu bylo zjištěno, že interakce mezi silikátem a modifikátorem jsou několikrát silnější než interakce mezi silikátem a polymerem i mezi polymerem a modifikátorem. Částečnou příčinou malé afinity modifi-



Obr. 2. Možnosti interakce vrstevnatého silikátu a polymerních molekul za vzniku nanokompozitu s interkalovanou (a) a exfoliovanou strukturou (b)

kátoru k polyamidu jsou odpudivé interakce mezi alkylem a nepolárními segmenty polyamidu<sup>17</sup>. I přes všechny dosažené výsledky simulací bývají optimální volba plniva, jeho modifikace pro daný polymer a způsob přípravy NC doposud nejčastěji nalezeny jen pracnou experimentální zkusmou metodou.

Metody syntéz nanokompozitů lze rozdělit na tyto základní typy:

1. Polymerizace interkalovaného monomeru ze suspenze VS nebo OVS v daném monomeru (metoda *in situ*), kterou používá jen několik velkých výrobců polymerů pro polyamid 6 (např. Ube Industries, Unitika a Honeywell).
2. Míšení taveniny polymeru s VS nebo OVS je metodou později zavedenou, dnes však nejrozšířenější. Vhodné

reologické vlastnosti tavenin NC umožňují použití běžných zpracovatelských technologií. Míšením se však někdy nedosáhne takových zlepšení vlastností NC jako metodou *in situ*.

3. Z vodného nebo organického roztoku polymeru, ve kterém je suspendován VS nebo OVS.

Při uvedených syntézách nanokompozitů polymerní řetězce naboňávají krystal silikátu zvětšením rozměru kolmého na vrstvy ( $d_{(001)}$ ). Vzniká dvousložkový interkalát u VS nebo trojsložkový u OVS. Pouze v případě příznivých kompatibilit všech složek pokračuje botnání interkalátu až do vzniku exfoliovaného nanokompozitu, ve kterém silikát již ztrácí své krystalické uspořádání. Obvykle NC obsahuje oba morfologické typy. Koncentrace interkalátu je vyšší nejen při termodynamických parametrech nedostatečných pro exfoliaci, ale i při vysokých koncentracích silikátu (nad ~10 hm.%) znemožňujících náhodné rozptýlení vrstev v matrici.

Rozsah exfoliace VS bývá hodnocen pomocí následujících metod:

Difrakce X-záření. Chybějící reflexe  $d_{(001)}$  u vzorku NC v širokoúhlové (WAXS) i maloúhlové (SAXS) oblasti je důkazem úplné exfoliace silikátu, s přesností danou citlivostí detektoru. Pokud je použita pouze metoda WAXS, nepřítomnost této reflexe může indikovat jak exfoliaci, tak i interkalaci krystalů s přibližnou hodnotou  $d_{(001)} > 5$  nm (při obvyklé vlnové délce 0,154 nm), kdy difrak-

ční maximum interkalátu je již překryto primárním paprskem. Jestliže intenzita rozptylu monotónně roste s klesajícím úhlem, pak je úměrná koncentraci exfoliovaných vrstev.

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je časově náročnou, avšak nejvíce vypovídající metodou, pokud je řada snímků daného vzorku podrobena obrazové analýze<sup>18</sup>. Je nutno zajistit reprezentativní řezy, použít dostatečně vysokého napětí a krátké expoziční doby, aby se zabránilo úbytku pozorovaných vrstev destrukcí. Lze stanovit průměrné rozměry částic (výšky i délky vrstev), jejich počet na  $\mu\text{m}^2$  a orientaci. Je překvapivé, že přes extrémně vysoké moduly bývají pozorované vrstvy často zohýbané až zmačkané, a to tím více, čím větším smykovým napětím byly dispergovány. Pro sledování morfologie VS v nanokompozitech se obvykle používají obě uvedené, navzájem se doplňující metody.

Protože mnohé vlastnosti NC (mechanické, reologické chování taveniny) jsou silně závislé na exfoliaci, pak lze její relativní rozsah porovnat u řady podobných vzorků také stanovením těchto vlastností.

Polymerní NC lze připravit s celou škálou koncentrací VS. Ovšem ty s převažujícím obsahem silikátového plniva stávají se spíše materiály keramickými. Za optimální koncentraci VS bývá považována přibližně polovina perkoláčního prahu<sup>6</sup>. Ten je definován koncentrací, při které se částice (v našem případě vrstvy), statisticky dispergované v matrici, začnou vzájemně dotýkat za vzniku fyzikální

Tabulka II

Vlastnosti nanokompozitů Nylonu 6 připravených polymerací *in situ* nebo míšením v tavenině

Vzorek	X-MMT <sup>a</sup> X <sup>+</sup> (CEC) <sup>b</sup>	MMT <sup>c</sup> [%]	$E_t^d$ [GPa]	$\sigma_s^e$ [MPa]	$\epsilon_r^f$ [%]	$a_k^{g,h}$	HDT <sup>i</sup> [°C]	$P_n^j$	Lit.
<i>Polymerace in situ</i>									
Nylon 6	–	0	1,11	69	> 100	> 150 <sup>g</sup>	65	463	6
NCH2	KAD(119)	1,5	1,43	76	> 100	102 <sup>g</sup>	118	152	6
NCH5	KAD(119)	3,9	1,87	97	7	53 <sup>g</sup>	152	88	6
NCH8	KAD(119)	6,8	2,11	94	3	17 <sup>g</sup>	153	56	6
one pot	KAK(119)	4,1	2,25	102	–	–	160	200	6
NHM20	Na(85)	2,0		90	10	24 <sup>h</sup>	133	113	20a
<i>Míšení v tavenině s Ny6<sup>k</sup></i>									
Ny6 <sup>k</sup>	–	0	2,75	70	300	44 <sup>h</sup>	–	266	23
NC Ny6	HMR(107)	1,6	3,49	80	190	43 <sup>h</sup>	–	266	23
NC Ny6	HMR(107)	3,2	3,92	85	120	45 <sup>h</sup>	–	266	23
NC Ny6	HMR(107)	4,6	4,59	91	40	45 <sup>h</sup>	–	266	23
NCH	Na(119)	1,6	1,38	82	–	–	102	163	6

<sup>a</sup> X<sup>+</sup>: KAD – 12-ammoniumdodekanová kyselina, KAK – 6-ammoniumkapronová kyselina, HMR – Kunipia P<sup>®</sup> bis(hydroxyethyl)methyl C-22 alkyl („rapeseed“) ammonium; <sup>b</sup> CEC výměnná kapacita [ $\text{meq } 10^{-2} \text{ g}^{-1}$ ]; <sup>c</sup> obsah smektitu; <sup>d</sup> Youngův modul pružnosti; <sup>e</sup> mez pevnosti; <sup>f</sup> relativní prodloužení při přetržení, ASTM D638; <sup>g</sup> houževnatost Charpy (bez vrubu) [ $\text{kJ m}^{-2}$ ]; <sup>h</sup> houževnatost Izod [ $\text{J m}^{-1}$ ], ASTM D256; <sup>i</sup> tvarová stálost za tepla [1,82 MPa] podle ASTM 648; <sup>j</sup> početně průměrný polymerační stupeň; <sup>k</sup> Nylon 6 (Capron<sup>®</sup> B135WP (Honeywell  $M_n = 30\,100 \text{ g mol}^{-1}$ ))

prostorové mříže. Hodnota perkolačního prahu je závislá na poměru nejdelšího k nejkratšímu rozměru částice, tj. na aspektním poměru. Vrstva primárního krystalu minerálu např. 1  $\mu\text{m}$  dlouhá má aspektní poměr 1000, ten se snižuje při manipulaci, rafinaci, organofilizaci a syntéze NC polymerizací monomeru a ještě více při míšení s taveninou polymeru. V posledním uvedeném případě bývá hodnota aspektního poměru zcela exfoliovaného VS jen  $\sim 100$  a ještě menší při exfoliaci částečně.

#### 4.1. Polymerační metody

Prvními komercializovanými nanokompozity byly NC Nylonu 6 s OMMT připravené polymerizací  $\epsilon$ -kaprolaktamu již v roce 1985 (Toyota Central R&D Labs.) pro aplikace v automobilovém průmyslu. Prvý patent kompozitu Ny6/OMMT, avšak nedokonalých vlastností, byl podán již v roce 1975. Zásluhu na zdokonaleném postupu vhodném pro výrobu měl tým vědců v laboratořích fy Toyota provádějící dlouhodobý systematický výzkum<sup>3–6</sup>. Dále uvádíme příklady vývoje syntéz NC a některé z jejich vlastností v tab. II.

(a) Zmínění autoři našli, že  $\epsilon$ -kaprolaktam (KL) dobře botná MMT i jiné smektity organofilizované kyselinou 12-ammoniumdodekanovou (KAD). Při polymerizaci KL roste řetězec polyamidu 6 na karboxylové skupině modifikátoru zakotveného amoniemovou skupinou na povrchu silikátu a postupně oddaluje až exfoliuje jeho vrstvy. Touto metodou připravili i srovnávací sérii NC Ny6 s 5 hm.% MMT (CEC 119 meq/100 g), syntetické slidy (100), hektoritu (50) a saponitu (100). V uvedeném pořadí klesal modul pružnosti, pevnost v tahu, tvarová stálost za tepla (HDT) i velikost interakce  $\text{NH}_3^+$ /silikát stanovená pomocí  $^{15}\text{N}$ -NMR na modelových interkalátech<sup>6</sup>. Molární hmotnost polyamidu byla závislá na koncentraci KAD. Tento až 60 h trvající polymerizační proces při teplotě 260  $^\circ\text{C}$  zkrátily na 12 h přidáním vody (nebo nesusšeného OMMT). Přítomná voda hydrolyzuje KL na další iniciátor – kyselinu 6-aminokapronovou (AK). Řetězce polyamidu, které na ní rostou jak polymerizací KL, tak vzájemnou polykondenzací, však nejsou zakotveny na silikátu. Jejich délku lze řídit dobou reakce. Přidáním AK místo vody ještě zkrátily polymerizační dobu na 6 h a tento způsob komercializovali<sup>3–6</sup>.

(b) Později přípravu NC ještě zjednodušili – organofilizace NaMMT a polymerace KL probíhala v jednom reaktoru (tzv. „one pot“ postup)<sup>6</sup>. Ve vodné suspenzi Na-MMT rozpustili KL, AK i silnou kyselinu schopnou ji protonovat (HCl nebo  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a směs zahřívali 6 h na teplotu 260  $^\circ\text{C}$  při normálním tlaku. Minerální kyselina však způsobuje korozi reaktoru. Nanokompozity jiných polyamidů, např. polyamidu 12 a syntetického fluoroaluminosilikátu<sup>19</sup>, byly získány polykondenzací  $\omega$ -aminokyselin, z nichž malá část odpovídající CEC silikátu byla předem protonovaná kyselinou a interkalována do VS.

Další metoda, bez použití anorganické kyseliny, vycházela z exfoliované suspenze NaMMT ve vodném roztoku KL, v němž se část KL zahřátím hydrolyzovala na AK.

Polymerace a polykondenzace iniciovaná AK probíhala při teplotě 250–260  $^\circ\text{C}$  tři hodiny za zvýšeného tlaku a dále tři hodiny po jeho uvolnění. Přestože NaMMT nebyl zcela exfoliovaný a neprotonované konce řetězců polyamidu nebyly poutány k silikátu iontovou vazbou, výrobek vykazoval téměř srovnatelné mechanické vlastnosti s těmi předchozími<sup>20a</sup> (tab. II). U syntéz NC s nemodifikovaným NaMMT vzniká polymerizací KL homopolymer polyamid 6. V případě postupu (a) vzniká změkčenější kopolymer Ny612 s cca 1 hm.% dodecylamidových segmentů<sup>6</sup>.

Pro polymerizace KL *in situ* byly většinou použity jen 2 typy modifikátorů VS: alifatické  $\omega$ -aminokyseliny a kvartérní bis(hydroxyethyl)methylalkylaminy.

Uvedené polymerizace KL, tzv. hydrolytické, probíhají velmi pomalu i při vysokých teplotách. Naproti tomu aniontovou polymerizací lze získat polyamidy během několika minut i při teplotách pod jejich teplotou tání. Tato metoda se používá v nenáročném technologii polymeračního odlévání (*monomer casting*) a v reakční extruzi při vyšších teplotách<sup>10a</sup>. Aplikace aniontové polymerizace pro syntézu NC z OMMT je však problematická<sup>20b</sup>. Příčinou je rychlá výměna organického kationtu za  $\text{Na}^+$  polymeračního katalyzátoru (sodné soli KL), která vede k agregaci až ke krystalizaci exfoliovaných vrstev projevující se i částečnou sedimentací vzniklého NaMMT, jenž v suchém KL neexfoliuje.

Výše uvedený problém nenastane při použití vodné suspenze exfoliovaného NaMMT. Po přidání KL je nutno vodu odstranit, neboť deaktivuje aniontové katalyzátory. Protože odpaření vody ani za intenzivní sonifikace neproběhne kvantitativně, je nezbytné zvýšit koncentraci katalyzátoru a/nebo použít jen malého ( $\leq 1,5$  hm.%) množství NaMMT<sup>20a</sup>. Z těchto příkladů je patrné, že využití aniontové polymerace laktamů není příliš perspektivní pro syntézu NC. Přesto byla úspěšně použita pro ztuzení polymerní směsi PA6/polyfenylenoxyd/NaMMT<sup>20c</sup>. V cit.<sup>21</sup> je popsána i kontinuální aniontová polymerizace KL ve směsi s 1 až 3 hm.% OMMT na NC spřádaný na vlákna se zvýšenou pevností i modulem.

#### 4.2. Míšení v tavenině

Po zavedení této metody přípravou NC Nylon 6 / OMMT trvalo ještě několik let, než byly nalezeny optimální parametry organofilizace VS a podmínek míšení.

Při postupu *in situ* rostou řetězce polymeru v prostoru mezi interkalovanými nebo již monomerem exfoliovanými vrstvami silikátu. Při míšení musí řetězce roztaveného polymeru difundovat mezi stísněné vrstvy krystalů OVS jen malými bočními plochami. Je-li dobrá kompatibilita složek, rostoucí botnání krystalů vede k postupnému odlupování krajních vrstev a až k zániku (exfoliaci) celého krystalu bez ohledu na mechanické parametry procesu, které mohou ovlivnit pouze rychlost děje. Avšak při malé kompatibilitě se difuze polymeru do VS zastaví na určitém stupni nabotnění směřujícím k rovnováze. Vzniklý interkalovaný krystal může být pak štěpen ve smykovém silovém poli, kdy za skluzu vrstev postupně vznikají tenčí

a tenčí krystaly (taktoidy). V tomto případě hrají technologické parametry míšení význačnou roli<sup>7,22</sup>. Pokračuje-li však mechanicky vynucené štěpení krystalů až ke vzniku termodynamicky nestabilních, s matricí málo kompatibilních taktoidů nebo dokonce vrstev, rychle dochází k jejich zpětné agregaci při jakémkoliv následujícím tepelném zpracování NC.

Pro syntézu NC polyamidu 6 a 6,6 jsou výhodnější OMMT s vyšším CEC<sup>23</sup>, amoniový modifikátor jen s jedním dlouhým uhlovodíkovým a přednostně i s polárním substituentem<sup>24</sup>. Reologické vlastnosti tavenin NC s obsahem silikátu nepřevyšujícím 10 hm.% umožňují použití běžných směšovacíh zařízení. Nejčastěji je používán dvoušnekový extruder při středním smykovém napětí. Dávkování plniva až do taveniny a delší doba zdržení vedou k lepším výsledkům. Pro výzkumné účely, kdy jsou k dispozici malá množství materiálů a je potřeba vyzkoušet mnoho kombinací složek, je dobrou alternativou microcompouder fy DSM o obsahu 5 cm<sup>3</sup> (cit.<sup>22</sup>). Volbu otáček i doby zdržení je nutno optimalizovat, protože závislosti aspektního poměru plniva na uvedených parametrech vykazují maxima. Delaminaci podporuje i co nejvyšší molární hmotnost polyamidu<sup>23,25</sup>. Podmínkou pro minimalizaci degradace polyamidu i modifikátoru je co nejdokonalější vysušení všech složek směsi.

Metodou míšení v tavenině byly připraveny nanokompozity OVS i s jinými polyamidy – semikrystalickými – PA11 (cit.<sup>24b</sup>), PA12 (cit.<sup>19,24b,26,27</sup>), amorfním (Zytel 330) (cit.<sup>28</sup>) a také s různými silikáty.

Méně často se používají organicky nemodifikované VS. Obdobně jako u metody polymerizační je pro jejich exfoliaci nutná přítomnost vody. Ta se může přidat ke směsi polymer/NaMMT v určité fázi míšení, avšak výhodnější je dávkovat do taveniny polymeru již exfoliovanou vodnou suspenzí NaMMT (cit.<sup>5</sup>). Snížením tlaku ke konci procesu se voda nechá odpařit. Je pozoruhodné, že snížení molární hmotnosti polyamidu hydrolyzou amidových skupin během procesu je nepatrné.

Metoda míšení v tavenině je zvláště vhodná pro přípravu nanokompozitů polymerních směsí. Protože polyamidy nejsou kompatibilní s žádným polymerem, dokonce ani navzájem, vznikají vždy vícefázové struktury. Byla připravena řada polyamidových NC se semikrystalickými, např. s polypropylenem, poly(vinylidenfluoridem), poly(vinylalkoholem) i amorfními polymery. Největší pozornost byla věnována směsím s elastomery<sup>29,30</sup>, jimiž lze eliminovat obvykle nízkou houževnatost dvousložkových NC, viz kap. 5.2.

#### 4.3. Metoda z roztoku

Drahá nebo agresivní rozpouštědla polyamidů (amidy, silné kyseliny, fenoly, fluorované nebo chlorované alkoholy) i jejich následná likvidace činí tuto metodu přípravy NC finančně i ekologicky málo vhodnou. Výjimkou je přímá tvorba nanovláken elektrospřádáním z roztoků nanokompozitů<sup>31</sup> a méně častá příprava NC filmů rozpustných aromatických polyamidů<sup>32</sup>. Není-li konečným cílem

vláknitý materiál, do vody vysrážený NC je nutno zbavit rozpouštědla důkladným praním vodou, vysušit a zpracovat z taveniny<sup>33</sup>. Do této skupiny lze zařadit i přípravu NC emulzní polymerací.

## 5. Vlastnosti nanokompozitů

### 5.1. Struktura a morfologie

Od svých mateřských polymerů se dobře exfoliované NC s obsahem VS do ~ 5 hm.% liší již na pohled. Jsou transparentnější a lisovstříkované vzorky mají velmi hladký povrch.

Krystalizace PA6 je v přítomnosti VS zrychlena epitaxiální nukleací vedoucí ke vzniku  $\gamma$  modifikace na rozdíl od obvyklé, stabilnější  $\alpha$  struktury. Řetězce polyamidu jsou uloženy rovnoběžně s povrchem vrstvy silikátu a kolmo k rovině H-můstek rostoucího krystalu<sup>5,6</sup>. Ionová vazba konců řetězců a H-můstky amidových skupin s povrchem jsou příčinou velmi pevného spojení matrice se silikátem.

Rozhodující vliv na vlastnosti NC má morfologie VS. Ta je buď interkalovaná nebo exfoliovaná. Ve většině případů se vyskytují obě společně. Obtížnost v její charakterizaci tkví v široké distribuci velikostí a tvarů částic. V krystalech MMT (o modulu ~ 420 GPa) jsou vrstvy rovinné, avšak exfoliované vrstvy, které mají snížený modul na ~ 170 GPa, se již mohou ohýbat až mačkat. Jejich distribuce v exfoliovaném stavu není rovnoměrná. Na mikrometrové úrovni vznikají řídké, flexibilní shluky vrstev postřehnutelných jen rentgenovou difrakcí v ultramaloúhlové oblasti<sup>34</sup>. Největší nerovnoměrností je však orientace anizotropních částic VS vznikající vždy při formování výrobku NC za toku taveniny. Například u lisovstříkovaného kvádrů exfoliovaného NC z Ny66 o rozměrech 130×13×13 mm byla tloušťka orientované oblasti s vrstvami MMT rovnoběžnými se čtyřmi stěnami 1,5–2 mm (cit.<sup>35</sup>).

### 5.2. Mechanické vlastnosti

Vysoký modul jednotlivých vrstev VS, jejich specifický povrch (~ 800 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) i aspektní poměr (~ 100) jsou hlavní příčinou výrazného ztužujícího efektu i při jejich nízké koncentraci v NC. Při neúplné exfoliaci však prudce klesá aspektní poměr s rostoucím počtem vrstev v interkalátech. Například, moduly v tahu NC Ny6 i Ny66 rostou lineárně do 6 až 10 hm.% OVS a pak se růst zpomaluje. V lineární oblasti rostou ohybové moduly exfoliovaných NC Ny66 s OMMT desetkrát rychleji než u mikrokompozitů s kaolinem a třikrát rychleji oproti těm se skleněnými vlákny nebo neexfoliovaným NaMMT (cit.<sup>7</sup>). Přestože v hodnotách modulů a pevností neplněný Ny66 předčí Ny6, u jejich NC platí opak již od 1 hm.% obsahu MMT (cit.<sup>18</sup>). Příčinou je obecně lepší exfoliovatelnost OMMT v Ny6.

Pomocí teorií kompozitů (Halpin-Tsai, Mori-Tanaka)

Tabulka III

Vliv typu elastomeru a Cloisitu v nanokompozitech polyamid 6/elastomer/Cloisite (90/5/5 hm.%) na velikost domén elastomeru a mechanické vlastnosti<sup>29</sup>

Elastomer <sup>a</sup>	Cloisite <sup>b</sup>	vd <sup>c</sup> [nm]	$E_t/E_{t0}$ <sup>d</sup>	$\sigma_b/\sigma_{b0}$ <sup>d</sup>	$a_k/a_{k0}$ <sup>d</sup>
EPR	C25A	400	1,49	1,13	2,8
NBR	C25A	250	1,50	1,14	4,1
NBR	C30B	220	1,51	1,15	3,9
EMA	C25A	130	1,55	1,16	2,6
EMA	C30B	180	1,57	1,17	3,7

<sup>a</sup> Elastomery na bázi: ethen-propen (EPR), akrylonitril-hydrogenovaný butadien (NBR) a ethen-methylakrylát (EMA); <sup>b</sup> organofilizovaný MMT (Southern Clay Product, Inc.); <sup>c</sup> velikost domén elastomeru; <sup>d</sup>  $E_t/E_{t0}$ ;  $\sigma_b/\sigma_{b0}$ ;  $a_k/a_{k0}$  – relativní zvýšení modulu pružnosti v tahu, meze pevnosti v tahu a vrubové houževnatosti (Charpy) vzhledem k nemodifikovanému polyamidu 6

lze hodnotit vliv modulů, aspektního poměru a orientace plniva na rozsah ztužení. Pro NC Ny6/OMMT byly získané výsledky uspokojivé<sup>36</sup>. Avšak teoretický předpoklad, že srovnatelně velké rovinné vrstvy jsou rovnoměrně dispergovány v matrici, neplatí. Důsledkem je značně snížený modul oproti teoretickému očekávání<sup>34</sup>.

Na rozdíl od modulů, závislosti pevnosti v tahu na obsahu nanoplavin procházejí maximy, prodloužení při přetržení i rázové houževnatosti klesají většinou již od samého počátku.

Obecný nedostatek nanokompozitů, tj. snižování houževnatosti s rostoucím obsahem ztužujícího silikátu, bývá odstraněn přípravou NC směsi dvou polymerů. Pro matrici semikrystalického polyamidu postačí malý přídavek jemně dispergovaného amorfního polymeru. Pro tento účel se prokázaly nejvhodnějšími partnery nanokompozitů polyamidu 6 nereaktivní kopolymerní elastomery: ethen-propen (EPR), akrylonitril-hydrogenovaný butadien (NBR) a ethen-methylakrylát (EMA) obsahující 5 hm.% elastomeru a 5 hm.% OMMT modifikovaného polárním i nepolárním substituentem (Cloisite 30B nebo 15A, 20A, 25A) (cit.<sup>29</sup>). Nejvyšší houževnatosti při jen malém snížení ztužujícího efektu bylo dosaženo, když exfoliované vrstvy OMMT dispergované v polyamidové matrici se částečně koncentrovaly na mezifázovém rozhraní elastomeru,

k čemuž docházelo tím více, čím byl elastomer polárnější. Tím byla snižována a stabilizována velikost jeho domén na 400 až 110 nm, viz tab. III. V tabulce je uvedeno i relativní zvýšení hodnot modulů, pevnosti v tahu a vrubových rázových houževnatostí (Charpy) oproti PA6. Vliv vyšších koncentrací elastomerů i MMT na uvedené vlastnosti je diskutován v práci<sup>30</sup>.

Rychlou dynamicko-mechanickou analýzou (DMA) lze stanovit teplotu skelného přechodu ( $T_g$ ) a teplotní závislost modulů  $G'$  i  $G''$ . U nanokompozitů Ny6/OMMT vzroste  $G'$  při teplotách pod  $T_g$  o 40 % a nad  $T_g$  o > 200 % (cit.<sup>6</sup>).

### 5.3. Termické vlastnosti

Jednou z nejdůležitějších vlastností NC je zvýšení tvarové stálosti za tepla (HDT) o desítky °C, např. až o 87 °C u Ny6 s 5 hm.% MMT (cit.<sup>6</sup>). HDT vyjadřuje míru tuhosti materiálu a je definována jako teplota počínající deformace vzorku při standardním zatížení. Naproti tomu teplota skelného přechodu  $T_g$ , která je dána pohyblivostí krátkých segmentů polymeru i modifikátoru v nekrystalických oblastech matrice, se zvyšuje (nebo i snižuje plastifikací modifikátorem) jen o několik °C. Lineární koeficient tepelné roztažnosti se zmenšuje s rostoucí koncentrací a hlavně orientací vrstev, avšak jen ve směru orientace lisovstříkovaného vzorku<sup>6</sup> (tab. IV).

NC mají i sníženou hořlavost způsobenou schopností silikátu přispívat k tvorbě zuhelnatělé vrstvy. Ta vytváří izolační vrstvu snižující přestup tepla a bránící přístupu plynů k hořící zóně<sup>37</sup>. Hořlavost NC lze dále podstatně omezit přídavkem retardérů hoření.

### 5.4. Bariérové vlastnosti

Další cennou vlastností NC je snížená permeabilita plynů, par a nízkomolekulárních kapalin. Hlavní příčinou je značné prodloužení difuzní dráhy kolem nepermeabilních vrstev VS, zvláště jsou-li orientované rovnoběžně

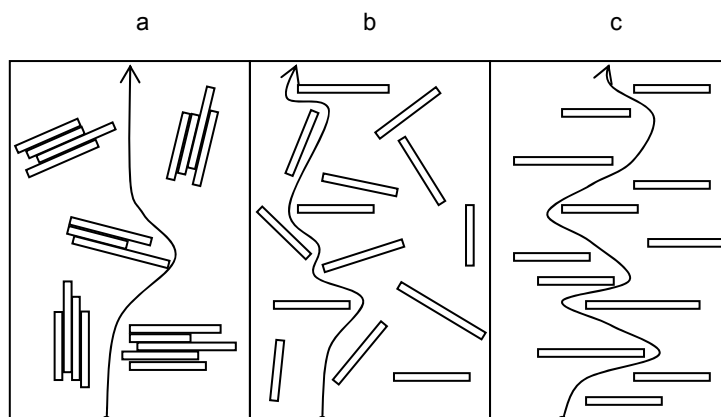
Tabulka IV

Koeficienty tepelné roztažnosti<sup>6</sup>

	Koeficient délkové tepelné roztažnosti [cm °C <sup>-1</sup> ]	
	ve směru toku taveniny	v kolmém směru taveniny
Nylon 6 <sup>a</sup>	11,7·10 <sup>-5</sup>	11,8·10 <sup>-5</sup>
NCH 5 <sup>a</sup>	6,3·10 <sup>-5</sup>	13,1·10 <sup>-5</sup>

<sup>a</sup> Vzorky připraveny polymerací *in situ*, viz tab. II





Obr. 3. Ilustrace difuze molekuly plynu přes folii mikrokompozitu polymer-vrstevnatý silikát (a), exfoliovaného neorientovaného nanokompozitu (b) nebo exfoliovaného orientovaného nanokompozitu (c)

s povrchem vzorku, jak je dokumentováno na obr. 3. Menší roli hraje snížená pohyblivost segmentů polymerních řetězců v jejich blízkosti. Permeabilita NC klesá s rostoucí koncentrací VS, stupněm exfoliace a orientace. Protože ve foliích jsou silikátové vrstvy převážně uloženy rovnoběžně s povrchem a penetrant proniká ve směru kolmém, využívá se snížení permeability kyslíku, H<sub>2</sub>O a CO<sub>2</sub> hlavně na obaly potravin. Např. permeabilita kyslíku u NC PA6/2 hm.% MMT se snížila v porovnání s panenským polyamidem o 44 % (cit.<sup>37</sup>).

Na obr. 2 a 3 jsou znázorněny nanokompozity s maticí amorfního polymeru. Krystalické lamely v semikrystalických polyamidech (které jsou rovněž nepermeabilní pro plyny) jsou řádově větší v porovnání s vrstvami silikátu.

## 6. Závěr

Lze konstatovat, že nanokompozity polyamidů 6 a 66 s vrstevnatými silikáty patří mezi polymerní nanokompozity s nejvíce zlepšenými užitnými vlastnostmi. Zásahu na tom mají hlavně amidové skupiny zajišťující dobrou kompatibilitu se silikátem i jeho případným vhodně zvoleným modifikátorem svými elektron akceptorovými i donorovými interakcemi a vodíkovými můstky.

Přípravou polyamidových nanokompozitů lze zvýšit modul pružnosti, pevnost materiálu a snížit propustnost pro plyny oproti nemoifikovanému panenskému polyamidu. Snížení houževnatosti s obsahem silikátu v materiálu lze eliminovat dispergací již malého množství elastomerů.

Přestože původní očekávání rozsahu zlepšení řady užitných vlastností oproti nemoifikovaným materiálům se naplnila jen částečně, nanokompozity polyamidů našly již komerční využití např. v automobilovém průmyslu a v obalové technice.

*Tato práce byla podpořena z prostředků MŠMT - projekt MSM 6046137302.*

## LITERATURA

1. Klusň P., Drobek M., Bartková H., Budil I.: Chem. Listy 101, 262 (2007).
2. Utracki L. A.: *Clay-Containing Polymeric Nanocomposites*, Rapra Tech. Ltd., London 2004.
3. Okamoto M.: *Advance in Polymeric Nanocomposites*, CMC Publisher, Tokio 2004.
4. Alexandre M., Dubois P.: Mater. Sci. Eng. 28, 1 (2000).
5. Ray S. S., Okamoto M.: Progr. Polym. Sci. 28, 1539 (2003).
6. Okada A., Usuki A.: Macromol. Mater. Eng. 291, 1449 (2006).
7. Goettler L. A., Lee K. Y., Thakkar H.: Polymer Rev. 47, 291 (2007).
8. Jesenák K.: Chem. Listy 101, 657 (2007).
9. Pavlidou S., Papaspyrides C. D.: Progr. Polym. Sci. 33, 1119 (2008).
10. Puffr R., Kubánek V. (ed.): *Lactam-Based Polyamides* a) sv. II: *Modification, Technology, Application*, b) sv. I: *Polymerization, Structure, Properties*, CRC Press, Boca Raton 1991.
11. Aharoni S. M. (ed.): *n-Nylons: their Synthesis, Structure, and Properties*, John Wiley & Sons, West Sussex 1997.
12. Kohan M. I. (ed.): *Nylon Plastic Handbook*, Hansen Publishers, München 1995.
13. Fornes T. D., Yoon P. J., Hunter D. L., Keskkula H., Paul D. R.: Polymer 43, 5915 (2002).
14. Liu X., Wu Q.: Macromol. Mater. Eng. 287, 180 (2002).
15. Tanaka G., Goettler L. A.: Polymer 43, 541 (2002).

16. Scocchi G., Posocco P., Fermeglia M., Priol S.: *J. Phys. Chem., B* 111, 2143 (2007).
17. Sikdar D., Katti D. R., Katti K. S.: *J. Appl. Polym. Sci.* 107, 3137 (2008).
18. Chavarria F., Paul D. R.: *Polymer* 45, 8501 (2004).
19. Reichert P., Kressler J., Thomann R., Mülhaupt R., Stöppelmann G.: *Acta Polym.* 49, 116 (1998).
20. Liu A., Xie T., Yang G.: a) *Makromol. Rapid Commun.* 27, 1572 (2006); b) *Macromol. Chem. Phys.* 207, 701 (2006); c) *Macromol. Chem. Phys.* 207, 2180 (2006).
21. Zhao M., Pan X., Wang Y.: *Int. J. Polym. Mater.* 55, 147 (2006).
22. Chavarria F., Shah R. K., Hunter D. L., Paul D. R.: *Polym. Eng. Sci.* 47, 1847 (2007).
23. Fornes T. D., Hunter D. L., Paul D. R.: *Polymer* 45, 2321 (2004).
24. Fornes T. D., Hunter D. L., Paul D. R.: *Macromolecules* 37, a) 1793, b) 7698 (2004).
25. Fornes T. D., Yoon P. J., Keskkula H., Paul D. R.: *Polymer* 42, 9929 (2001).
26. McNally T., Murphy W. R., Lew Ch. Y., Turner R. J., Brennan G. P.: *Polymer* 44, 2761 (2003).
27. Hocine N. A., Médéric P., Aubry T.: *Polym. Test.* 27, 330 (2008).
28. Yoo Y., Paul D. R.: *Polymer* 49, 3795 (2008).
29. Kelnar I., Khunová V., Kotek J., Kaprálková L.: *Polymer* 48, 5332 (2007).
30. Ahn Y.-Ch., Paul D. R.: *Polymer* 47, 2830 (2006).
31. Li Q., Wei Q., Wu N., Cai Y., Gao W.: *J. Appl. Polym. Sci.* 107, 3535 (2008).
32. Zulfiqar S., Lieberwirth I., Ahmad Z., Sarwar M. I.: *Polym. Eng. Sci.* 48, 1624, 2008.
33. Sikdar D., Katti D., Katti K., Mohanty B.: *J. Appl. Polym. Sci.* 105, 790 (2007).
34. Schaefer D. W., Justice R. S.: *Macromolecules* 40, 8501 (2007).
35. Yu Z.-Z., Yang M., Zhang Q., Zhao Ch., Mai Y.-W.: *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 41, 1234 (2003).
36. Fornes T. D., Paul D. R.: *Polymer* 44, 4993 (2003).
37. Powell C. E., Beal G. W.: *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 10, 73 (2006).

**R. Puffr<sup>a</sup> and J. Brožek<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague;* <sup>b</sup>*Department of Polymers, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Polyamide – Layered Silicate Nanocomposites**

Over recent decades, polymer – layered silicate nanocomposites have received much attention in both academia and industry. These new types of materials exhibit a dramatic improvement of properties when silicate is homogeneously dispersed in the polymer matrix, even at very low contents. This review highlights various aspects of preparation, characterization and properties of the materials. Special attention is paid to preparation of the nanocomposites by *in situ* polymerization and melt compounding.

## Děkan přírodovědecké fakulty UK

vypisuje konkurs na přijetí do doktorského studia v následujících oborech:

analytická chemie, anorganická chemie, biochemie, fyzikální chemie, makromolekulární chemie, modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, organická chemie a vzdělávání v chemii.

Studium bude zahájeno 1. 10. 2010. Podmínkou přijetí je absolvování VŠ ve shodném nebo blízkém studijním oboru. Přihlášky a podrobné informace jsou na adrese: PŘF UK, oddělení doktorského studia, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel. 221 951 162, 221 951 163. Přihlášky se přijímají do 30. 4. 2010.

## TERMODYNAMICKÉ VLASTNOSTI SMĚSNÝCH OXIDŮ V SYSTÉMU CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

JINDŘICH LEITNER<sup>a</sup>, MILAN HAMPL<sup>a</sup>,  
DAVID SEDMIDUBSKÝ<sup>b</sup>, KVĚTOSLAV  
RŮŽIČKA<sup>c</sup>, PAVEL SVOBODA<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Ústav inženýrství pevných látek, <sup>b</sup> Ústav anorganické chemie, <sup>c</sup> Ústav fyzikální chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6, <sup>d</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látek, Matematika-fyzikální fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Ke Karlovu 5, Praha 2  
jindrich.leitner@vscht.cz

Došlo 14.4.09, přijato 24.6.09.

Klíčová slova: směsné oxidy, tepelná kapacita, entropie, entalpie, Gibbsova energie

### Obsah

1. Úvod
2. Popis binárních a vybraných ternárních systémů
3. Příprava směsných oxidů
  - 3.1. Objemové vzorky
  - 3.2. Tenké vrstvy
4. Termodynamická data
  - 4.1. Základní termodynamické funkce pro čisté pevné látky a tuhé roztoky
  - 4.2. Experimentální metody pro stanovení termodynamických funkcí směsných oxidů
  - 4.3. Odhadové metody
  - 4.4. *Ab-initio* výpočty
5. Termodynamická data směsných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>
  - 5.1. Přehled literatury
  - 5.2. Možnosti použití Neumannova-Koppova pravidla pro odhad teplotní závislosti tepelných kapacit
  - 5.3. Empirická korelace *S-V* a její použití pro odhad molárních entropií
6. Závěr

### 1. Úvod

Oxidické materiály nacházejí v současné elektronice uplatnění v řadě aplikací. Používají se jako funkční materi-

ály s vlastnostmi dielektrickými (izolátory, kondenzátory, dielektrické filtry a rezonátory, feroelektrické paměti typu RAM (FeRAM), piezoelektrické aktuátory, senzory), magnetickými (magnety, jádra, čtecí/zapisovací hlavy) či optickými (lasery, optické zesilovače, optická vlákna) nebo jako konstrukční materiály (substráty, pouzdra).

V systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> existuje několik fází (směsných oxidů), které jsou předmětem zájmu jak v oblasti základního, tak aplikovaného výzkumu. Prakticky nejvýznamnější z nich je směsný oxid SrBi<sub>2</sub>Ta<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (SBT), který je feroelektrický a je již v současné době komerčně využíván jako materiál pro výrobu FeRAM\*. SBT tak představuje alternativu k běžně užívanému materiálu Pb(Zr,Ti)O<sub>3</sub>, přičemž kromě nižší toxicity přináší i další výhody – kratší přístupovou dobu k informacím a delší životnost (počet cyklů psaní/čtení)<sup>1</sup>. SBT patří mezi oxidy s vrstevnatou strukturou typu [Bi<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>[A<sub>m-1</sub>B<sub>m</sub>O<sub>3m+1</sub>]<sup>2-</sup> (tzv. Aurivilliovy fáze). Curieova teplota *T<sub>C</sub>* přechodu z feroelektrického do paraelektrického stavu byla u slinutých vzorků SBT stanovena v rozmezí 543 až 608 K. *T<sub>C</sub>* stejně jako další elektrické parametry (relativní permitivitu, remanentní polarizaci a koercitivní sílu) SBT lze řídit částečnou nebo úplnou substitucí tantalu niobem resp. stroncia vápníkem (např. přídavek Nb resp. Ca zvyšuje *T<sub>C</sub>*). Významnými se tak stávají i další fáze, SrBi<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (SBN), CaBi<sub>2</sub>Ta<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (CBT) a CaBi<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (CBN).

Další fáze, např. CaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, SrNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, Ca<sub>2</sub>(Nb,Ta)<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, BiNbO<sub>4</sub> nebo BiTaO<sub>4</sub> nacházejí uplatnění zejména jako materiály pro dielektrické rezonátory pro mikrovlnnou oblast používané např. v mobilních telefonech a navigačních systémech. Sr<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, SrTa<sub>2</sub>O<sub>6</sub> a tuhý roztok Sr<sub>2</sub>(Nb,Ta)<sub>2</sub>O<sub>7</sub> jsou feroelektrika s nízkou koercitivní silou vhodná pro přípravu struktur MFIS (metal-ferroelectric-insulator-semiconductor) pro hradla tranzistorů řízených polem (FET). Monokrystalický Ca<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dotovaný prvky vzácných zemin je studován jako vhodný materiál pro výrobu laserů s femtosekundovými pulsy.

Aby bylo možné posoudit termodynamickou stabilitu a reaktivitu jednotlivých fází za různých podmínek jejich přípravy, zpracování a použití, je pro každou látku nezbytná kompletní sada konzistentních termodynamických dat, kterými jsou standardní slučovací entalpie a standardní entropie při teplotě 298,15 K a parametry teplotní závislosti molární tepelné kapacity pro co nejširší obor teplot (alternativně parametry teplotní závislosti molární Gibbsovy energie). Cílem předložené práce je shrnout stávající informace o termodynamických vlastnostech stechiomet-

\* FeRAM na bázi SBT vyrábí a dodávají např. firmy Symetrix (USA) nebo Matsushita – Panasonic (Japonsko).

rických směsných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a dále posoudit možnost použití aditivního Neumannova-Koppova pravidla pro odhad teplotních závislostí tepelných kapacit směsných oxidů a empirické korelace mezi entropií a molárním objemem, která umožňuje predikci molárních entropií směsných oxidů.

## 2. Popis binárních a vybraných ternárních systémů

Celkem pětisložkový systém CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> je formálně tvořen deseti binárními podsystemy, deseti ternárními podsystemy a pěti kvaternárními podsystemy. V závislosti na teplotě a celkovém složení se v daných systémech může vyskytovat řada fází – stechiometrických směsných oxidů, tuhých roztoků binárních (CaO-SrO) i směsných (SrBi<sub>2</sub>Ta<sub>2</sub>O<sub>9</sub>-SrBi<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>9</sub>) oxidů či komplexní oxidická tavenina. Další proměnnou, která ovlivňuje fázové složení těchto systémů, je chemický potenciál resp. parciální tlak kyslíku v okolí. Za velmi nízkých hodnot  $p(\text{O}_2)$  se uvažované oxidy mohou rozkládat za vzniku oxidů nižších (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> → NbO<sub>2</sub> → NbO) nebo příslušných prvků. Vliv  $p(\text{O}_2)$  však není v dalším textu diskutován a kyslíková stechiometrie základních oxidů (valence oxidotvorných prvků) je uvažována jako neměnná.

Základní informace o složení a stabilitě jednotlivých fází poskytují rovnovážné fázové diagramy. Binární a ternární fázové diagramy pro řadu podsystemů jsou uvedeny ve speciální publikaci Americké keramické společnosti<sup>2</sup>. V tab. I jsou uvedeny stechiometrické ternární oxidy a tuhé roztoky, které se v jednotlivých binárních podsystemech mohou vyskytovat. V některých případech jsou ve sbírce<sup>2</sup> uváděny starší údaje, které byly později zpřesněny. Tak např. v systému Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> byly postupně popsány další stechiometrické fáze – Bi<sub>3</sub>NbO<sub>7</sub> (cit.<sup>12-14</sup>) a Bi<sub>3</sub>Nb<sub>17</sub>O<sub>47</sub> (cit.<sup>15,16</sup>) a zpřesněn průběh hranic oblastí stability tuhých roztoků v části fázového diagramu bohaté na Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (cit.<sup>17,18</sup>). Binární fázový diagram systému Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> v celém rozsahu složení nebyl dosud publikován, a tak ternární oxidy Bi-Ta v tabulce I byly uvedeny dle literatury<sup>7-11</sup>.

Z kvaternárních stechiometrických oxidů jsou prakticky nejvýznamnější ortorombické fáze SBT, SBN, CBT a CBN. Ačkoliv je složení SBT (i dalších fází) obvykle zapisováno pomocí stechiometrického vzorce SrBi<sub>2</sub>Ta<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, byly připraveny fáze s odchylkami od přesné stechiometrie 1:2:2 a byl studován vliv nestechiometrického složení na strukturu a feroelektrické vlastnosti těchto materiálů<sup>19-21</sup>. Tyto oxidy jsou vzájemně mísitelné a složením příslušných tuhých roztoků lze měnit jejich feroelektrické parametry<sup>22-24</sup>.

## 3. Příprava směsných oxidů

### 3.1. Objemové vzorky

Pro přípravu objemových polykrystalických vzorků

Tabulka I  
Přehled pevných fází v binárních podsystemech

Systém	Stechiometrické směsné oxidy	Tuhé roztoky	Lit. <sup>c</sup>
CaO-SrO	–	(Ca,Sr)O	3
CaO-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Bi <sub>14</sub> Ca <sub>5</sub> O <sub>26</sub> Bi <sub>2</sub> CaO <sub>4</sub> Bi <sub>6</sub> Ca <sub>4</sub> O <sub>13</sub> Bi <sub>2</sub> Ca <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	δ-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> β-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -CaO γ-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -CaO	3,4
CaO-Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaNb <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Ca <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub> "Ca <sub>3</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>8</sub> " <sup>b</sup> "Ca <sub>4</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>9</sub> " <sup>b</sup>	–	2, EC 088-089
CaO-Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaTa <sub>4</sub> O <sub>11</sub> CaTa <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Ca <sub>2</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Ca <sub>4</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	–	2, EC 090
SrO-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Bi <sub>2</sub> SrO <sub>4</sub> Bi <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Bi <sub>4</sub> Sr <sub>6</sub> O <sub>15</sub> <sup>a</sup> Bi <sub>2</sub> Sr <sub>3</sub> O <sub>6</sub> Bi <sub>2</sub> Sr <sub>6</sub> O <sub>11</sub> <sup>a</sup>	δ-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> β-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -SrO γ-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -SrO	3,5
SrO-Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Sr <sub>2</sub> Nb <sub>10</sub> O <sub>27</sub> SrNb <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Sr <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Sr <sub>5</sub> Nb <sub>4</sub> O <sub>15</sub> Sr <sub>4</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>9</sub> "Sr <sub>6</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>11</sub> " <sup>b</sup>	–	2, EC 128-130
SrO-Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SrTa <sub>4</sub> O <sub>11</sub> SrTa <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Sr <sub>2</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Sr <sub>5</sub> Ta <sub>4</sub> O <sub>15</sub> Sr <sub>4</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	–	2, EC 131
Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Bi <sub>2</sub> Nb <sub>12</sub> O <sub>33</sub> BiNb <sub>5</sub> O <sub>14</sub> Bi <sub>8</sub> Nb <sub>18</sub> O <sub>57</sub> BiNbO <sub>4</sub> Bi <sub>5</sub> Nb <sub>3</sub> O <sub>15</sub>	δ-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2, EC 156-157 převzato z cit. <sup>6</sup>
Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	BiTaO <sub>4</sub> Bi <sub>4</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>11</sub> Bi <sub>7</sub> Ta <sub>3</sub> O <sub>18</sub> Bi <sub>3</sub> TaO <sub>7</sub>	δ-Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	7-11
Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	"Nb <sub>4</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>15</sub> " <sup>b</sup>	α-Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> α-Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> β-Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2, EC 278-280

<sup>a</sup> V těchto směsných oxidech je bismut pětimocný (Bi<sup>V</sup>). <sup>b</sup> Fáze uvedené v uvozovkách vykazují jisté odchylky od celočíselné stechiometrie. <sup>c</sup> U citace<sup>2</sup> jsou uvedeny kódy příslušných fázových diagramů

směsných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> se nejčastěji užívá buď standardní keramický postup nebo

kombinované metody (označované jako „soft routes“) zahrnující kapalnou fázi (roztok jednotlivých složek) a následné tepelné zpracování (sol-gel metody a koprecipitační metody s využitím různých reakčních schémat)<sup>25</sup>.

Keramický postup vychází z binárních oxidů Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a z uhličitánů CaCO<sub>3</sub> a SrCO<sub>3</sub>. Výchozí směs práškových prekurzorů v požadovaném stechiometrickém poměru je opakovaně homogenizována a zahřívána na teploty cca 800–1200 °C, při kterých dochází ke kalcinaci uhličitánů a vlastní chemické reakci za vzniku požadovaného směsného oxidu.

Koprecipitační metody a metody sol-gel mají oproti keramickému postupu řadu výhod – lepší homogenitu materiálu před výpalem, nižší teploty výpalu, vznik nanočástic s velmi úzkou distribucí velikosti a vyšší čistotu finálního produktu<sup>26–28</sup>. Jako výchozí látky se užívají např. organokovové sloučeniny Sr(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Bi(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> a Ta(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>, které jsou rozpuštěny v ethylenglykolu. Po částečném odpaření vzniká gel, který se v průběhu dalšího zahřívání při 700–800 °C přemění na polykrytalickou SBT fázi. Jiné postupy vycházejí z anorganických prekurzorů, např. CaCl<sub>2</sub>, BiCl<sub>3</sub> a TaF<sub>5</sub>, které jsou převedeny do vodného roztoku. Po přidavku močoviny je roztok zahříván za vzniku precipitátu, který po oddělení a následném tepelném zpracování přechází na polykrytalickou fázi CBT. Pro přípravu ternárního oxidu BiTaO<sub>4</sub> byly použity Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> a Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Po rozpuštění ve zředěné kyselině dusičné resp. kyselině fluorovodíkové a smísení byl k roztoku v přebytku přidáván vodný roztok NH<sub>4</sub>OH, čímž docházelo k vysrážení obou kovových prvků ve formě hydroxidů. Po oddělení sraženiny a zahřívání na teplotu 700 až 800 °C je získán požadovaný produkt.

Pro studium struktury směsných oxidů byly v řadě případů připraveny i monokrystaly, např. Sr<sub>2</sub>Ta<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (cit.<sup>29</sup>), Ca<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (cit.<sup>30</sup>), BiNbO<sub>4</sub> (cit.<sup>31</sup>), Sr<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (cit.<sup>32</sup>) nebo SBT (cit.<sup>33</sup>). Pro přípravu je nejčastěji užívána rekrystalizace polykrytalického materiálu metodou pohyblivé zóny nebo přímá krystalizace z nevlátní taveniny.

### 3.2. Tenké vrstvy

Pro aplikace v elektronice (FeRAM) se SBT a příbuzné směsné oxidy připravují ve formě tenkých polykrytalických vrstev deponovaných na vhodné substráty (např. struktura Pt/TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub>/Si). Pro přípravu vrstev jsou užívány různé metody – MOCVD (depozice z plynné fáze využívající organokovové prekurzory)<sup>34–36</sup>, MOD (přímý rozklad organokovových sloučenin)<sup>37–39</sup>, PLD (pulzní laserová depozice)<sup>40,41</sup> nebo naprašování<sup>42,43</sup>.

Prekurzory využívané při MOCVD mohou každý obsahovat jeden kovový prvek (např. Sr(thd)<sub>2</sub>, thd = 2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptandionat, Bi(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub> nebo Ta(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>5</sub>) nebo jsou komplexní (např. Sr[Nb(OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>6</sub>]<sub>2</sub>) (cit.<sup>44–46</sup>). V poslední době byl jako zdroj Sr využit rovněž fluorovaný prekurzor Sr(hfac)<sub>2</sub>, hfac = 1,1,1,5,5,5-hexafluoroacetylacetonát<sup>47</sup>. Depozice probíhá za sníženého tlaku při teplotách cca 350–650 °C s následnou temperací

při 750–800 °C, během které dochází k úplné krystalizaci požadované fáze. Jako nosný plyn je užíván čistý kyslík.

Metoda MOD spočívá v nanesení vrstvy roztoku příslušného složení na substrát metodou „spin-coating“ a následném tepelném zpracování. Jako výchozí prekurzory oxidotvorných prvků se užívá řada organických sloučenin rovněž užívaných při MOCVD nebo připravené polykrytalických materiálů metodou sol-gel, např. Sr(thd)<sub>2</sub> + Bi(thd)<sub>3</sub> + Ta(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>5</sub> a rozpouštědlo kyselina 2-ethylhexanová/hexan, Sr(OCOC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)<sub>2</sub> + Bi(OCOC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)<sub>2</sub> + Ta(OCOC<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)<sub>2</sub> a rozpouštědlo *n*-oktan, Ca(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) + Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a rozpouštědlo kyselina citrónová/ethylenglykol nebo přímo komerčně dostupný roztok s požadovaným poměrem kovových prvků. Tepelné zpracování obvykle probíhá ve dvou krocích. Při teplotách do cca 300 °C nejprve dochází k rozkladu organických sloučenin za vzniku amorfni vrstvy, která je následně temperována na cca 650–750 °C, přičemž dochází k chemické reakci a krystalizaci požadované fáze. Vzniklá monovrstva dosahuje tloušťky řádově 10–100 nm. Pro dosažení celkové požadované tloušťky vrstvy se celý postup vícekrát opakuje.

V případě pulzní laserové depozice<sup>40,41</sup> je standardně používán excimerový laser KrF (vlnová délka 248 nm) při hustotě energie dopadajícího svazku 2,5–5 J cm<sup>-2</sup> a frekvenci pulsů 5–10 Hz. Při depozici je teplota podložky buď laboratorní nebo zvýšená (400–500 °C). Připravené vrstvy jsou následně temperovány v kyslíku při teplotách cca 650 až 850 °C. Rovněž při přípravě vrstev SBT metodou magnetronového naprašování<sup>42,43</sup> se deponovaná vrstva následně tepelně zpracovává za vzniku požadované krystalické fáze. Původní amorfni vrstva se připravuje obvykle při laboratorní teplotě, přičemž jako zdroj se využívají terče SBT s mírně nadstechiometrickým obsahem Bi.

## 4. Termodynamická data

### 4.1. Základní termodynamické funkce pro čisté pevné látky a tuhé roztoky

Základní termodynamickou funkcí nezbytnou pro posouzení termodynamické stability jednotlivých fází a výpočty rovnovážného složení chemicky reagujících systémů je Gibbsova energie<sup>48</sup>. Gibbsova energie je extenzivní funkce a pro heterogenní systém tvořený *F* fázemi a *N* složkami ji vyjádříme vztahem:

$$G = \sum_{j=1}^F \sum_{i=1}^N n_{i(j)} \mu_{i(j)}(T, p, \mathbf{x}) \quad (1)$$

kde *n*<sub>*i(j)*</sub> jsou látková množství jednotlivých složek v *j*-té fázi,  $\mu_{i(j)}$  jejich chemické potenciály a vektor *x* značí složeni příslušné fáze (tuhého roztoku) vyjádřené molárními zlomky složek *x*<sub>*i(j)*</sub>. Při obvyklé volbě standardního stavu (čistá látka v dané strukturní modifikaci při teplotě systému *T* a tlaku systému *p*) platí pro chemický potenciál *i*-té složky ve fázi  $\phi$  vztah:

$$\mu_{i(\varphi)}(T, p, \mathbf{x}) = G_m^\circ(i(\varphi), T, p^\circ) + \int_{p^\circ}^p V_m(i(\varphi), T, p) dp + RT \ln a_{i(\varphi)}(T, p, \mathbf{x}) \quad (2)$$

První člen na pravé straně rovnice (2) je standardní molární Gibbsova energie čisté látky  $i$  ve fázi  $\varphi$  při teplotě systému  $T$  a pevné hodnotě tlaku  $p^\circ = 100$  kPa (standardní tlak). Druhý člen představuje změnu Gibbsovy energie čisté látky spojenou se změnou tlaku z hodnoty  $p^\circ$  na tlak systému  $p$ . Tento příspěvek lze u pevných látek v oboru nízkých a středních tlaků zanedbat: platí  $G_m^\circ(T, p^\circ) \approx G_m(T, p)$ , analogicky i pro další termodynamické funkce pevných látek. Aktivita  $a_{i(\varphi)}(T, p, \mathbf{x})$  vystupující v rovnici (2) jsou pro čisté látky rovny jedné, pro složky ideálních roztoků jsou rovny jejich molárním zlomkům. V případě reálných roztoků pro aktivitu  $i$ -té složky platí

$$a_{i(\varphi)}(T, p, \mathbf{x}) = x_{i(\varphi)} \gamma_{i(\varphi)}(T, p, \mathbf{x}) \quad (3)$$

Pro závislost aktivitních koeficientů  $\gamma_{i(\varphi)}$  na složení roztoku a teplotě (tlaková závislost je v případě tuhých roztoků zanedbatelná) byla navržena celá řada empirických či semiempirických vztahů, jejichž parametry lze obvykle získat pouze na základě experimentálních údajů.

Standardní molární Gibbsovy energie  $G_m^\circ(i)$  čistých pevných látek\*\* počítáme obvykle z dalších termodynamických funkcí – standardní slučovací entalpie při teplotě 298,15 K,  $\Delta_{\text{sl}}H^\circ(i, 298)$ , standardní molární entropie při teplotě 298,15 K,  $S_m^\circ(i, 298)$ , a teplotní závislosti standardní molární tepelné kapacity při stálém tlaku  $C_{\text{pm}}^\circ(i) = f(T)$  pomocí vztahu (4).

Pro termodynamické výpočty jsou tak nejdůležitější výše uvedené termodynamické funkce čistých látek ( $\Delta_{\text{sl}}H^\circ(i, 298)$ ,  $S_m^\circ(i, 298)$  a  $C_{\text{pm}}^\circ(i) = f(T)$ ) a parametry

vztahů pro vyjádření závislosti aktivitních koeficientů, resp. příslušné integrální funkce, tj. molární dodatkové Gibbsovy energie, na teplotě a složení roztoku.

V případě směsných oxidů bývají často jejich termodynamické funkce vyjádřeny jako změny, které doprovázejí vznik daného směsného oxidu z příslušných oxidů binárních,  $\Delta_{\text{ox}}Z$ . Vzniká-li směsný oxid  $A_aB_bO_z$  z binárních oxidů  $AO_x + BO_y$  reakcí:



pak platí vztahy (5).

#### 4.2. Experimentální metody pro stanovení termodynamických funkcí čistých pevných látek

Pro experimentální stanovení termodynamických funkcí čistých pevných látek se užívá řada metod, jejichž přehled podává např. monografie<sup>48</sup>. Dále jsou stručně zmíněny pouze nejdůležitější z nich užívané pro měření tepelných kapacit, relativních entalpií, slučovacích entalpií a slučovacích Gibbsových energií směsných oxidů.

Měření tepelných kapacit resp. relativních entalpií pevných látek lze provádět ve velmi širokém oboru teplot – od teploty  $T \rightarrow 0$  K až do teplot tání. Pro různé oblasti teplot se užívají různé typy kalorimetrů. V případě tepelně-pulzní (relaxační), adiabatické a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) jsou přímo měřeny hodnoty izobarické tepelné kapacity při různých teplotách. Teplotní závislost tepelné kapacity je pak získána matematickým zpracováním experimentálních dat. Pro obor teplot  $T > 298$  K se

$$G_m^\circ(i, T) = \Delta_{\text{sl}}H_m^\circ(i, 298) + \int_{298,15}^T C_{\text{pm}}^\circ(i) dT - T \left[ S_m^\circ(i, 298) + \int_{298,15}^T \frac{C_{\text{pm}}^\circ(i)}{T} dT \right] \quad (4)$$

$$\Delta_{\text{ox}}C_{\text{pm}}(A_aB_bO_z) = C_{\text{pm}}^\circ(A_aB_bO_z) - aC_{\text{pm}}^\circ(AO_x) - bC_{\text{pm}}^\circ(BO_y) \quad (5a)$$

$$\Delta_{\text{ox}}H(A_aB_bO_z) = \Delta_{\text{sl}}H^\circ(A_aB_bO_z) - a\Delta_{\text{sl}}H^\circ(AO_x) - b\Delta_{\text{sl}}H^\circ(BO_y) \quad (5b)$$

$$\Delta_{\text{ox}}S(A_aB_bO_z) = S^\circ(A_aB_bO_z) - aS^\circ(AO_x) - bS^\circ(BO_y) \quad (5c)$$

$$\Delta_{\text{ox}}G(A_aB_bO_z) = G^\circ(A_aB_bO_z) - aG^\circ(AO_x) - bG^\circ(BO_y) \quad (5d)$$

\*\* Vyznačení příslušné fáze ( $\varphi$ ) je pro zjednodušení zápisu dále vynecháno.

obvykle užívají empirické vztahy typu:

$$C_{pm} = A + BT + \frac{C}{T^2} + DT^2 + \frac{E}{T^3} \quad (6)$$

V oblasti nízkých teplot  $T < 298$  je teplotní závislost tepelných kapacit obvykle vyjádřena na základě teoretických modelů pro vibrační (mřížkový) příspěvek podle Einsteinova nebo Debyeova modelu a případně dalších členů (elektronický, magnetický, Schottkyho). Na základě nízkoteplotních měření tepelných kapacit lze stanovit hodnoty molárních entropií při teplotě 298,15 K integrací funkce  $C_{pm}/T$  v oboru teplot 0 až 298,15 K.

Metodou vzhazovací kalorimetrie je měřena relativní entalpie ( $\Delta H = H(T_2) - H(T_1)$ ), což je změna entalpie vzorku spojená se změnou jeho teploty z počáteční hodnoty  $T_1$  na konečnou hodnotu  $T_2$ . Při měření v určitém typu kalorimetru je vždy jedna z hodnot  $T_1$  nebo  $T_2$  stálá a druhou hodnotu měníme tak, abychom získali teplotní závislost  $\Delta H = f(T)$ . Z této závislosti získáme teplotní závislost tepelné kapacity derivací podle teploty.

Kalorimetrii lze rovněž využít pro stanovení slučovacích entalpií. V případě směsných oxidů se používá především rozpouštěcí kalorimetrie<sup>49,50</sup>. Principem metody je měření rozpouštěcího tepla příslušného směsného oxidu a mechanické směsi binárních oxidů, které daný směsný oxid tvoří. Z rozdílu rozpouštěcích tepele lze získat veličinu  $\Delta_{ox}H$ . Pro rozpouštění oxidů se užívají jednak vodné roztoky anorganických kyselin (HCl, HClO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>) a příslušná rozpouštěcí tepla se měří při mírně zvýšené teplotě (50 až 100 °C), jednak oxidické taveniny (2 PbO + B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 3 Na<sub>2</sub>O + 4 MoO<sub>3</sub>, LiBO<sub>3</sub> + NaBO<sub>3</sub>) pro měření při teplotách 700 až 900 °C.

Pro stanovení standardních slučovacích Gibbsových energií směsných oxidů z oxidů binárních se nejčastěji užívá měření elektromotorických napětí (EMN) galvanických článků s pevnými elektrolyty<sup>51</sup>. Principem je měření rozdílu chemických potenciálů kyslíku mezi pracovní a referenční elektrodou, které jsou odděleny vhodným pevným elektrolytem. Tento rozdíl je úměrný změřenému elektromotorickému napětí článku ( $E$ ) a platí:

$$E = \frac{1}{zF} (\mu_{O_2}'' - \mu_{O_2}') = \frac{RT}{zF} \ln \frac{p_{O_2}''}{p_{O_2}'} \quad (7)$$

Jako elektrolyt se nejčastěji užívají ZrO<sub>2</sub> dotovaný (stabilizovaný) Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> resp. CaO nebo CaF<sub>2</sub>. Jako referenční elektroda se užívá soustava s dobře definovaným chemickým potenciálem kyslíku, např. Pt/O<sub>2</sub>(g) nebo směsi prvků a jejich oxidů Ni/NiO, Cu/Cu<sub>2</sub>O aj. Měření je obvykle prováděno za zvýšené teploty a výsledkem je teplotní závislost  $\Delta_{ox}G$ . Analýzou této závislosti lze pro daný směsný oxid získat hodnoty  $\Delta_{ox}H$  (resp.  $\Delta_{sl}H^\circ$ ) a  $\Delta_{ox}S$  (resp.  $S^\circ_m$ ).

#### 4.3. Odhadové metody

V literatuře byla popsána řada empirických metod, kterých lze užít pro odhady termodynamických dat pevných látek<sup>52</sup>. Další metody byly vyvinuty speciálně pro silikáty a jiné minerály, které jsou ve většině případů směsnými oxidy tvořenými základními oxidy K<sub>2</sub>O-Na<sub>2</sub>O-CaO-MgO-FeO-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-MnO-TiO<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> (cit.<sup>53–56</sup>).

Metody vhodné pro odhad molárních tepelných kapacit směsných oxidů při teplotě 298,15 K testovali Leitner a spol.<sup>57</sup>. Jako univerzální metoda s nepřesností cca 3,3 % bylo vyhodnoceno Neumannovo-Koppovo pravidlo (NKR), podle kterého se tepelná kapacita směsného oxidu vypočítá jako lineární kombinace tepelných kapacit konstitučních binárních oxidů. Některé výsledky<sup>58,59</sup> však ukazují, že predikce tepelné kapacity na základě NKR selhává buď v oblasti velmi nízkých teplot a/nebo naopak při vysokých teplotách (viz část 5.2.).

Pro odhad standardních slučovacích entalpií resp. hodnot  $\Delta_{ox}H$  bylo navrženo několik metod, avšak tyto metody jsou buď málo přesné nebo jsou omezeny na skupiny chemicky a strukturně příbuzných látek. Nejobecnější metody navržené Aronsonem<sup>60</sup> a Zhuangem a spol.<sup>61</sup> vycházejí z Paulingova vztahu mezi slučovací entalpií a rozdílem elektronegativit prvků v sloučenině. Zatímco v případě směsných oxidů CaO-MgO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>-ZrO<sub>2</sub> poskytuje Aronsonova metoda dobré výsledky<sup>60</sup>, v jiných případech, např. pro směsné oxidy typu Ln<sub>4</sub>Al<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, LnAlO<sub>3</sub> a Ln<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub> (Ln = lanthanoid), tato metoda narost selhává<sup>62</sup>.

Pro odhad molární entropie při 298,15 K lze užít některou z příspěvkových metod<sup>52</sup> nebo korelaci mezi molární entropií a objemem vztaženým na vzorcovou jednotku ( $S$ - $V$  korelace) navrženou Jenkinsem a Glaserem<sup>63,64</sup>. Zatímco příspěvkové metody obvykle predikují hodnotu  $\Delta_{ox}S = 0$  (analogie s NKR), korelace  $S$ - $V$  poskytuje přijatelné výsledky a její použití pro odhad molární entropie směsných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> je ukázáno v části 5.3.

#### 4.4. Výpočty *ab-initio*

Metody výpočtu termodynamických vlastností z prvních principů (*ab-initio*) založené převážně na teorii funkcionálu elektronové hustoty (DFT) nabývají na významu, a to jak s rozvojem příslušných výpočetních algoritmů, tak i výkonnosti počítačové techniky. Pro krystalické látky se při výpočtu elektronové struktury používají jako báze pro konstrukci vlnové funkce rovinné vlny (PW). Metody (L)APW využívají k popisu vlnové funkce v blízkém okolí atomového jádra rozvoje do sférických harmonik násobených radiální složkou (navázaných na PW v určité vzdálenosti od jádra), přičemž krystalový potenciál je uvažován bez jakýchkoliv aproximací (např. program Wien2k (cit.<sup>65</sup>)). Oproti tomu takzvané pseudopotenciálové metody pracují s „umělým“ pseudopotenciálem zkonstruovaným specificky pro každý prvek. Pro popis výměnně-korelačního potenciálu je dnes v metodách DFT

nejčastěji používána aproximace gradientu elektronové hustoty (GGA)<sup>66</sup>.

Produktem každého výpočtu elektronové struktury na bázi DFT je celková energie systému vztažená buď k referenčnímu stavu atomových jader a volných elektronů, nebo ke stavu korových zbytků a volných valenčních elektronů. Spočítáme-li tuto celkovou energii pro danou látku a její stavební prvky v termodynamickém standardním stavu, dostáváme slučovací entalpii (resp. energii) při nulové teplotě. Oprava získané hodnoty na běžně používanou referenční teplotu (298,15 K) obvykle není velká (typicky v řádu jednotek kJ mol<sup>-1</sup>, což je běžná chyba vlastního výpočtu celkové energie) a vyžaduje spočítat pro všechny zúčastněné látky teplotní závislost jejich tepelné kapacity v intervalu 0–298,15 K.

Specifický problém představuje existence některého prvku v plynném stavu. Jelikož získané hodnoty energií jsou nepřevoditelné mezi různými výpočetními programy (např. Gaussian používaný převážně pro molekuly a Wien2k využívající LAPW pro krystaly), je nutné v programech pro systémy s translační symetrií simulovat izolované neinteragující molekuly (nebo atomy) jejich umístěním do uzlů umělé krystalové mřížky s extrémně velkým mřížovým parametrem. Alternativně lze pro získání hodnoty celkové energie molekuly daného prvku (O<sub>2</sub>) využít známých termodynamických dat nějakého binárního oxidu. Spočítáme-li například celkové energie krystalického CaO a Ca a známe přitom dostatečně přesně slučovací entalpii  $\Delta_{sl}H^\circ(\text{CaO})$  (nejlépe korigovanou na teplotu  $T = 0$  K), můžeme z těchto dat vypočítat celkovou energii molekuly O<sub>2</sub>. Pro směsné oxidy lze navíc aplikovat odlišný referenční stav a počítat namísto standardních slučovacích entalpií  $\Delta_{sl}H^\circ$  slučovací tepla z oxidů  $\Delta_{ox}H$ . V případě směsných oxidů niobu a tantalu však vykazují vlastní binární oxidy značné množství strukturně složitých polytypů, z nichž některé ani nelze považovat za chemická individua (náhodně rozmístěné vakance ve specifických polohách kationtů), což činí výpočet jejich elektronové struktury značně složitým.

## 5. Termodynamická data směsných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

### 5.1. Přehled literatury

Akishige a spol.<sup>67</sup> měřili teplotní závislost tepelných kapacit monokrystalických vzorků Sr<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a Sr<sub>2</sub>Ta<sub>2</sub>O<sub>7</sub> v oboru teplot 2–600 K. Výsledky jsou prezentovány graficky, hodnoty  $S_m(298)$  nejsou v práci uvedeny. V případě Sr<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> byla při teplotě  $T_{INC} = 495$  K pozorována fázová transformace druhého řádu související se změnou souměřitelnosti ortorombické struktury ( $\lambda$ -přechod) doprovázená změnou entalpie  $\Delta H = 291$  J mol<sup>-1</sup> a entropie  $\Delta S = 0,587$  J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. Tepelnou kapacitu Sr<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> v oboru teplot 375–575 K měřili rovněž Shabbir a spol.<sup>68</sup>. Výsledky jsou prezentovány pouze graficky, zjištěné parametry

fázové transformace jsou  $T_{INC} = 487 \pm 2$  K,  $\Delta H = 147 \pm 14$  J mol<sup>-1</sup> a  $\Delta S = 0,71 \pm 0,10$  J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.

Onodera a spol.<sup>69–71</sup> měřili teplotní závislosti tepelných kapacit SBT a Sr<sub>0,85</sub>Bi<sub>2,1</sub>Ta<sub>2</sub>O<sub>9</sub> v oboru teplot 80 až 800 K. Pro měření užívali polykrystalické i monokrystalické vzorky a rovněž tenkou vrstvu tloušťky cca 180 nm depozovanou na Pt/Ti/SiO<sub>2</sub> substrátu. Výsledky jsou prezentovány pouze graficky. Výsledky měření teplotní závislosti molární tepelné kapacity SrBi<sub>2</sub>(Nb<sub>x</sub>Ta<sub>1-x</sub>)<sub>2</sub>O<sub>9</sub> pro  $x = 0, 1/3, 2/3$  a 1 publikovali rovněž Morimoto a spol.<sup>72</sup>. Také jejich výsledky jsou prezentovány pouze graficky. Teplotní závislosti  $C_{pm}$  vykazují anomální průběh ( $\lambda$ -přechod) s maximem při Curieho teplotě  $T_C = 297 \pm 1$  °C,  $312 \pm 2$  °C,  $352 \pm 3$  °C a  $417 \pm 2$  °C pro  $x = 0, 1/3, 2/3$  a 1.

Na základě měření EMN galvanických článků z CaF<sub>2</sub> elektrolytem stanovil Raghavan hodnoty  $\Delta_{ox}G$  pro vybrané niobáty<sup>73,74</sup> a tantaláty<sup>75,76</sup> vápníku. Získané výsledky jsou shrnuty v tab. II. Stejnou experimentální techniku pro stanovení teplotní závislosti  $\Delta_{ox}G$  pro CaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub> a Ca<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> užívali rovněž Dneprova a spol.<sup>77</sup>. Jejich výsledky uvedené v tab. II se od výsledků Raghavana výrazně liší.

Yang a spol.<sup>78</sup> užívali tzv. postup Calphad<sup>79</sup> k vyhodnocení termodynamických dat jednotlivých fází a jejich složek v systému SrO-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Na základě fázového diagramu tohoto systému stanovili teplotní závislosti  $\Delta_{ox}G = A + BT$  pro směsné oxidy Sr<sub>2</sub>Nb<sub>10</sub>O<sub>27</sub>, SrNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, Sr<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a Sr<sub>5</sub>Nb<sub>4</sub>O<sub>14</sub> (viz tab. II). Na základě stejného přístupu vyhodnotili Hallstedt a spol. termodynamická data pro směsné oxidy v systémech CaO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (cit.<sup>4</sup>) a SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (cit.<sup>5</sup>). Vedle rovnovážných  $T-x$  dat byla při optimalizaci uvažována i termodynamická data jednotlivých směsných oxidů získaná na základě kalorimetrických měření<sup>80</sup>. Systémy CaO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> byly následně studovány Jacobem a Jayadevanem<sup>81,82</sup> a na základě měření EMN byly stanoveny teplotní závislosti  $\Delta_{ox}G$  pro směsné oxidy a tuhé roztoky daného složení. Tato nová data byla zohledněna při reoptimalizaci termodynamického popisu uvedených systémů<sup>83</sup> (viz tab. II). V téže práci jsou rovněž uvedena data pro směsné oxidy Bi<sub>4</sub>Sr<sub>6</sub>O<sub>15</sub> a Bi<sub>2</sub>Sr<sub>6</sub>O<sub>11</sub>, ve kterých je bismut pětimocný a jejich vznik nelze zapsat reakcí mezi SrO a Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Teplotní závislosti molárních tepelných kapacit a hodnoty  $S_m(298)$  pro řadu směsných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> publikovali Leitner a spol.<sup>84–91</sup> (viz tab. III). Pro měření tepelných kapacit v oblasti nízkých teplot (2–300 K) byla užitá metoda tepelně-pulzní kalorimetrie a v oblasti kolem laboratorní teploty (250 až 360 K) metoda DSC. Pro měření relativních entalpií (670 až 1470 K) byla užitá metoda vřazovací kalorimetrie. Experimentální data byla zpracována ve dvou krocích. V prvním kroku byla simultánně zpracována  $C_{pm}$  data z obou typů měření (LT fit). Teplotní závislost  $C_{pm}$  v oboru teplot 0–300 K byla vyjádřena jako kombinace Debyeovy a Einsteinovy rovnice pro fononový příspěvek  $C_{ph}$  (v případě látek bez volných elektronů platí  $C_{ph} = C_{vm}$ ) v harmonickém přiblížení s empirickou korekcí na anharmonicitu a dilataci krystalové mřížky:



Tabulka II

Hodnoty  $\Delta_{\text{ox}}G$ ,  $\Delta_{\text{ox}}H$  a  $\Delta_{\text{ox}}S$  pro vybrané směsné oxidy v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Fáze	$\Delta_{\text{ox}}G$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$T$ [K]	$\Delta_{\text{ox}}H$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta_{\text{ox}}S$ [J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	Poznámka	Lit.
CaNb <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	$-75,82 - 0,03345T$	1245–1300	-75,82	33,45	EMN	73
Ca <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	-178,44	1256			EMN	74
Ca <sub>3</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	-209,94	1256			EMN	74
CaTa <sub>4</sub> O <sub>11</sub>	$-36,982 - 0,029T$	1250–1300	-36,98	29,0	EMN	75
CaTa <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	-65,14	1250			EMN	76
Ca <sub>2</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	-102,82	1250			EMN	76
Ca <sub>4</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	-165,05	1250			EMN	76
CaNb <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	$-175,73 + 0,02259T$	1100–1276	-175,73	-22,59	EMN	77
Ca <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	$-212,54 - 0,02218T$	1100–1350	-212,54	22,18	EMN	77
Sr <sub>2</sub> Nb <sub>10</sub> O <sub>27</sub>	$-1125,69 + 0,35069T$	298–5000	-1125,69	-350,69	optimalizace	78
SrNb <sub>2</sub> O <sub>6</sub> <sup>a</sup>	$-325,04 + 0,05865T$	298–5000	-325,04	-58,65	optimalizace	78
Sr <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	$-367,43 + 0,03993T$	298–5000	-367,43	-39,93	optimalizace	78
Sr <sub>5</sub> Nb <sub>4</sub> O <sub>14</sub>	$-746,72 + 0,05101T$	298–5000	-746,72	-51,01	optimalizace	78
Bi <sub>14</sub> Ca <sub>5</sub> O <sub>26</sub>	$-125,90 - 0,055T$	298–	-125,9	55,0	optimalizace	83
Bi <sub>2</sub> CaO <sub>4</sub>	$-27,60 - 0,003T$	298–	-27,6	3,0	optimalizace	83
Bi <sub>6</sub> Ca <sub>4</sub> O <sub>13</sub>	$-97,60 - 0,008T$	298–	-97,6	8,0	optimalizace	83
Bi <sub>2</sub> Ca <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	$-42,20 - 0,003T$	298–	-42,2	3,0	optimalizace	83
Bi <sub>2</sub> SrO <sub>4</sub>	$-63,86 - 0,0018T$	298–	-63,86	1,8	optimalizace	83
Bi <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	$-118,75 + 0,024T$	298–	-118,75	-24,0	optimalizace	83
Bi <sub>2</sub> Sr <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	$-109,60 + 0,0024T$	298–	-109,60	-2,4	optimalizace	83

<sup>a</sup> Fáze SrNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub> byla popsána na základě podmřížkového modelu jako roztok s deficitem Nb o stechiometrii (Sr<sup>2+</sup>)(Nb<sup>5+</sup>, Va)<sub>2</sub>(O<sup>2-</sup>, Va)<sub>6</sub>

$$C_{\text{ph}} = C_{\text{phD}} + \sum_{i=1}^{3n-3} C_{\text{phEi}} \quad (8)$$

$$C_{\text{phD}} = \frac{9R}{1-\alpha_{\text{D}}T} \left( \frac{T}{\Theta_{\text{D}}} \right)^3 \int_0^{x_{\text{D}}} \frac{x^4 \exp(x)}{[\exp(x)-1]^2} dx, \quad x_{\text{D}} = \frac{\Theta_{\text{D}}}{T} \quad (9)$$

$$C_{\text{phEi}} = \frac{R}{1-\alpha_{\text{Ei}}T} \cdot x_{\text{Ei}}^2 \frac{\exp(x_{\text{Ei}})}{[\exp(x_{\text{Ei}})-1]^2}, \quad x_{\text{Ei}} = \frac{\Theta_{\text{Ei}}}{T} \quad (10)$$

Parametry rovnic (9) a (10) ( $\Theta_{\text{D}}$ ,  $\alpha_{\text{D}}$ ,  $\Theta_{\text{Ei}}$ ,  $\alpha_{\text{Ei}}$ ) byly získány iteračním postupem, v průběhu kterého byly metodou „trial-and-error“ stanoveny počty a degenerace jednotlivých Debyeových a Einsteinových módů a metodou nelineární regrese určeny jejich hodnoty. Tyto hodnoty byly užity pro zpětný výpočet tepelných kapacit pro obor teplot 0–298,15 K (v intervalu po 1 K). Z vypočtených dat  $C_{\text{pm}}$  byly numerickou integrací funkce  $C_{\text{pm}}/T = f(T)$  v mezích 0 až 298,15 K získány hodnoty molárních entropií  $S_{\text{m}}(298)$ .

Získané výsledky jsou shrnuty v tab. III. V této tabulce jsou dále uvedeny vypočtené hodnoty  $\Delta_{\text{ox}}C_{\text{pm}}$  a  $\Delta_{\text{ox}}S_{\text{m}}$  spojené se vznikem daného směsného oxidu z příslušných oxidů binárních.

V druhém kroku byla simultánně zpracována  $C_{\text{pm}}$  data z měření DSC a relativní entalpie (HT fit). Metodou lineární regrese byly určeny hodnoty koeficientů  $A$ , ...,  $E$  teplotní závislosti  $C_{\text{pm}}$  dle rovnice (6). V případě, kdy hodnoty  $C_{\text{pm}}(298)$  vypočtené z LT fitu a HT fitu se lišily o více než 2 %, byla při zpracování vysokoteplotních dat užita vazná podmínka zohledňující hodnotu  $C_{\text{pm}}(298)$  z LT fitu. Získané parametry teplotní závislosti  $C_{\text{pm}}$  pro studované směsné oxidy jsou uvedeny v tab. III.

## 5.2. Možnosti použití Neumannova-Koppova pravidla pro odhad teplotní závislosti tepelných kapacit

Empirické Neumannovo-Koppovo pravidlo (NKR) bylo postulováno před více než 140 lety na základě velmi obsáhlého souboru experimentálních  $C_p$  dat pevných látek

Tabulka III

Hodnoty molárních tepelných kapacit, entropií a parametry teplotních závislostí molárních tepelných kapacit (6) vybraných směsných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Fáze	$C_{pm}(298)$	$\Delta_{ox}C_{pm}(298)$	$S_m(298)$	$\Delta_{ox}S_m(298)$	$C_{pm} = A + BT + \frac{C}{T^2} + \frac{E}{T^3}$				Lit.
	[J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	[J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	[J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	[J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$A$	$10^3 B$	$10^{-6} C$	$10^{-8} E$	
CaBi <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	151,3	-2,9	188,5	1,9	157,161	38,750	-1,546		84
Ca <sub>4</sub> Bi <sub>6</sub> O <sub>13</sub>	504,1	-0,5	574,1	-23,8	550,808	114,890	-7,201		84
Ca <sub>2</sub> Bi <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	197,4	1,2	231,3	6,6	226,096	33,374	-3,432		84
CaNb <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	171,8	-2,4	167,3	-8,1	200,40	34,32	-3,45		85
Ca <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	218,1	1,9	212,4	-1,1	257,20	36,21	-4,435		86
SrNb <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	170,2	-7,1	173,9	-17,0	200,47	29,37	-3,473		87
Sr <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	216,6	-5,8	238,5	-5,9	248,00	43,50	-3,948		86
Sr <sub>2</sub> Nb <sub>10</sub> O <sub>27</sub>	746,8	-4,1	759,7	-33,9	835,351	227,648	-13,904		88
Sr <sub>5</sub> Nb <sub>4</sub> O <sub>15</sub>	477,2	-12,7	524,1	-18,8	504,796	147,981	-6,376		88
BiNbO <sub>4</sub>	121,3	-0,8	147,9	5,0	128,628	33,400	-1,991	1,363	89
BiNb <sub>5</sub> O <sub>14</sub>	386,8	0,4	397,2	-20,3	455,840	60,160	-7,734		90
BiTaO <sub>4</sub>	119,3	-2,5	149,1	3,3	133,594	25,390	-2,734	2,360	89
SrBi <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	286,4	-3,0	327,2	-12,2	324,470	63,710	-5,076		91
SrBi <sub>2</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	286,6	-2,2	339,2	-5,9	320,220	64,510	-4,700		91

získaných Koppem<sup>92</sup> a dalšími badateli. Matematicky lze NKR formulovat takto: Vzniká-li pevná sloučenina A<sub>a</sub>B<sub>b</sub> z pevných prvků A a B reakcí



pak podle NKR platí

$$C_{pm}(A_aB_b, s) = aC_{pm}(A, s) + bC_{pm}(B, s) \quad (12)$$

$$\Delta C_p = C_{pm}(A_aB_b, s) - aC_{pm}(A, s) - bC_{pm}(B, s) = 0 \quad (13)$$

NKR bylo hned od počátku předmětem značného zájmu badatelů. Meyer<sup>93</sup> ukázal, že NKR je splněno pro ty pevné sloučeniny, jejichž molární objem je přibližně roven sumě atomárních objemů prvků, které danou sloučeninu tvoří. Dle Meyera dále platí  $C_{pm}(\text{sloučenina}) > \Sigma C_{pat}(\text{prvky})$  pokud  $V_m(\text{sloučenina}) > \Sigma V_{at}(\text{prvky})$  a naopak. Obecná platnost těchto relací byla později zpochybněna<sup>94</sup> a pro některé pevné sloučeniny byly zjištěny vztahy opačné.

Pro predikci tepelných kapacit komplexních sloučenin bylo NKR modifikováno<sup>57,59</sup>. Pro odhad  $C_{pm}$  ternární sloučeniny A<sub>a</sub>B<sub>b</sub>C<sub>z</sub>, která vzniká reakcí binárních sloučenin AC<sub>x</sub> a BC<sub>y</sub>:

$$aAC_x(s) + bBC_y(s) = A_aB_bC_z(s), \quad z = ax + by \quad (14)$$

platí:

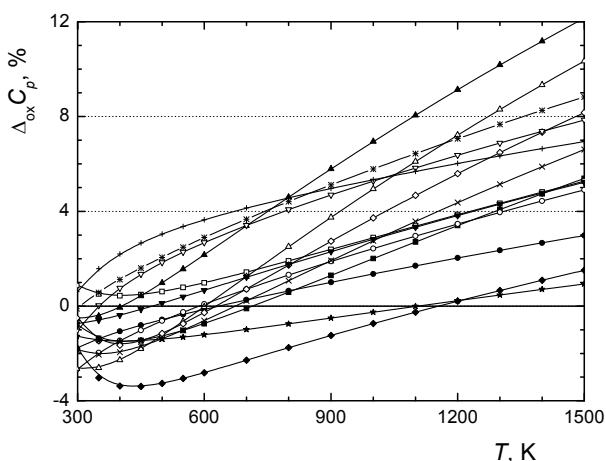
$$C_{pm}(A_aB_bC_z, s) = aC_{pm}(AC_x, s) + bC_{pm}(BC_y, s) \quad (15)$$

$$(16)$$

$$\Delta C_p = C_{pm}(A_aB_bC_z, s) - aC_{pm}(AC_x, s) - bC_{pm}(BC_y, s) = 0$$

Přechod od prvků A, B a C k binárním sloučeninám AC<sub>x</sub> a BC<sub>y</sub> jednak zvyšuje spolehlivost odhadu, jednak rozšiřuje aplikační možnosti v případech, kdy některý z prvků není při příslušné teplotě a tlaku v pevném stavu (např. komplexní halogenidy, oxidy, nitridy atd.).

Na základě porovnání experimentálních hodnot  $C_{pm}$  (298) a hodnot odhadnutých pomocí NKR pro více než 300 směsných oxidů ukázali Leitner a spol.<sup>57</sup>, že při laboratorní teplotě poskytuje NKR data s průměrnou chybou 3,3 %. V řadě dalších prací však bylo zjištěno, že v případě nízkých nebo naopak velmi vysokých teplot je predikce dat  $C_p$  pomocí NKR zatížena výrazně vyšší chybou. Možnosti odhadu teplotní závislosti tepelné kapacity směsných oxidů podrobně diskutovali Leitner a spol.<sup>95</sup>. Na základě provedeného rozboru lze konstatovat, že NKR



Obr. 1. Teplotní závislost  $\Delta_{\text{ox}}C_p$  pro směsné oxidy v systému **CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>**; ■ CaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, □ Ca<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, ● SrNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, ○ Sr<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, ▲ Sr<sub>2</sub>Nb<sub>10</sub>O<sub>27</sub>, △ Sr<sub>5</sub>Nb<sub>14</sub>O<sub>15</sub>, ◆ BiTaO<sub>4</sub>, ◇ BiNbO<sub>4</sub>, ▼ SrBi<sub>2</sub>Ta<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, ▽ SrBi<sub>2</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, + Bi<sub>2</sub>Ca<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, × Bi<sub>2</sub>CaO<sub>4</sub>, \* Bi<sub>6</sub>Ca<sub>4</sub>O<sub>18</sub>, ★ BiNb<sub>5</sub>O<sub>14</sub>

přibližně platí v okolí laboratorní teploty v případech, kdy k celkové hodnotě tepelné kapacity binárních oxidů i směsného oxidu přispívá pouze harmonický vibrační a dilatační člen. Při výrazně nižších teplotách je nenulová hodnota  $\Delta_{\text{ox}}C_p$  spojena s neaditivitou harmonického příspěvku v důsledku změny vibračních frekvencí při vzniku směsného oxidu. Při výrazně vyšších teplotách je nenulovost  $\Delta_{\text{ox}}C_p$  dána rozdílem dilatačních členů  $C_{\text{dil}} = TV_m\alpha^2/\beta$  v důsledku objemové kontrakce či dilatace, které obvykle vznik směsného oxidu doprovázejí a dále změnou koeficientů objemové roztažnosti ( $\alpha$ ) a stlačitelnosti ( $\beta$ ).

Výsledky našich měření<sup>84–91</sup> jsou souhrnně uvedeny na obr. 1. Lze konstatovat, že při teplotě 298,15 K NKR celkem dobře predikuje hodnoty  $C_{pm}$  s průměrnou chybou 1,2 % srovnatelnou s chybou kalorimetrických měření. Z hodnot  $\Delta_{\text{ox}}C_p(298)$  pro 15 směsných oxidů je 13 hodnot záporných. S rostoucí teplotou  $\Delta_{\text{ox}}C_p$  buď monotónně roste nebo prochází minimem a dále roste, přičemž nad teplotou 1200 K jsou již všechny hodnoty  $\Delta_{\text{ox}}C_p$  kladné a odchylky experimentálních hodnot od odhadnutých na základě NKR dosahují až 10 %.

#### Tabulka IV

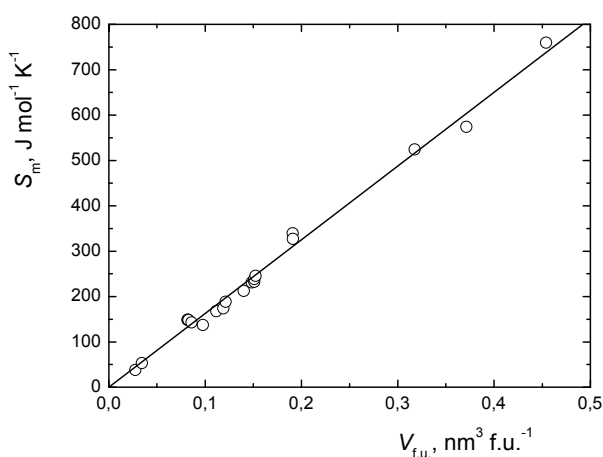
Standardní molární entropie a objemy vztažené na vzorcovou jednotku vybraných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Oxid	$V_{f.u.}$ [nm <sup>3</sup> f.u. <sup>-1</sup> ]	$S_{m,exp}^{\circ}(298)$ [J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$S_{m,calc}^{\circ}(298)$ [J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\delta$ (%) <sup>a</sup>
Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,08173	148,5	132,9	-10,5
CaO	0,02760	38,1	44,9	17,8
SrO	0,03435	53,6	55,9	4,2
Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,09778	137,3	159,0	15,8
Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,08588	143,1	139,6	-2,4
Bi <sub>2</sub> Ca <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,14854	231,3 (cit. <sup>84</sup> )	241,5	4,4
Bi <sub>2</sub> CaO <sub>4</sub>	0,12128	188,5 (cit. <sup>84</sup> )	197,2	4,6
Bi <sub>6</sub> Ca <sub>4</sub> O <sub>13</sub>	0,37126	574,1 (cit. <sup>84</sup> )	603,7	5,1
BiNbO <sub>4</sub>	0,08270	147,9 (cit. <sup>89</sup> )	134,5	-9,1
BiTaO <sub>4</sub>	0,08212	149,1 (cit. <sup>89</sup> )	133,5	-10,5
CaNb <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	0,11170	167,3 (cit. <sup>85</sup> )	181,6	8,5
Ca <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,14021	212,4 (cit. <sup>86</sup> )	228,0	7,3
SrNb <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	0,11889	173,9 (cit. <sup>87</sup> )	193,3	11,2
Sr <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,15111	232,4 (cit. <sup>67</sup> )	245,7	5,7
Sr <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,15111	238,5 (cit. <sup>86</sup> )	245,7	3,0
Sr <sub>2</sub> Nb <sub>10</sub> O <sub>27</sub>	0,45390	759,7 (cit. <sup>88</sup> )	738,04	-2,9
Sr <sub>5</sub> Nb <sub>4</sub> O <sub>15</sub>	0,31645	524,1 (cit. <sup>88</sup> )	514,55	-1,8
Sr <sub>2</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,15237	245,4 (cit. <sup>67</sup> )	247,8	1,0
SrBi <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	0,19110	327,2 (cit. <sup>91</sup> )	310,7	-5,0
SrBi <sub>2</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	0,19087	339,2 (cit. <sup>91</sup> )	310,4	-8,5

<sup>a</sup>  $\delta = 100(\text{calc.} - \text{exp.})/\text{exp.}$

### 5.3. Empirická korelace $S$ - $V$ a její použití pro odhad molárních entropií

Získané hodnoty  $S_m^\circ(298)$  byly využity k posouzení empirické korelace mezi molární entropií oxidů a jejich objemem vztaheným na vzorcovou jednotku  $V_{f.u.}$ , kterou pro pevné látky navrhli Jenkins a Glasser<sup>63,64</sup>. Vstupní data pro korelaci jsou shrnuta v tab. IV (cit.<sup>86</sup>). Při analýze byly uvažovány pouze kalorimetrické údaje (hodnoty entropie získané integrací funkce  $C_{pm}/T$  vs.  $T$  v oboru teplot 0 až 298,15 K), protože hodnoty získané analýzou vysokoteplotních rovnovážných dat jsou méně přesné. Výsledky jsou uvedeny v tab. IV a na obr. 2. Lineární závislost korelovaných veličin, která přirozeně prochází počátkem je zřejmá:  $S_m(298) = 1625,4 \times V_{f.u.}$ ,  $R^2 = 0,99$ . Průměrná relativní chyba zpětně vypočtených hodnot  $S_m(298)$  je však 7,0 %, což je přibližně třikrát více než chyba experimentální. Pro porovnání lze rovněž vypočítat hodnoty  $S_m(298)$  směsných oxidů z dat pro oxidy binární za předpokladu, že  $\Delta_{ox}S = 0$  (analogie NKR). V případě uvažovaného souboru 15 směsných oxidů je průměrná relativní chyba 4,0 %.



Obr. 2. Korelace mezi molární entropií a objemem vztaheným na vzorcovou jednotku vybraných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; ○ experimentální hodnoty, — vypočtená závislost z regresní funkce  $S_m(298) = 1625,4 V_{f.u.}$  (koeficient determinace  $R^2 = 0,99$ )

## 6. Závěr

Závěrem lze konstatovat, že soubor experimentálně získaných termodynamických dat pro směsné oxidy v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> není zdaleka kompletní. Odhadnuté či teoreticky vypočtené (*ab-initio*) hodnoty doposud nedosahují požadované přesnosti, což komplikuje, ne-li zcela vylučuje, provádět věrohodné termodynamické výpočty za účelem modelování procesů přípravy a zpracování těchto progresivních materiálů.

## Seznam symbolů a zkratk

$a_i$	aktivita $i$ -té složky
$C_{pm}^\circ$	standardní molární tepelná kapacita za stálého tlaku
$C_{Vm}$	molární tepelná kapacita za stálého objemu
$C_{ph}$	mřížkový příspěvek k tepelné kapacitě
$C_{dil}$	dilatační příspěvek k tepelné kapacitě
$\Delta_{ox}C_p$	změna tepelné kapacity při vzniku směsného oxidu z oxidů binárních
$E$	elektromotorické napětí
$F$	Faradayova konstanta ( $F = 96\,485\text{ C mol}^{-1}$ )
$G$	Gibbsova energie
$G_m^\circ$	standardní molární Gibbsova energie
$\Delta_{ox}G$	slučovací Gibbsova energie z binárních oxidů (změna Gibbsovy energie při vzniku směsného oxidu z oxidů binárních)
$\Delta_{sl}H^\circ$	standardní slučovací entalpie (z prvků)
$\Delta_{ox}H$	slučovací entalpie z binárních oxidů (změna entalpie při vzniku směsného oxidu z oxidů binárních)
$n_i$	látkové množství $i$ -té složky
$p$	tlak
$p(\text{O}_2)$	parciální tlak kyslíku
$R$	univerzální plynová konstanta ( $R = 8,314\text{ J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ )
$S_m^\circ$	standardní molární entropie
$\Delta_{ox}S$	slučovací entropie z binárních oxidů (změna entropie při vzniku směsného oxidu z oxidů binárních)
$T$	teplota
$T_C$	Curieova teplota
$T_{INC}$	teplota fázové transformace druhého řádu související se změnou souměřitelnosti struktury
$V_m$	molární objem
$x_D$	bezrozměrná proměnná definovaná vztahem $x_D = \Theta_D/T$
$x_{Ei}$	bezrozměrná proměnná definovaná vztahem $x_{Ei} = \Theta_{Ei}/T$
$x_i$	molární zlomek $i$ -té složky
$z$	počet vyměněných nábojů
$\alpha$	koeficient izobarické objemové roztažnosti
$\alpha_D$	empirický korekční parametr v rámci Debyeova modelu mřížkového příspěvku tepelné kapacity (rovnice (9))
$\alpha_{Ei}$	empirický korekční parametr v rámci Einsteinova modelu mřížkového příspěvku tepelné kapacity (rovnice (10))
$\beta$	koeficient izotermní objemové stlačitelnosti
$\gamma_i$	aktivitní koeficient $i$ -té složky
$\mu_i$	chemický potenciál $i$ -té složky
$\Theta_D$	Debyeova charakteristická teplota
$\Theta_{Ei}$	Einsteinova charakteristická teplota
CBN	CaBi <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>9</sub>
CBT	CaBi <sub>2</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>9</sub>
DFT	„Density Functional Theory“

DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
EMN	elektromotorické napětí galvanického článku
FeRAM	„Ferroelectric Random Access Memory”
FET	„Field Effect Transistor”
GGA	„Generalized Gradient Approximation”
hfac	1,1,1,5,5,5-hexafluoroacetylacetonat
LAPW	„Linearized Augmented Plane Wave”
MFIS	„Metal Ferroelectric Insulator Semiconductor”
MOCVD	„Metallorganic Chemical Vapour Deposition”
MOD	„Metallorganic Decomposition”
PLD	„Pulsed Laser Deposition”
RAM	„Random Access Memory”
SBN	SrBi <sub>2</sub> Nb <sub>2</sub> O <sub>9</sub>
SBT	SrBi <sub>2</sub> Ta <sub>2</sub> O <sub>9</sub>
thd	2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptandionat

*Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky (grant č. 104/07/1209) a Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty č. MSM6046137302, MSM6046137307 a MSM0021620834).*

## LITERATURA

- Paz de Araujo C. A., Cuchiaro J. D., McMillan L. D., Scott M. C., Scott J. F.: *Nature* 374, 627 (1995).
- Roth R. S. (ed.): *Phase Diagrams for Electronic Ceramics I: Dielectric Ti, Nb, and Ta Oxide Systems*. NIST-ACerS, Westerville, Ohio 2003.
- Hallstedt B., Gauckler L. J.: *Physica C* 406, 189 (2004).
- Hallstedt B., Risold D., Gauckler L. J.: *J. Am. Ceram. Soc.* 80, 2629 (1997).
- Hallstedt B., Risold D., Gauckler L. J.: *J. Am. Ceram. Soc.* 80, 1085 (1997).
- Roth R. S., Waring J. L.: *J. Res. NBS – A. Phys. Chem.* 66A, 451 (1962).
- Roth R. S., Waring J. L.: *Am. Miner.* 48, 1348 (1963).
- Ling C. D., Thompson J. G., Withers R. L., Schmid S.: *J. Solid State Chem.* 142, 33 (1999).
- Huang C.-L., Weng M.-H.: *Mater. Lett.* 43, 32 (2000).
- Castro A., Palem D.: *J. Mater. Chem.* 12, 2774 (2002).
- Muthurajan H., Gupta U. N., Rituraj B., Koteswara Rao N., Pradhan S., Radha R., Ravi V.: *Mater. Lett.* 62, 501 (2008).
- Castro A., Aguado E., Rojo J. M., Herrero P., Enjalbert R., Galy J.: *Mater. Res. Bull.* 33, 31 (1998).
- Valant M., Suvorov D.: *J. Am. Ceram. Soc.* 86, 939 (2003).
- Zhou D., Wang H., Yao X.: *J. Am. Ceram. Soc.* 90, 327 (2007).
- Keve E. T., Skapski A. C.: *J. Chem. Soc. A* 9, 1280 (1971).
- Strakhov V. I., Mel'nikova O. V., Ipatov V. V., Karpinskaya O. V.: *Zh. Prikl. Khim.* 69, 850 (1996).
- Ling C. D., Withers R. L., Schmid S., Thompson J. G.: *J. Solid State Chem.* 137, 42 (1998).
- Pirnat U., Valant M., Jančar B., Suvorov D.: *Chem. Mater.* 17, 5155 (2005).
- Fujioka C., Aoyagi R., Takeda H., Okamura S., Shiosaki T.: *J. Eur. Ceram. Soc.* 25, 2723 (2005).
- Jain R., Gupta V., Sreenivas K., Mansingh A.: *Ferroelectrics* 324, 153 (2005).
- Viapiana M., Schwitters M., Wouters D. J., Maes H. E., van der Biest O.: *Mater. Sci. Eng., B* 118, 34 (2005).
- Chen X. M., Hu G. L., Yang J. S.: *J. Eur. Ceram. Soc.* 20, 1257 (2000).
- Das R. R., Pérez W., Katiyar R. S., Bhalla A. S.: *J. Raman Spectrosc.* 33, 219 (2002).
- Sun L., Feng C., Chen L., Huang S., Wen X.: *Mater. Sci. Eng., B* 135, 60 (2006).
- Rao C. N. R., Raveau B.: *Transition Metal Oxides*, 2. vyd. Wiley-VCH, New York 1998.
- Babooram K., Ye Z.-G.: *Chem. Mater.* 18, 532 (2006).
- Ravi V., Navale S. C.: *Ceram. Inter.* 32, 475 (2006).
- Muthurajan H., Gupta U. N., Rituraj B., Koteswara Rao N., Pradhan S., Radha R., Ravi V.: *Mater. Lett.* 62, 501 (2008).
- Ishizawa N., Marumo F., Kawamura T., Kimura M.: *Acta Cryst., B* 32, 2564 (1976).
- Ishizawa N., Marumo F., Iwai S., Kimura M., Kawamura T.: *Acta Cryst., B* 36, 763 (1980).
- Subramanian M. A., Calabrese J. C.: *Mater. Res. Bull.* 28, 523 (1993).
- Daniels P., Tamazyan R., Kuntscher C. A., Dressel M., Lichtenberg F., van Smaalen S.: *Acta Cryst., B* 58, 970 (2002).
- Amorin H., Costa M. E. V., Kholkin A. L., Baptista J. L.: *J. Eur. Ceram. Soc.* 24, 1535 (2004).
- Lindner J., Schumacher M., Dauelsberg M., Schienle F., Miedl S., Burgess D., Merz E., Strauch G., Jürgensen H.: *Adv. Mater. Opt. Electron.* 10, 163 (2000).
- Wright P. J., Crosbie M. J., Lane P. A., Williams D. J., Jones A. C., Leedham T. J., Davies H. O.: *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* 13, 671 (2002).
- Schwarzkopf J., Fornari R.: *Prog. Cryst. Growth Character. Mater.* 52, 159 (2006).
- Moert M., Schindler G., Mikolajick T., Nagel N., Hartner W., Dehm C., Kohlstedt H., Waser R.: *Appl. Surf. Sci.* 249, 23 (2005).
- Simões A. Z., Ramírez M. A., Riccardi C. S., Gonzalez A. H. M., Longo E., Varela J. A.: *Mater. Chem. Phys.* 98, 203 (2006).
- Yoo D. C., Lee J. Y., Kim I. S., Kim Y. T.: *J. Cryst. Growth* 259, 79 (2003).
- Tomov R. I., Blamire M.: *Plasma Process. Polym.* 3, 241 (2006).
- Ortega N., Bhattacharya P., Katiyar R. S.: *Mater. Sci. Eng., B* 130, 36 (2006).

42. Zhang S., Li Y., Fei W., Gan Z., Mhaisalkar S., Li X. M.: *J. Vacuum Sci. Technol.*, A 24, 1992 (2006).
43. Li Y. B., Zhang S., Fei W. D., Gan Z. H., Mhaisalkar S.: *Adv. Appl. Ceram.* 106, 180 (2007).
44. Shin D. S., Choi H. S., Kim Y. T., Choi I.-H.: *J. Cryst. Growth* 209, 1009 (2000).
45. Isobe C., Hironaka K., Hishikawa S.: *Adv. Mater. Opt. Electron.* 10, 183 (2000).
46. Funakubo H., Ishikawa K., Watanabe T., Mitsuya M., Nukaga N.: *Adv. Mater. Opt. Electron.* 10, 193 (2000).
47. Condorelli G. G., Favazza M., Bedoya C., Baeri A., Anastasi G., Lo Nigro R., Menou N., Muller C., Lisoni J. G., Wouters D., Fragala I. L.: *Chem. Mater.* 18, 1016 (2006).
48. Kubaschewski O., Alcock C. B., Spencer P. J.: *Materials Thermochemistry*, 6. vyd. Pergamon Press, 1993.
49. Marsh K. N., O'Hare P. A. G. (ed.): *Experimental Thermodynamics Vol. IV: Solution Calorimetry*, Blackwell, Oxford 1994.
50. Navrotsky A.: *Phys. Chem. Minerals* 24, 222 (1997).
51. Mallika C., Sreedhara O. M., Subasri R.: *J. Eur. Ceram. Soc.* 20, 2297 (2000).
52. Spencer P. J.: *Thermochim. Acta* 314, 1 (1998).
53. Holland T. J. B.: *Am. Mineral.* 74, 5 (1989).
54. Chermak J. A., Rimstidt J. D.: *Am. Mineral.* 74, 1023 (1989).
55. Chermak J. A., Rimstidt J. D.: *Am. Mineral.* 75, 1376 (1989).
56. Van Hinsberg V. J., Vriend S. P., Schumacher J. C.: *J. Metamorph. Geol.* 23, 165 (2005).
57. Leitner J., Chuchvalec P., Sedmidubský D., Strejc A., Abrman P.: *Thermochim. Acta* 395, 27 (2003).
58. Richet P., Fiquet G.: *J. Geophys. Res.* 96, 445 (1991).
59. Qiu L., White M. A.: *J. Chem. Educ.* 78, 1076 (2001).
60. Aronson S.: *J. Nucl. Mater.* 107, 343 (1982).
61. Zhuang W., Liang J., Qiao Z., Shen J., Shi Y., Rao G.: *J. Alloys Compd.* 267, 6 (1998).
62. Voňka P., Leitner J.: *J. Solid State Chem.* 182, 744 (2009).
63. Jenkins H. D. B., Glaser L.: *Inorg. Chem.* 42, 8702 (2003).
64. Jenkins H. D. B., Glaser L.: *Inorg. Chem.* 45, 1754 (2006).
65. Blaha P., Schwarz K., Madsen G. K. H., Kvasnicka D., Luitz J.: *WIEN2k, An Augmented Plane Wave + Local Orbitals Program for Calculating Crystal Properties*, Universität Wien, Wien 2001.
66. Perdew J. P., Burke S., Ernzerhof M.: *Phys. Rev. Lett.* 77, 3865 (1996).
67. Akishige Y., Shigematsu H., Tojo T., Kawaji H., Atake T.: *J. Therm. Anal. Calorim.* 81, 537 (2005).
68. Shabbir G., Kojima S.: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, 1036 (2003).
69. Onodera A., Yoshio K., Myint C. C., Kojima S., Yamashita H., Takama T.: *Jpn. J. Appl. Phys.* 38, 5683 (1999).
70. Onodera A., Yoshio K., Myint C. C., Tanaka M., Hironaka K., Kojima S.: *Ferroelectrics* 241, 159 (2000).
71. Yoshio K., Onodera A., Yamashita H.: *Ferroelectrics* 284, 65 (2003).
72. Morimoto K., Sawai S., Hisano K., Yamamoto T.: *Ferroelectrics* 227, 133 (1999).
73. Raghavan S.: *Trans. Indian Inst. Met.* 44, 285 (1991).
74. Raghavan S.: *J. Alloys Compd.* 179, L25 (1992).
75. Raghavan S.: *Indian J. Technol.* 29, 313 (1991).
76. Raghavan S.: *J. Alloys Compd.* 189, L39 (1992).
77. Dneprova V. G., Rezukhina T. N., Gerasimov Ya. I.: *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 178, 135 (1968).
78. Yang Y., Yu H., Jin Z.: *J. Mater. Sci. Technol.* 15, 203 (1999).
79. Saunders N., Miodownik A. P.: *Calphad (Calculation of phase diagrams): A comprehensive guide*, Pergamon Materials Series, Vol. 1., Pergamon 1998.
80. Idemoto Y., Shizuka K., Yasuda Y., Fueki K.: *Physica C* 211, 36 (1993).
81. Jacob K. T., Jayadevan K. P.: *Mater. Trans. JIM* 38, 427 (1997).
82. Jacob K. T., Jayadevan K. P.: *J. Mater. Res.* 13, 1905 (1998).
83. Hallstedt B., Gauckler L.: *CALPHAD* 27, 177 (2003).
84. Abrman P., Sedmidubský D., Strejc A., Voňka P., Leitner J.: *Thermochim. Acta* 381, 1 (2002).
85. Leitner J., Růžička K., Sedmidubský D., Svoboda P.: *J. Therm. Anal. Calorim.* 95, 397 (2009).
86. Leitner J., Hampl M., Růžička K., Straka M., Sedmidubský D., Svoboda P.: *Thermochim. Acta* 475, 33 (2008).
87. Leitner J., Hampl M., Růžička K., Straka M., Sedmidubský D., Svoboda P.: *J. Therm. Anal. Calorim.* 91, 985 (2008).
88. Leitner J., Šipula I., Růžička K., Sedmidubský D., Svoboda P.: *J. Alloys Compd.* 481, 35 (2009).
89. Hampl M., Strejc A., Sedmidubský D., Růžička K., Hejtmánek J., Leitner J.: *J. Solid State Chem.* 179, 77 (2006).
90. Hampl M., Leitner J., Růžička K., Straka M., Svoboda P.: *J. Therm. Anal. Calorim.* 87, 553 (2007).
91. Leitner J., Hampl M., Růžička K., Sedmidubský D., Svoboda P., Vejpravová J.: *Thermochim. Acta* 450, 105 (2006).
92. Kopp H.: *Phil. Trans. Royal Soc. London* 155, 71 (1865).
93. Meyer S.: *Ann. Phys.* 2, 135 (1900).
94. van Aubel E.: *Ann. Phys.* 4, 420 (1901).
95. Leitner J., Voňka P., Sedmidubský D., Svoboda P.: *Thermochim. Acta* 497, 7 (2010).

**J. Leitner<sup>a</sup>, M. Hampl<sup>a</sup>, D. Sedmidubský<sup>b</sup>, K. Růžička<sup>c</sup>, and P. Svoboda<sup>d</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Solid State Engineering*, <sup>b</sup> *Department of Inorganic Chemistry*, <sup>c</sup> *Department of Physical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*, <sup>d</sup> *Department of Condensed Matter Physics, Faculty of Physics and Mathematics, Charles University, Prague*): **Thermodynamic Properties of Mixed Oxides in the CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> System**

A review on stoichiometric mixed oxides in the CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system. Some of the oxides find applications as materials for electronics. Various processes

for preparation of the oxides, both in the bulk form (polycrystalline powders, single crystals) and as thin-layer materials, are described. Experimental methods of determination of thermodynamic properties of the mixed oxides are treated and possibilities of obtaining missing data using empirical estimation methods or theoretical calculations are mentioned. The values of fundamental thermodynamic functions given in literature are collected. Applications of the additive Neumann-Kopp rule in estimation of temperature dependences of heat capacities and empirical entropy-volume correlations as well as in prediction of molar entropies of mixed oxides are discussed.



## 19. CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ KONFERENCE S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

### APROCHEM 2010

TECHNOLOGIE • ROPA • PETROCHEMIE • POLYMERY • BEZPEČNOST • PROSTŘEDÍ  
19. – 21. DUBEN 2010 • KOUTY NAD DESNOU • JESENÍKY • HOTEL DLOUHÉ STRÁNĚ

PCHE • APROCHEM 2010 • Na Dračkách 13, 162 00 Praha 6 • Tel/Fax: 220 518 698  
Mobil: 607 671 866 • E-mail: [pche@csvts.cz](mailto:pche@csvts.cz) • [www.aprochem.cz](http://www.aprochem.cz)  
Připravuje PCHE s ČSPCH, ČSCH, ČSCHI, VŠCHT Praha, SCHP ČR, ÚCHP AV ČR.

### ODPADOVÉ FÓRUM 2010

5. ROČNÍK ČESKO-SLOVENSKÉHO SYMPOSIA  
VÝSLEDKY VÝZKUMU A VÝVOJE PRO ODPADOVÉ HOSPODÁŘSTVÍ  
21. – 23. DUBEN 2010 • KOUTY NAD DESNOU • HOTEL DLOUHÉ STRÁNĚ

Připravuje CEMC – České ekologické manažerské centrum, Jevanská 12, 100 31 Praha 10  
Tel.: 274 784 448, 723 950 237 • Fax: 274 775 869 • E-mail: [symposium@cemc.cz](mailto:symposium@cemc.cz) • [www.odpadoveforum.cz](http://www.odpadoveforum.cz)

V RÁMCI OBOU AKCÍ DOPROVODNÁ TECHNICKÁ VÝSTAVKA.  
FIREMNÍ PREZENTACE A LOGA V TIŠTĚNÝCH MATERIÁLECH I NA CD ROM.

2. Cirkulář s Odborným programem a Přihláškou účasti vyjde koncem února 2010.  
Přihlášky účasti budou žádány do 31. 3. 2010.

Registrace na jedné z akcí umožní účast na obou za výhodných podmínek.  
Nepřehlédněte prosím nové místo konání v Koutech n.D., Jeseníky. Sledujte web.

**Zveme Vás k účasti a těšíme se na společné setkání.**

## CENA MERCK

### 13. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu firmy Merck 2010“

V úterý 2. února 2010 úspěšně proběhl v prostorách přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích již 13. ročník soutěže mladých analytických chemiků „O cenu firmy Merck“. Tuto soutěž letos výborně zorganizovali kolegové z Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity ve spolupráci s Odbornou skupinou analytické chemie České společnosti chemické za tradiční a účinné podpory firmy Merck spol. s r.o. Význam této akce podtrhlo i její slavnostní zahájení děkanem přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity panem profesorem Liborem Grubhoffferem. Všech 18 účastníků z deseti předních analytických pracovišť v České republice příkladným způsobem prezentovalo své výsledky, které jednoznačně přispívají nejen k výchově nastupující generace analytických chemiků, ale i k úspěšnému rozvoji této disciplíny v našem státě. Kvalita prezentací bezesporu snesla i náročné světové měřítko a všichni soutěžící důstojně reprezentovali vysílající pracoviště. Autor tohoto příspěvku by rád všem soutěžícím bez ohledu na jejich konečné umístění poděkoval za dobře odvedenou práci.

1. místo získal **Bc. Štěpán Eichler** z Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha za práci *Speciální analýza selenu v moči spojením HPLC A ICP/MS*, 2. místo získala **Bc. Oksana Yosypchuk** z Katedry analytické chemie PŘF UK v Praze za práci *Elektrochemická detekce karcinogenních derivátů pyrenu a jejich metabolitů* a 3. místo získal **Bc. Martin Švidrnoch** z Katedry analytické chemie PŘF UP v Olomouci za práci *Identifikace biologicky aktivních látek v krevní stopě na pevném povrchu hmotnostní spektrometrií*.

Vzhledem k mimořádné kvalitě všech soutěžních prací se porota navíc rozhodla udělit tři mimořádné ceny poroty a to **Bc. Kateřině Diákové** z Katedry biologie ekosystémů PŘF JU v Českých Budějovicích za práci *Analytická chemie v hodnocení alternativních systémů pro čištění odpadních vod*, **Bc. Janu Přechovi** z Ústavu organické technologie VŠCHT v Praze za práci *In-situ NMR studie mechanismu asymetrické hydrogenace substituovaných dihydroisochinolinů na Ru-katalyzátorech Noyoriho typu* a **Bc. Kateřině Ježkové** z Katedry analytické chemie FCHT Univerzity Pardubice za práci *Analýza kyseliny L-askorbové v nápojích s využitím techniky MEPS*.

Navzdory pověrám se pořadové číslo 13 nijak neprojevilo a soutěž byla zorganizována naprosto dokonale



Vítězové soutěže „O cenu firmy Merck 2010“. Zleva Mgr. Rudolf Vodička náměstek primátora Statutárního města České Budějovice, RNDr. Renata Švajdová, Ph.D., Bc. Štěpán Eichler z VŠCHT Praha (1. místo), Bc. Oxana Yosypchuk z PŘF UK v Praze (2. místo), Bc. Martin Švidrnoch z PŘF UP v Olomouci (3. místo), prof. RNDr. Libor Grubhofffer, CSc., děkan PŘF JU v Českých Budějovicích a předseda poroty

a proběhla ve vynikající atmosféře. Za to patří dík celému týmu kolegů z Jihočeské univerzity, jmenovitě prof. RNDr. Liboru Grubhoffferovi, CSc., Mgr. Janu Štěrbovi, doc. RNDr. Františku Váchovi, PhD., doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. a RNDr. Janu Šimovi, PhD. Vyvrcholení v podobě ocenění vítězů proběhlo ve fascinujících prostorách českobudějovické radnice, s jejíž historií i půbavou závidět jihočeským kolegům jejich nádhernou spoluprací s vedením města, která má k místní univerzitě příkladný vztah, který jí většina ostatních vysokých škol v našem státě může jen závidět. Vyhlášení výsledků bylo následováno příjemným posezením v tradiční budějovické restauraci Masné krámy s její neopakovatelnou atmosférou. Dík všem účastníkům patří pochopitelně i firmě Merck a jejím zástupcům přítomným na soutěži, jmenovitě Ing. Lence Ungrmanové, Bc., Ing. Marcele Kubáskové a RNDr. Renatě Švajdové, PhD., která také zasedla v odborné porotě.

Na závěr nezbývá než sdělit, že 14. ročník této soutěže se uskuteční na Přírodovědecké fakultě Univerzity Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem v únoru 2011 a těšit se, že bude stejně úspěšný a příjemný jako ročník letošní.

Jiří Barek



## KONFORMAČNÍ STUDIE POLY- $\gamma$ -BENZYL-L-GLUTAMÁTU METODOU VIBRAČNÍHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU

PAVLÍNA NOVOTNÁ<sup>a\*</sup> a MARIE URBANOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, <sup>b</sup> Ústav fyziky a měřicí techniky, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
pavlina.novotna@vscht.cz

Došlo 5.5.09, přijato 25.1.01.

Klíčová slova: poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamát), konformace, vibrační cirkulární dichroismus

### Úvod

Polypeptidy jsou významné látky zejména díky jejich blízkému vztahu k proteinům. Kromě chemického složení jsou unikátní a různorodé vlastnosti proteinů dány především terciální a sekundární strukturou jejich řetězce a pořadím a počtem aminokyselin v řetězci. Polypeptid poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamát) (PBLG) je rozpustný v organických rozpouštědlech, je chirální a jeho konformace a agregační stav jsou výrazně závislé na použitém rozpouštědle a koncentraci roztoku. Představuje tak velmi dobrou modelovou matici pro studium biologicky významných interakcí v závislosti na použitém rozpouštědle a tím i na struktuře použité chirální matrice. Právě chiralita je důležitou vlastností charakterizující živé organismy. Biologicky významné molekuly jsou často chirální a jejich funkce je chiralitou určena. Sledování systémů, jako např. PBLG v různých rozpouštědlech, vede k bližšímu pochopení konformačních a agregačních změn přírodních polypeptidů či proteinů.

Chirální molekuly absorbují v různé míře levotočivé a pravotočivé cirkulárně polarizované záření. Cirkulární dichroismus je definován jako rozdíl absorbance vlevo a vpravo cirkulárně polarizovaného záření. Při použití záření v infračervené oblasti spektra dochází k přechodům mezi vibračními hladinami molekuly a jde tedy o vibrační cirkulární dichroismus (VCD)<sup>1</sup>. Intenzita signálu VCD je běžně o 4–6 řádů nižší než příslušná absorpce.

Přestože byly vlastnosti syntetických polypeptidů charakterizovány řadou fyzikálně-chemických metod, nabízí VCD alternativní pohled na PBLG s výhodami proti běžnějšímu elektronovému cirkulárnímu dichroismu

(ECD), infračervené (IČ) spektroskopii a dalším metodám. Výhody metody VCD jsou diskutovány v souborných zpracováních tématu<sup>1,2</sup>.

Pro konformační a agregační stav PBLG je důležitá polarita a kyselost rozpouštědla. V rozpouštědlech, jako chloroform, benzen či nitrobenzen, zaujímá PBLG  $\alpha$ -helikální konformaci<sup>3</sup>, která je stabilizována intramolekulárními vodíkovými můstky. Tvoří se také intermolekulární vodíkové vazby<sup>4,5</sup> a molekuly tak asociují za vzniku agregátů. Roztok PBLG má pak z tohoto důvodu velmi vysokou viskozitu – převládá interakce polymer-polymer nad interakcí polymer-rozpouštědlo. Po překročení kritické koncentrace vznikají v těchto roztocích chirální struktury, tzv. cholesterolické kapalné krystaly<sup>6</sup>. Molekuly jsou ve vrstvách orientovány takovým způsobem, že jejich osy jsou rovnoběžné, ale v každé vrstvě je osa molekul oproti osám molekul v předchozí vrstvě pootočená. Tak vzniká helikální struktura – superhelix, vykazující vysokou optickou aktivitu<sup>6</sup>, která vysvětluje velmi silný signál VCD pozorovaný u cholesterolických krystalů.

V silně kyselých rozpouštědlech, jako je trifluoroctová kyselina (TFA), naopak molekuly PBLG neasociují a PBLG nabývá konformace polyprolinu II (PPII)<sup>7</sup>. Velký význam zde mají především sekundární interakce mezi rozpouštědlem a polypeptidovými řetězci<sup>7</sup>. Konformace PPII byla dříve označována jako statistické klubko (random coil). ECD<sup>2</sup> a VCD<sup>8</sup> studie prokázaly, že jde o lokálně pravidelnou strukturu tvořenou levotočivými úseky helixu.

V této práci jsou metodou VCD doplněnou o IČ absorpční spektroskopii charakterizovány zmíněné konformace, sledována agregace a hledány podmínky pro existenci různých konformačních forem PBLG v roztoku.

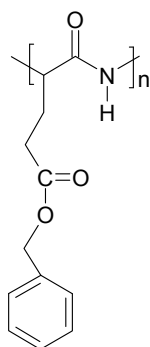
### Experimentální část

#### Materiály a metody

Pro tuto práci byl použit poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamát) (obr. 1) s průměrnou molekulovou hmotností 69 000 (Sigma), tedy polymer střední délky řetězce. K přípravě roztoků byla použita deuterovaná rozpouštědla chloroform (CDCl<sub>3</sub>) (Isosar), benzen (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) (Isosar) a nitrobenzen (C<sub>6</sub>D<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>) (Sigma), a nedeuterovaná rozpouštědla chloroform (Lachner) a trifluoroctová kyselina (Penta).

Spektrální měření byla prováděna na infračerveném spektrometru s Fourierovou transformací IFS-66/S (Bruker, Německo) v oblasti 1800–1400 cm<sup>-1</sup> s rozlišením 8 cm<sup>-1</sup>. Postup měření na tomto přístroji a nastavení parametrů měření byly popsány již dříve<sup>9,10</sup>. Spektra VCD jsou průměrem ze 6 bloků, každý měřený 20 minut. Před a po měření VCD byla změřena absorpční spektra pro kontrolu

\* Pavlína Novotná získala 1. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou práci v oboru analytická chemie.

Obr. 1. Strukturální vzorec poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamátu)

stálosti a homogenity studovaného vzorku. V některých uvedených spektrech byly vynechány spektrální oblasti s vysokou absorbcí rozpouštědel, která vede u slabých signálů VCD ke vzniku nežádoucích artefaktů kvůli nedostatečné energii dopadající na detektor. VCD spektra byla korigována na nulovou linii, kterou představovala spektra příslušných rozpouštědel měřených za stejných podmínek jako roztoky vzorků. Absorpční spektra byla také korigována na signál rozpouštědla.

Byly použity skládané kyvety tvořené okny z  $\text{CaF}_2$  a teflonovou distanční fólií o tloušťce 50  $\mu\text{m}$  (25  $\mu\text{m}$  pro kapalné krystaly).

#### Příprava roztoků

Roztoky PBLG v  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$  a směsném rozpouštědle  $\text{CHCl}_3/\text{TFA}$  byly měřeny pro hmotnostní koncentraci  $\rho = 30 \text{ g l}^{-1}$ , objemové zlomky TFA ve směsných rozpouštědlech měly hodnoty 0,05; 0,1; 0,15 a 0,20. Kapalné krystaly byly připraveny z roztoku polypeptidu v  $\text{C}_6\text{D}_6$  o koncentraci 50  $\text{g l}^{-1}$ . V tomto případě byl vysoce viskózní roztok nanesen přímo na spodní okno kyvety do prostoru vymezeného teflonovou fólií, kde se odpařil zbytek rozpouštědla, a tak byla dosažena koncentrace nutná k vytvoření krystalů. Potom byla kyveta sestavena běžným způsobem.

## Výsledky a diskuse

### Asociované formy PBLG

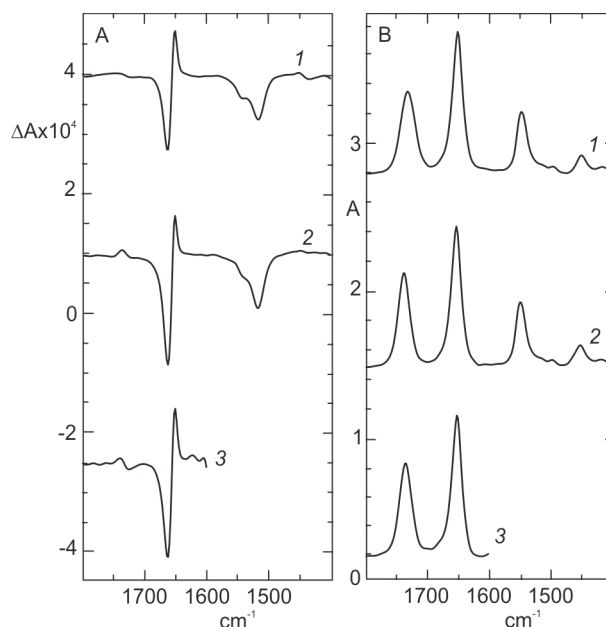
Na obr. 2 jsou VCD a absorpční spektra PBLG v  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{C}_6\text{D}_6$  a  $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$ . Přes některé odlišnosti mají spektra obdobný průběh – pozitivní VCD couplet v oblasti amidu I se středem u 1650  $\text{cm}^{-1}$ , který je charakteristický pro konformaci  $\alpha$ -helixu<sup>11</sup>. Vzhledem k citlivosti spekter VCD na strukturu<sup>1,2</sup> mají pozorované spektrální odchylky své strukturální příčiny, které je možné interpretovat:

V  $\text{C}_6\text{D}_6$  je negativní signál coupletu v oblasti amidu I

intenzivnější než v  $\text{CDCl}_3$ . Zesílení tohoto pásu je patrné i ve spektru PBLG v  $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$ . V roztocích  $\text{C}_6\text{D}_6$  a  $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$  se objevuje nový pozitivní VCD signál při 1736  $\text{cm}^{-1}$ , navíc je patrné i zesílení intenzity tohoto pásu v absorpčním spektru.

Větší intenzita negativního signálu coupletu amidu I ve srovnání s pozitivním signálem je patrná u všech tří roztoků a je pravděpodobně projevem interakce mezi šroubovicemi, neboť signál charakteristický pro neporušený  $\alpha$ -helix ukazuje na vyrovnanost obou pásů coupletu<sup>9</sup>. Zvýšená intenzita záporného signálu pro roztoky v  $\text{C}_6\text{D}_6$  a  $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$  ukazuje buď na jiný způsob agregace šroubovic než v roztoku  $\text{CDCl}_3$ , nebo na významnější agregaci, kterou je možno předpokládat na základě pozorovaného růstu viskozity roztoku polypeptidu v  $\text{C}_6\text{D}_6$  ve srovnání s roztokem v  $\text{CDCl}_3$ .

Pozorovaná změna poměru intenzit obou složek coupletu odráží mírnou deformaci skeletu  $\alpha$ -helixu, která pravděpodobně probíhá při agregaci doprovázené tvorbou intermolekulárních vodíkových můstků mezi jednotlivými řetězci PBLG. V  $\text{C}_6\text{D}_6$  a  $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$  je tato interakce ještě zesílena přítomností benzenových kruhů v rozpouštědle. Solvatační efekt  $\text{C}_6\text{D}_6$  a  $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$  je tak jiný než u  $\text{CDCl}_3$  a pravděpodobně podporuje vznik  $\pi$ - $\pi$  interakcí. Důsledkem těchto interakcí je pak pozorovaný pozitivní VCD signál při 1736  $\text{cm}^{-1}$  v obou spektrech a zvýšení intenzity tohoto signálu v absorpčním spektru. Signál VCD u 1736  $\text{cm}^{-1}$  byl pozorován dříve pro roztoky PBLG v  $\text{C}_6\text{D}_6$  a interpretován jako důsledek chirálního uspořádání



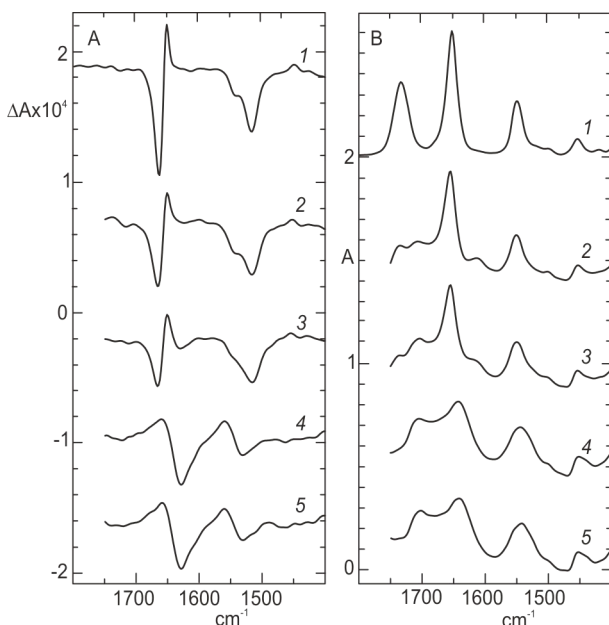
Obr. 2. VCD (A) a absorpční (B) IČ spektra asociovaných forem PBLG v  $\text{CDCl}_3$  (1), v  $\text{C}_6\text{D}_6$  (2) a v  $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$  (3). Spektra jsou normalizována na jednotkovou hodnotu absorbance pásu amidu I

ní polypeptidové matrice a C=O skupiny esteru v postranních řetězcích polypeptidu<sup>12,13</sup>. Ve spektru PBLG v CDCl<sub>3</sub> tento signál není patrný. V C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> a C<sub>6</sub>D<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> jsou totiž benzylové kruhy v postranních řetězcích PBLG výše uvedenými interakcemi více stabilizovány než v CDCl<sub>3</sub>. Nemohou se již tedy volně otáčet kolem esterové vazby (CO-O), změni se chiralita molekuly, a to se projeví na zesílení signálu charakteristického pro C=O v esterové skupině<sup>12,13</sup>. Důsledkem větší agregace PBLG v C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> než v CDCl<sub>3</sub> je i vznik kapalných krystalů PBLG v C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> při nižších koncentracích PBLG než v roztoku CDCl<sub>3</sub>.

#### Závislost struktury PBLG na složení směšného rozpouštědla CDCl<sub>3</sub>/TFA

Na obr. 3 jsou uvedena spektra PBLG v CHCl<sub>3</sub> a ve směšném rozpouštědle CHCl<sub>3</sub>/TFA o různém obsahu TFA. Pro tato měření byla použita nedeuterovaná rozpouštědla, protože v deuterovaných rozpouštědlech za přítomnosti TFA probíhala v molekule PBLG výměna H-D.

S postupným zvyšováním obsahu této kyseliny v rozpouštědlech se mění absorpční i VCD spektra. Intenzita absorpčního pásu u 1733 cm<sup>-1</sup> se s přidáním kyseliny snižuje. Naopak přibližně současně narůstá intenzita pásu při 1702 cm<sup>-1</sup>. S prvním přidáním kyseliny se také objevuje nový pás při 1612 cm<sup>-1</sup> a mírně se snižuje hodnota absorbance pásu amidu I. Ve spektrech VCD lze ovšem pozorovat výraznější změny. Zvyšováním obsahu TFA v rozpouštědle do 10 obj.% se intenzity pásů coupletu v oblasti amidu I vyrovnávají a intenzity pásu amidu II při



Obr. 3. VCD (A) a absorpční (B) spektra PBLG v CHCl<sub>3</sub> (1) a ve směšném rozpouštědle CHCl<sub>3</sub>/TFA – 5 obj.% TFA (2), 10 obj.% TFA (3), 15 obj.% TFA (4) a 20 obj.% TFA (5)

1516 cm<sup>-1</sup> se mírně snižují. Při obsahu TFA 15 obj.% se změni znaménka pásů coupletu amidu I a pás se posune k nižším vlnočtům – střed coupletu z 1654 na 1646 cm<sup>-1</sup>. Současně se posouvá i poloha absorpčního pásu z 1652 na 1641 cm<sup>-1</sup>. Mezi obsahy 10 a 15 obj.% TFA se také měni tvar VCD pásu amidu II a jeho absorpční pás se posouvá z 1548 na 1541 cm<sup>-1</sup>.

Změny intenzit absorpčních pásů 1733 a 1702 cm<sup>-1</sup> lze vysvětlit následovně. V obou případech jde o vibraci vazby C=O skupiny esteru v postranním řetězci polypeptidu. Tato skupina interaguje s TFA vodíkovými můstky<sup>14</sup>, čímž se posune poloha příslušného charakteristického pásu ze 1733 cm<sup>-1</sup> na 1702 cm<sup>-1</sup>. S rostoucím obsahem kyseliny roste intenzita pásu u nižších vlnočtů, zatímco intenzita pásu u vyšších vlnočtů klesá.

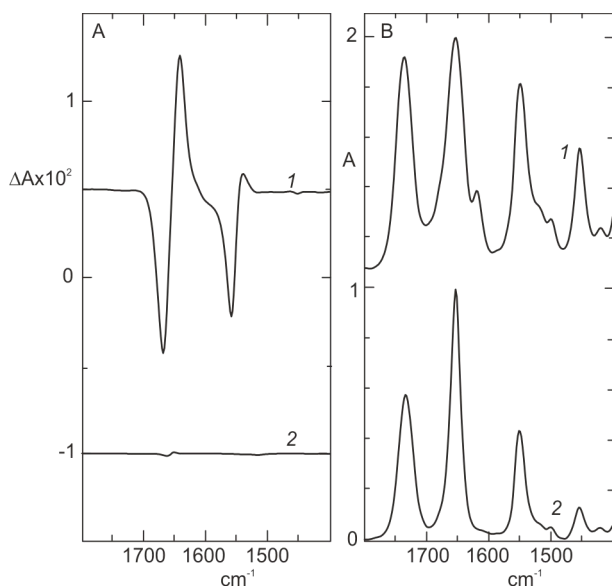
Nový pás při 1612 cm<sup>-1</sup> a malé snížení intenzity pásu amidu I je důsledkem vzniku vodíkových můstků mezi TFA a skupinou C=O v hlavním řetězci. TFA však neinteraguje se všemi skupinami C=O, ale pouze s dostupnými. To je důvodem malé intenzity tohoto pásu<sup>14</sup>.

Vyrovnání intenzity coupletu amidu I a snížení intenzity amidu II ve spektru VCD je pravděpodobně spojeno s klesající agregací jednotlivých šroubovic. Mnohem více polární a kyselá rozpouštědla TFA zabráňují asociaci tím, že konkurují tvorbě intermolekulárních vodíkových můstků mezi molekulami PBLG. Tato interpretace je v souladu s pozorovanou změnou konzistence vzorku. Při obsahu 10 obj.% TFA v rozpouštědle je viskozita vzorku nízká, molekuly PBLG tedy pravděpodobně výrazně neasociují, PBLG šroubovice je neporušená agregací a pozorovaná intenzita negativního a pozitivního pásu coupletu amidu I je stejná.

Při obsahu 15 obj.% TFA v rozpouštědle se měni znaménka pásů coupletu amidu I a pás se posouvá. Pozorované změny lze vysvětlit změnou konformace pravotočivého  $\alpha$ -helixu na strukturu PPII charakterizovanou jako lokální levotočivou šroubovici<sup>8</sup>. Protože se lokálně měni smysl šroubovice z pravotočivé na levotočivou, měni se i znaménka VCD pásů. Posun středu coupletu souvisí jak se změnou konformace, tak s vodíkovými můstky mezi TFA a C=O skupinami hlavního řetězce. Při určitém obsahu kyseliny, která původně interaguje především s C=O v postranních řetězcích, se totiž vlivem těchto interakcí rozruší struktura šroubovice a TFA může interagovat i s většinou skupin C=O v hlavním řetězci polypeptidu. Zároveň se měni i jeho konformace na PPII. To je doprovázeno i posunem absorpčního pásu spektra, který se díky vodíkovým můstkům objevuje při 1641 cm<sup>-1</sup>, tedy při nižším vlnočtu než je typické pro konformaci PPII.

Spektra VCD se měni i v oblasti amidu II při 1516 cm<sup>-1</sup>. Pro vzorky s obsahem TFA mezi 10 a 15 obj.% se změni celý tvar pásu. Zároveň se posouvá i pás v absorpčním spektru. Tyto změny jsou opět způsobeny vznikem vodíkových můstků mezi TFA a skupinou C=O v hlavním řetězci polypeptidu<sup>14</sup>. Změna průběhu spektra VCD souvisí i se změnou sekundární konformace.

Získané výsledky tedy interpretujeme tak, že postupným zvyšováním obsahu TFA v roztoku PBLG v CHCl<sub>3</sub>



Obr. 4. VCD (A) a absorpční (B) spektrum kapalných krystalů PBLG v  $C_6D_6$  nad kritickou koncentrací, při níž se tvoří kapalně krystal (1), pro srovnání je ve stejném měřítku uvedeno spektrum PBLG v  $CDCl_3$  (2). Spektra jsou normována na jednotkovou hodnotu absorpce pásu amidu I

na 10 obj.% se nejprve omezí agregace jednotlivých šroubovic a výrazně se sníží viskozita roztoku. Při obsahu TFA 10–15 obj.% nastávají výrazné konformační změny – pravotočivá šroubovice se změní na strukturu PPII. Dalším přidávkem TFA až do 20 obj.% již žádné konformační ani agregační změny neprobíhají.

#### Kapalné krystaly PBLG v $C_6D_6$

Na obr. 4 je uvedeno VCD a absorpční spektrum kapalných krystalů PBLG v  $C_6D_6$  a pro srovnání i spektrum PBLG v  $CDCl_3$ , které bylo již uvedeno na obr. 2. Pro srovnání intenzit signálů obou forem PBLG je ve spektru VCD zachováno měřítko, které odpovídá intenzitě VCD pásů kapalných krystalů. Spektra kapalných krystalů jsou zde uvedena bez odečtu rozpouštědla, neboť prakticky nelze určit míru jeho absorpce v tomto systému.

Intenzita VCD signálu kapalných krystalů při srovnatelných hodnotách absorpce je asi stonásobně větší než u všech ostatních naměřených spekter. Opět je však pozorován pozitivní VCD couplet v oblasti amidu I, který je charakteristický pro konformaci  $\alpha$ -helixu.

#### Závěr

Výsledky získané v předkládané práci jsou shrnuty do následujících bodů:

(i) Jasně se prokázalo, že metoda VCD je velmi citlivá při rozpoznávání jak změn v sekundární struktuře

PBLG, tak i jemnějších rozdílů v agregačních stavech. Ve spektru VCD byly prokázány různé agregační stavy PBLG – od specificky organizovaného v  $C_6D_6$ , který vede až ke vzniku kapalných krystalů, přes nižší agregaci v  $CDCl_3$ , až po šroubovice polypeptidu, rozptýlené ve směsném rozpouštědle  $CHCl_3/TFA$  při obsahu TFA 10 obj.%. Těto interpretaci odpovídá i konzistence měřených roztoků.

- (ii) Poprvé byla metodou VCD ukázána závislost sekundární struktury PBLG na složení směsného rozpouštědla  $CHCl_3/TFA$ . Ve spektrech VCD byly pozorovány charakteristické pásy v oblasti amidu I pro formy  $\alpha$ -helix a PPII. Zcela jednoznačný přechod mezi oběma formami, jejichž spektra VCD se v oblasti amidu I a II výrazně liší, probíhá v rozmezí 10–15 obj.% TFA v rozpouštědle.
- (iii) Spektrum VCD kapalných krystalů PBLG v  $C_6D_6$  je charakteristické vysokou intenzitou jednotlivých VCD pásů. Tato tematika však bude kvůli své složitosti předmětem dalšího studia.

*Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MSM 6046137307) a Grantovou agenturou České republiky (GA ČR 203/07/1335).*

*P.N. děkuje za pomoc při počátečních měřeních VCD spekter Ondřeji Julínkovi, Tomáši Krupinskému a Vladimíru Setnickovi.*

#### LITERATURA

- Urbanová M., Maloň P., v knize: *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* (Schalley C., ed.) Wiley-VCH, Weinheim 2007.
- Berova N., Nakanishi K., Woody R.W. (ed.): *Circular Dichroism. Principles and Applications*. Wiley, New York 2000.
- Pauling L., Corey R. B.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 37, 241 (1951).
- Chakrabarti S., Miller W. G.: *Biopolymers* 23, 719 (1984).
- Torii T., Yamashita T., Horie K.: *Eur. Polym. J.* 29, 1265 (1993).
- Patel D. L., Dupre D. B.: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 53, 323 (1979).
- Elias H. G.: *Int. J. Polym. Mater.* 4, 209 (1976).
- Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 31, 1747 (1991).
- Urbanova M., Setnicka V., Volka K.: *Chirality* 12, 199 (2000).
- Julínek O.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha, Praha 2006.
- Yasui S. C., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 25, 5 (1986).
- Palivec L.: *Disertační práce*. VŠCHT Praha, Praha 2006.
- Palivec L., Urbanova M.: *Proc. Third Int. and 28th Eur. Peptide Symp.* (Flegel M., Fridkin M., Gilon C.,

Slaninova J., ed.), str. 1057. Kenes International, Geneva 2005.

14. Combélas P., Garrigou C., Lascombe J.: *Biopolymers* 13, 577 (1974).

**P. Novotná<sup>a</sup> and M. Urbanová<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Analytical Chemistry and* <sup>b</sup>*Department of Physics and Measurement, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **Conformational Study of Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) by Vibrational Circular Dichroism**

Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) (PBLG), a synthetic polypeptide, is soluble in organic solvents. Conformations and

aggregation of PBLG were studied by vibrational circular dichroism spectroscopy (VCD) at various concentrations or acidities. In some solvents PBLG exhibits an  $\alpha$ -helical conformation. The aggregation of PBLG was followed in CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> and C<sub>6</sub>D<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>. A decrease in aggregation was observed in 5 or 10 vol.% solutions of trifluoroacetic acid (TFA) in CHCl<sub>3</sub>. The polyproline II conformation of PBLG was observed in 15 or 20 vol.% TFA solution in CHCl<sub>3</sub>. In other solvents such as benzene, PBLG strongly aggregates; the formation of cholesteric liquid crystals was observed at concentrations higher than 50 g l<sup>-1</sup>. These highly ordered structures were characterized by VCD signals that are about 100 times stronger than for PBLG in CDCl<sub>3</sub>.

## APLIKACE MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ PRO ANALÝZU BYLINNÝCH SILIC

VERONIKA MLEJOVÁ\*, PETRA PAVLÍKOVÁ,  
PETR DOBIÁŠ, MARTIN ADAM a KAREL  
VENTURA

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10 Pardubice  
Martin.Adam@upce.cz

Došlo 1.6.09, přijato 23.1.10.

Klíčová slova: mikroextrakce tuhou fází, plynová chromatografie, silice

### Úvod

Vonné květiny a jejich silice jsou používány už od dob antiky jako koření nebo vůně, v lékařství jako antimikrobiální látky a k ochraně skladovaných surovin<sup>1,2</sup>. V současnosti jsou silice testovány jako potenciální látky pro hubení plevele, nebo také k léčení nemocí<sup>3,4</sup>. Hlavní důvody, které vedou k jejich využívání, jsou poměrně snadné získávání a biodegradace, při které nedochází ke znečišťování životního prostředí. Dále hrají silice významnou roli jako ochrana rostlin proti škůdcům<sup>1,2,5</sup>. Všechny tyto vlastnosti je předurčují k použití na citlivých místech jako jsou školy, restaurace nebo nemocnice<sup>6</sup>.

Silice jsou sloučeniny těkavých látek, které se obvykle vyskytují pouze v nízkých koncentracích<sup>7</sup>, používaných s velkým úspěchem v aromaterapii společně s konvenční a alternativní medicínou<sup>8</sup>. Do dnešní doby byly silice studovány zejména z hlediska jejich chutě a vůně pro využití v potravinách, nápojích a dalších výrobcích. Avšak v současnosti roste zájem o silice a jejich složky díky jejich relativní nezávadnosti, popularitě u konzumentů a díky možnosti jejich víceúčelového využití<sup>9,10</sup>. V literatuře se objevuje mnoho zpráv o jejich antimikrobiálních, antimykotických a antioxidačních vlastnostech<sup>11,12</sup>.

Silice mohou být izolovány různými metodami, např. lisováním, destilací s vodní parou nebo extrakcí do organického rozpouštědla<sup>13</sup>. Nicméně monoterpeny jsou známy svou náchylností k chemickým přeměnám při provádění destilace s vodní parou. Také při klasické extrakci organickým rozpouštědlem dochází ke ztrátám těkavých složek, zejména při odstraňování extrakčního činidla<sup>14</sup>. Vzorková-

ní headspace (HS, z prostoru nad vzorkem) je další možností, jak izolovat silice ze vzorku. Tímto postupem se zajistí selektivní extrakce silic bez dalších složek matrice, které by mohly dále komplikovat vlastní stanovení, ke kterému se zpravidla využívá plynové chromatografie<sup>15</sup>.

Alternativou výše zmíněných technik je mikroextrakce tuhou fází (SPME, Solid Phase Microextraction), která byla poprvé představena Pawliszynem a spol.<sup>16,17</sup>. Tato technika redukuje použití organických (toxických) rozpouštědel a podstatně zkracuje dobu extrakce, jelikož umožňuje automatizaci postupu při přípravě vzorku. Významnými znaky SPME jsou jednoduchost, nízké pořizovací a provozní náklady, rychlost a také selektivita a citlivost ve spojení s vhodnou detekční metodou<sup>18,19</sup>.

Hlavním cílem této studie bylo posoudit vhodnost různých metod, a to mikroextrakce tuhou fází z headspace prostoru (HS-SPME), mikroextrakce tuhou fází ve spojení s hydrodestilací (HD-SPME) a destilace s vodní parou, pro izolaci silic z rostlin a porovnat tyto techniky z různých hledisek mezi sebou.

### Experimentální část

#### Zařízení a chemikálie

Vzorky analyzovaných rostlin, kterými byly máta peprná (*Mentha piperita* L.), levandule lékařská (*Lavandula angustifolia* L.) a šalvěj lékařská (*Salvia officinalis* L.), byly pořízeny u firmy Botanicus s.r.o. (Ostrá, Česká republika). Tyto byliny byly rozděleny na stonky, květy a listy a poté sušeny 24 hodin za laboratorní teploty. Skladovány byly v tmavých prachovnicích za laboratorní teploty. Před analýzou byly zkoumané části nadrceny v třecí misce, aby bylo dosaženo maximálního specifického povrchu.

Standardy jednotlivých silic byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Jednalo se o eukalyptol (98%), kamfor (95%), nerol (97%), borneol (99%), karvakrol (98%), menthon (99%), limonen (99%),  $\alpha$ -pinen (99%), 1,4-cineol (98,5%) a  $\alpha$ -thujon (96%). Všechny standardy i jejich zásobní roztoky byly skladovány v lednici při 4 °C. K extrakci byl použit 99% *p*-xylen (Merck, Darmstadt, Německo) a xylen p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Česká republika).

Před extrakcí metodou HS-SPME byly vzorky temperovány v termostatu Julabo EC-5 (Julabo Labortechnik, Seelbach, Německo), který má teplotní rozsah –20 °C až +100 °C. Při temperaci a následné extrakci byly vzorky umístěny ve vzorkovacích nádobkách (Supelco, Bellefonte, PA, USA) o objemu 10 ml s víčky se septy potaženými teflonem. K HS-SPME a HD-SPME extrakcím bylo použito vláknů 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS Stable Flex (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Držák pro uchycení vláknů

\* Veronika Mlejová získala s touto prací 2. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.



na při manuálním vzorkování rovněž dodala firma Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Pro destilaci s vodní parou bylo použito topné hnízdo LTHS 500, 220 V, 480 W (Brněnská Drutěva v.d., Brno, ČR) a 500ml varná baňka s kulatým dnem a zábrusovým hrdlem. Chladicí systém byl tvořen svislou trubicí opatřenou zábrusem pro připojení na varnou baňku, zahnutou trubicí, svislým kuličkovým chladičem, souborem tvořeným trubicí s postranním ramenem, baňkou hruškovitého tvaru, odměrnou trubicí s rozšířením kulovitého tvaru, třícestným kohoutem a šikmou přípojkou.

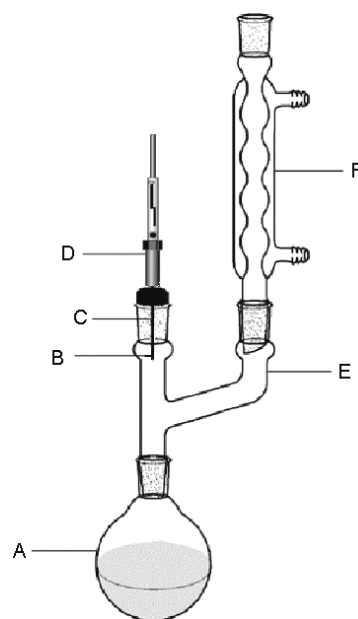
Analýza extraktů získaných jednotlivými extrakčními technikami byla provedena na plynovém chromatografu Hewlett-Packard 5890 (Hewlett Packard, Avondale, USA) vybaveným plamenově-ionizačním detektorem (FID). Separace byla provedena na 25 m dlouhé kapilární koloně Ultra # 2 o průměru 0,32 mm s fenylmethylsilikonem (0,52  $\mu\text{m}$ ) jako stacionární fází. Teplotní rozsah kolony je  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $+325\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro desorpci analytů z SPME vlákna byl použit SPME liner o objemu 250  $\mu\text{l}$ .

Pracovní postupy při provedení jednotlivých extrakčních metod

Pro SPME techniku bylo naváženo 0,5 g rozdrčeného a vysušeného vzorku do 10ml vzorkovací nádoby. Nádoby byly uzavřeny víčky se septy potaženými teflonem. Každý vzorek byl před extrakcí temperován při teplotě  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 min. Ihned po temperaci byla při stejné teplotě provedena extrakce. Septum ve víčku bylo propíchnuto jehlou chránící vlákno. Pak následovalo vysunutí vlákna do headspace prostoru nad vzorkem. Hloubka vysunutí jehly činila 2 cm. Po uplynutí doby extrakce (25 min) bylo vlákno zasunuto zpět do jehly. Ta byla vytažena ze vzorkovací nádoby a vsunuta do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde bylo vlákno vysunuto z jehly a byla provedena tepelná desorpce. Vlákno bylo z důvodu dočištění ponecháno v nástřikovém prostoru po dobu 10 min během analýzy. Hloubka zasunutí jehly do nástřikového prostoru činila 2 cm.

V případě spojení techniky HD-SPME bylo 2,5 g vzorku byliny spolu se 75 ml destilované vody zahříváno v destilační baňce o objemu 250 ml. Destilace byla prováděna po dobu 10 min, poté bylo do prostoru destilačního nástavce umístěno SPME vlákno (50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS). Extrakce současně s destilací byla prováděna po dobu 15 min, hloubka vysunutí vlákna do prostoru destilačního nástavce byla 1,4 cm. Po ukončení sorpce byly extrahované sloučeniny analyzovány metodou GC-FID. Vlákno bylo z důvodu dočištění ponecháno v nástřikovém prostoru po dobu 10 min během analýzy při nastavené hloubce vysunutí vlákna 2 cm. Schéma aparatury je znázorněno na obr. 1.

Při destilaci s vodní parou bylo postupováno dle normy ČSN ISO 6571. Do varné baňky bylo odměřeno 300 ml destilované vody. Na baňku byl nasazen chladicí systém. Odměrná trubice a šikmá trubice byly pomocí postranního ramena naplněny destilovanou vodou. Pipetou



Obr. 1. Schéma aparatury pro HD-SPME; A – destilační baňka, B – SPME vlákno, C – jehla SPME vlákna, D – držák SPME vlákna, E – destilační nástavec, F – zpětný chladič

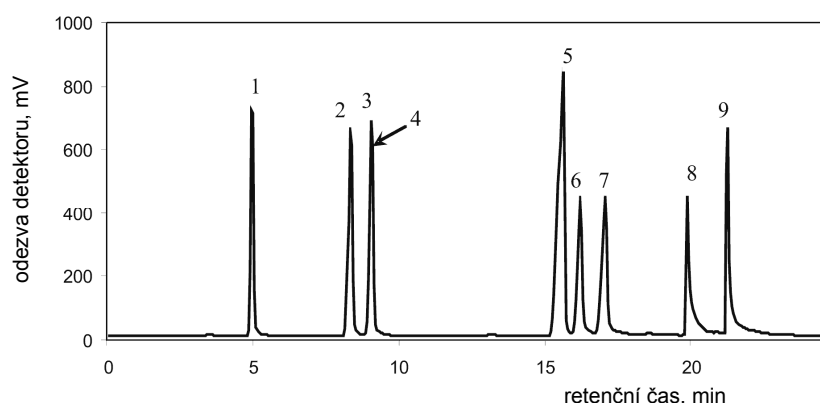
byl postranním ramenem přidán 1 ml *p*-xylynu. Varná baňka byla zahřívána tak, aby rychlost destilace byla 2 až 3  $\text{ml min}^{-1}$ . Po 30 min byl zahřev přerušen, trojcestným kohoutem byl *p*-xylen přepuštěn do dělené trubice (horní hladina vyrovnána s nulou) a po ochlazení byl odečten objem *p*-xylynu. Do varné baňky bylo přidáno 20 g rozdrčeného vzorku byliny a znovu spuštěna destilace o rychlosti 2–3  $\text{ml min}^{-1}$ , která probíhala 4 h. Po ukončení zahřívání byla aparatura nechána zchladnout a byl odečten objem organické fáze<sup>20</sup>. K nástřiku do plynového chromatografu byl použit 1  $\mu\text{l}$  zředěného destilátu.

Všechny získané analyty byly separovány na kapilární koloně Ultra # 2. Jako nosný plyn byl použit dusík. Desorbovaný analyt byl veden na kolonu za použití děliče toku 1:10. Analýza extraktů probíhala při teplotě nástřiku  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  a teplotě detektoru  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Přetlak na vstupu do kolony činil 50 kPa. Teplotní program na koloně je uveden v tab. I. Výsledky kvantitativní analýzy byly vyhodnoceny metodou standardního přídatku. Chromatogram směsi standardů hledaných silic je zobrazen na obr. 2.

Tabulka I

Použitý teplotní gradient pro analýzy na plynovém chromatografu

Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Izoterma [min]	Gradient [ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ]
60	5	2
86	0	20
220	8	0



Obr. 2. Chromatogram směsi standardů získaný GC-FID analýzou; 1 –  $\alpha$ -pinen, 2 – 1,4-cineol, 3 – eukalyptol, 4 – limonen, 5 – kamfor, 6 – menthon, 7 – borneol, 8 – nerol, 9 – karvakrol

## Výsledky a diskuse

Normovaná metoda pro stanovení silic v bylinách založená na destilaci s vodní parou je metoda náročná nejen na čas, ale vyžaduje i větší množství analyzovaného vzorku. Tyto nevýhody byly později částečně eliminovány aplikací metody SPME využívající sorpci sledovaných složek silic z prostoru headspace. Cílem naší studie bylo pokusit se o kombinaci obou způsobů a využít tak jejich výhod. Bylo však třeba nejprve provést optimalizaci této HD-SPME metody.

### Optimalizace HD-SPME metody

Optimalizace podmínek pro metodu HD-SPME byla provedena za účelem docílení co největší účinnosti extrakce. Optimalizovanými faktory byla doba extrakce a hloubka zasunutí vlákna do destilační aparatury. Pro tento účel byl použit květ levandule lékařské v množství 2,5 g. Při této hmotnosti vzorku jsou plochy píků v rámci dané metody dostatečně velké pro správné vyhodnocení chromatogramu a také je tato hmotnost přijatelná v souvislosti s dostatečnou homogenitou vzorků. Konkrétními ukazateli byly plochy píků eukalyptolu,  $\alpha$ -thujonu a kamforu.

### Optimalizace doby extrakce

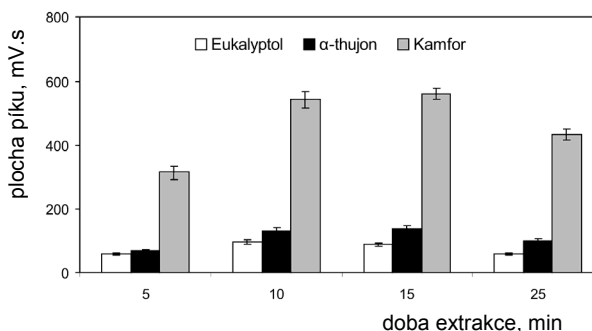
Obecně platí, že s prodlužující se dobou extrakce se zvyšuje množství sorbovaných sloučenin, a to až do dosažení rovnovážného stavu. V případě spojení SPME s destilací s vodní parou však dochází s prodlužující se extrakční dobou ke zvýšení vlivu vodní páry na stacionární fázi. Větší vliv vodní páry na stacionární fázi způsobuje její bobtnání, v důsledku čehož dochází ke snížení množství sorbovaných složek silic.

Při optimalizaci doby extrakce byly zkoušeny časy 5, 10, 15 a 25 min. Výsledky jsou graficky znázorněny na obr. 3, ze kterého vyplývá, že nejvíce  $\alpha$ -thujonu a kamforu

bylo sorbováno při extrakční době 15 min. Při delší době extrakce již nárůst sorbovaných sloučenin pozorován nebyl, naopak docházelo k poklesu velikostí ploch píků sledovaných sloučenin a navíc docházelo i k viditelnému efektu nabobtnání SPME vlákna. Pro další experimenty byl tedy zvolen extrakční čas 15 min.

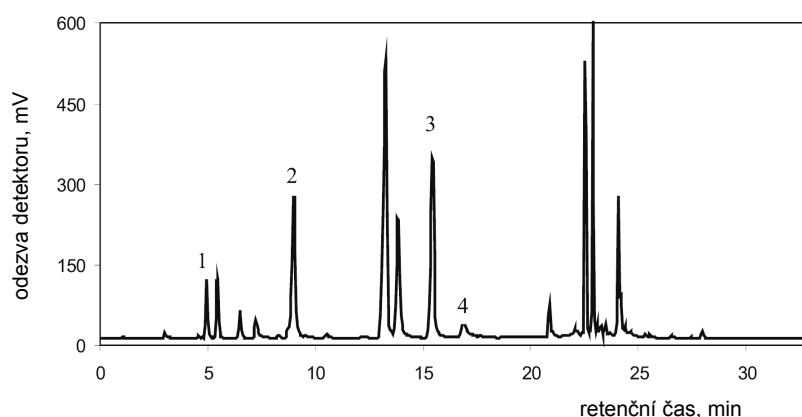
### Volba pozice vlákna v destilačním nástavci

Lze předpokládat, že účinnější sorpce složek silic bude dosaženo v části aparatury s nejvyšší koncentrací, což je horní část destilačního nástavce. V této části bude současně i menší vliv vodní páry na sorpční vlastnosti SPME vlákna. Pro potvrzení této hypotézy byly testovány 3 různé pozice SPME vlákna v destilačním nástavci, které byly upravovány změnou délky vysunutí vlákna. Testovány byly hodnoty 4, 2 a 1,4 cm (nejmenší možná hloubka zasunutí vlákna u použité aparatury). S pomocí GC-FID analýzy extraktů bylo zjištěno, že nejvyšších ploch píků sledovaných sloučenin bylo dosaženo při vysunutí vlákna 1,4 cm, a to pro všechny sledované sloučeniny, tedy pro eukalyptol,  $\alpha$ -thujon a kamfor. V případě zasunutí vlákna hlouběji se více uplatňoval vliv vodní páry na stacionární



Obr. 3. Závislost obsahu sledovaných složek silic na době extrakce





Obr. 4. Chromatogram získaný analýzou SPME extraktu šalvěje lékařské; 1 –  $\alpha$ -pinen, 2 – limonen, 3 – kamfor, 4 – borneol

Tabulka II

Obsah silic ve 100 g listu šalvěje lékařské

Sloučenina	HS-SPME <sup>a</sup>		HD-SPME <sup>b</sup>		Destilace s vodní parou <sup>c</sup>	
	obsah [mg]	RSD [%] <sup>d</sup>	obsah [mg]	RSD [%]	obsah [mg]	RSD [%]
$\alpha$ -Pinen	11,87	1,94	< LoQ	----	15,37	3,48
Limonen	44,93	7,49	137,84	4,15	72,24	4,58
1,4-Cineol	< LoQ	----	< LoQ	----	1,06	1,54
Kamfor	91,69	0,63	369,77	4,06	131,37	6,84
Borneol	11,39	5,43	37,99	7,78	25,22	4,87

<sup>a</sup> 0,5 g vzorku v 10ml nádobce, vlákno 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS, 70 °C, 25 min, <sup>b</sup> 2,5 g + 75 ml vody do 250ml dest. baňky, 15 min, vlákno 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS, <sup>c</sup> 20 g vzorku, 300 ml vody, 1 ml *p*-xyleny jako sběrné rozpouštědlo, destilace 4 h, <sup>d</sup> relativní směrodatná odchylka,  $n = 3$

fázi, kdy docházelo k jejímu pozorovatelnému bobtnání. Hloubka zasunutí vlákna 1,4 cm byla tedy použita pro všechny následující experimenty.

#### SPME a destilace s vodní parou

Pro dosažení správných a reprodukovatelných výsledků u metody HS-SPME stejně jako u metody GC-FID bylo využito našich dřívějších zkušeností<sup>21</sup>. Příklad chromatogramu získaného po analýze SPME extraktu šalvěje lékařské je zobrazen na obr. 4.

Metoda destilace s vodní parou je normovanou metodou a byla provedena dle normy ČSN ISO 6571 (cit. <sup>20</sup>). Jedná se o destilaci vodné suspenze vzorku byliny. Destilát je jímán v dělené trubici s daným množstvím *p*-xyleny. Dochází k pohlcení těkavých silic, oddělení organické fáze od vodné a odečtení celkového objemu organické fáze. Podle normy by organickou fází měl být xylene. Pro desti-

laci s vodní parou u vzorků bylin byl použit *p*-xylene, protože u xyleny p.a. nedošlo k oddělení píku  $\alpha$ -pinenu od píku rozpouštědla a při slepém pokusu bylo patrné, že xylene p.a. obsahuje interferující látku.

#### Porovnání jednotlivých extrakčních metod

Z naměřených výsledků plyne, že kvalitativní i kvantitativní obsah silic ve vzorku se liší v závislosti na zvolené extrakční technice. Je to způsobeno odlišnou citlivostí jednotlivých metod k jednotlivým silicím, která je způsobena odlišnou sorpční schopností rozpouštědla a stacionární fáze a dalšími podmínkami při extrakčních procesech, a také vlastnostmi vybraných silic, např. jejich bodem varu. V tabulkách II, III a IV jsou přehledně znázorněny získané obsahy jednotlivých silic ve vzorcích sušených listů analyzovaných bylin. Některé z výše zmiňovaných silic nejsou v tabulkách přítomny z důvodu zachování

Tabulka III  
Obsah silic ve 100 g listu levandule lékařské

Sloučenina	HS-SPME <sup>a</sup>		HD-SPME <sup>b</sup>		Destilace s vodní parou <sup>c</sup>	
	obsah [mg]	RSD [%]	obsah [mg]	RSD [%]	obsah [mg]	RSD [%] <sup>d</sup>
$\alpha$ -Pinen	1,34	5,68	< LoQ	-----	5,69	2,95
Eukalyptol	180,76	8,75	531,59	0,42	312,81	1,78
Kamfor	191,08	2,55	184,54	1,65	247,79	2,01
Borneol	42,67	5,76	68,96	7,70	55,07	7,30

<sup>a</sup> 0,5 g vzorku v 10ml nádobce, vlákno 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS, 70 °C, 25 min, <sup>b</sup> 2,5 g + 75 ml vody do 250ml dest. baňky, 15 min, vlákno 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS, <sup>c</sup> 20 g vzorku, 300 ml vody, 1 ml *p*-xylenu jako sběrné rozpouštědlo, destilace 4 h, <sup>d</sup> relativní směrodatná odchylka,  $n = 3$

Tabulka IV  
Obsah silic ve 100 g listu máty peprné

Sloučenina	HS-SPME <sup>a</sup>		HD-SPME <sup>b</sup>		Destilace s vodní parou <sup>c</sup>	
	obsah [mg]	RSD [%] <sup>d</sup>	obsah [mg]	RSD [%]	obsah [mg]	RSD [%]
$\alpha$ -Pinen	3,64	2,47	< LoQ	-----	3,52	2,10
1,4-Cineol	< LoQ	-----	< LoQ	-----	3,95	2,47
Eukalyptol	53,29	10,15	204,35	12,79	78,23	2,86
Menthon	422,83	9,85	322,51	9,38	476,54	2,74

<sup>a</sup> 0,5 g vzorku v 10ml nádobce, vlákno 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS, 70 °C, 25 min, <sup>b</sup> 2,5 g + 75 ml vody do 250ml dest. baňky, 15 min, vlákno 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS, <sup>c</sup> 20 g vzorku, 300 ml vody, 1 ml *p*-xylenu jako sběrné rozpouštědlo, destilace 4 h, <sup>d</sup> relativní směrodatná odchylka,  $n = 3$

přehlednosti a proto, že jejich hodnoty se pohybovaly pod mezí kvantifikace.

Ze srovnání mikroextrakčních technik s destilací s vodní parou vyplývá, že pro destilaci je nutné použít větší množství vzorku i extrakčního rozpouštědla, je časově náročná, ale je vhodná pro kvalitativní i kvantitativní analýzu jednotlivých složek silic. Mikroextrakční techniky jsou nenáročné na aparatury a čas, snižují spotřebu organických rozpouštědel a také finanční náklady. Po provedení optimalizace jednotlivých parametrů je možné pomocí HS-SPME stanovit kvalitativní i kvantitativní obsah jednotlivých složek silic. Metoda HD-SPME vykazuje mnohem menší selektivitu než HS-SPME a je také časově náročnější.

## Závěr

Mikroextrakce tuhou fází a mikroextrakce tuhou fází ve spojení s destilací s vodní parou byly použity k důkazu i ke stanovení silic ve vzorcích sušených listů těchto bylin – máty peprné (*Mentha piperita* L.), levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* L.) a šalvěje lékařské (*Salvia offi-*

*cinalis* L.). Analýza extraktů byla provedena plynovou chromatografií s plamenově-ionizační detekcí. Výsledky změřené po analýze extraktů získaných mikroextrakčními technikami byly poté porovnány s výsledky získanými metodou destilace s vodní parou, která je prezentována jako referenční metoda pro stanovení obsahu silic. Byly optimalizovány parametry pro extrakční techniku HD-SPME, kdy bylo zjištěno, že vhodnou dobou extrakce je 15 min při délce vysunutí SPME vlákna 1,4 cm. Tato délka je nejmenší možnou hloubkou zasunutí vlákna u použité aparatury, což je výhodné z hlediska předpokladu, že nejvyšší koncentrace silic je u horní části destilačního nástavce. Zároveň při této délce dochází k nejmenšímu ovlivnění extrakce vodní parou. Podmínky HS-SPME a destilace s vodní parou byly přejaty z literatury, proto nebylo nutné provádět optimalizaci těchto metod. Na základě získaných výsledků a dalších poznatků byly mikroextrakční techniky porovnány jak mezi sebou, tak s normovanou metodou, tedy s destilací s vodní parou. Výsledky ukázaly, že navrhovaná metoda HD-SPME není pro daný účel příliš vhodná, neboť její citlivost i selektivita je ve srovnání s oběma zbývajících metodami horší.

*Projekt byl realizován díky finanční podpoře grantových projektů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021627502).*

## LITERATURA

1. Isman M. B., Machial C. M., v knize: *Naturally Occurring Bioactive Compounds. Advances in Phyto-medicine*. Vol. 3. (Rai M., Carpinella M. C., ed.), Elsevier B. V., Amsterdam 2006.
2. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.: *Food Chem. Toxicol.* 46, 446 (2008).
3. Singh H. P., Batish D. R., Kohli R. K.: *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 239 (2003).
4. Pawar V. C., Thaker V. S.: *Mycoses* 49, 316 (2006).
5. Zygadlo J. A., Grosso N. R.: *Flavour Fragr. J.* 10, 113 (1995).
6. Batish D. R., Singh H. P., Kohli R. K., Kaur S.: *Forest Ecol. Manag.* 256, 2166 (2008).
7. Ye H., Ji J., Deng Ch., Yao N., Li N., Zhang X.: *Chromatographia* 63, 591 (2006).
8. Martí D., Pérez-García M. T., Blanquer A., Villagrasa V., Sanahuja M. A., Moreno L.: *Flavour. Fragr. J.* 22, 201 (2007).
9. Ormancey X., Sisalli S., Coutiere P.: *Parfums, Cosmetics, Actualites* 157, 30 (2001).
10. Sawamura M.: *Aroma Research* 1, 14 (2000).
11. Hirasa K., Takemasa M.: *Spice Science and Technology*. Dekker Inc., New York 1998.
12. Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R.: *Food Chem.* 91, 621 (2005).
13. Sahraoui N., Abert Vian M., Bornard I., Boutekedjiret Ch., Chemat F.: *J. Chromatogr., A* 1210, 229 (2008).
14. Presti M. L., Ragusa S., Trozzi A., Dugo P., Visinoni F., Fazio A., Dugo G., Mondello L.: *J. Sep. Sci.* 28, 273 (2005).
15. Fakhari A. R., Salehi P., Heydari R., Ebrahimi S. N., Haddad P. R.: *J Chromatogr., A* 1098, 14 (2005).
16. Arthur C. L., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 62, 2145 (1990).
17. Pawliszyn J.: *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH, New York 1997.
18. Dugay J., Miege C., Hennion M.-C.: *J. Chromatogr., A* 795, 27 (1998).
19. Zhang Z., Yang M., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 66, 844 (1994).
20. ČSN ISO 6571: *Stanovení obsahu těkavých olejů (silic)* (červen 1995).
21. Adam M., Dobiáš P., Eisner A., Ventura K.: *J. Sep. Sci* 31, 356 (2008).

**V. Mlejová, P. Pavlíková, P. Dobiáš, M. Adam, and K. Ventura** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice*): **Application of Various SPME Methods in Analysis of Herbal Essential Oils**

Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and solid-phase microextraction coupled with hydrodistillation (HD-SPME) were used for detection and determination of essential oils in dried leaves of *Mentha piperita* L., *Lavandula angustifolia* L. and *Salvia officinalis* L. The results were compared with those obtained using steam distillation, which is a reference method. The extraction time 15 min and the minimal fibre depth 1.4 cm are suitable for a 50/30 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene/carboxen fibre. The method was compared with HS-SPME and steam distillation.

## FRAKCIONACE STOPOVÝCH PRVKŮ V LISTECH VRBY (*Salix spp.*)

KATEŘINA MALIŠOVÁ<sup>a\*</sup>, OTO MESTEK<sup>a</sup>,  
JANA KOMÍNKOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ ŠANTRŮČEK<sup>a</sup>,  
JIŘINA SZÁKOVÁ<sup>b</sup> a PAVEL TLUSTOŠ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup> Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6  
Katerina.Malisova@vscht.cz

Došlo 20.4.09, přepracováno 14.9.09, přijato 27.10.09.

Klíčová slova: frakcionace, speciace, vrba, fytořemediace

### Úvod

Fytořemediace je postup využívající zelených rostlin a s nimi asociovaných mikroorganismů, půdních doplňků a agronomických technik pro odstranění či transformaci kontaminantů životního prostředí. Proces fytořemediace těžkých kovů může být zjednodušeně popsán jako odstranění kovů z půdy jejich transportem do kořenů, stonků a listů. Rostliny jsou následně sklizeny a odstraněny a plocha je opět osázena rostlinami do té doby, než se koncentrace kovů v půdě sníží na přijatelnou hladinu<sup>1</sup>. Rostlina vhodná pro fytořemediaci by měla splňovat tři základní předpoklady: měla by rychle růst a produkovat velké množství biomasy, měla by mít dostatečně hluboké kořeny, lehce sbíratelnou nadzemní část a akumulovat velké množství kovů v nadzemní části. Mezi nevýhody této metody patří produkce rostlin obohacených o rizikové prvky, které mohou být konzumovány živočichy nebo vyplaveny, nedostatečná transpirace rostlin během určitých období roku a možné zvýšení transportu stopových prvků díky vylučování rozpustných exudátů kořeny rostlin. Kořeny zasahují pouze do určité hloubky půdního profilu, a není proto možné extrahovat kontaminanty z hlubších horizontů. Rostliny také nemohou růst na půdách s toxicky působící kontaminací<sup>2</sup>.

V současné době využívají fytořemediační technologie dvě dostupné strategie. První možností je použití rostlinných hyperakumulátorů, které mohou vázat kovy ve velkých množstvích, koncentrace těžkých kovů v biomase

takovýchto rostlin překračuje o jeden až dva řády hodnoty získané v běžných rostlinách. Tak např. penízeček modravý (*Thlaspi caerulescens*) dokáže vázat až 30 g kg<sup>-1</sup> niklu, 43 g kg<sup>-1</sup> zinku, a 2 g kg<sup>-1</sup> kadmia a olova<sup>3</sup>. Malá produkce biomasy hyperakumulátorů je tedy kompenzována velmi vysokým obsahem těžkých kovů v nadzemních částech rostliny. Druhou možností je pěstování rostlin, které dosahují mírně nadprůměrných obsahů kovů v biomase, toto ale kompenzují vysokým výnosem biomasy. Na půdách kontaminovaných do hlubších vrstev se při fytořemediacích osvědčují druhy čeledi *Salicaceae* (vrby a topoly)<sup>4</sup>. Velkou výhodou vrb je možnost častých sklizní, vysoký výnos biomasy, dobrá regenerace (posklizňové odrůstání), efektivní příjem živin, vysoká intenzita a specifická kapacita jednotlivých druhů, hybridů a klonů absorbovat těžké kovy<sup>5</sup>. Některé druhy a klony vrb a topolů však vykazují i velmi vysoký koeficient bioakumulace, díky němuž mohou vykazovat až 5krát vyšší kapacitu příjmu kovů než *T. caerulescens*<sup>5,6</sup>.

Tolerance vyšších rostlin k přítomnosti těžkých kovů je přirozená nebo získaná schopnost snášet po dlouhou dobu vysoké koncentrace kovů bez patrného negativního působení na metabolismus a schopnosti rozmnožování, která je řízena genetickými vazbami a faktory prostředí. Rozvoj tolerance je dlouho trvající proces a zahrnuje změny v genetice rostlin<sup>7</sup>. Hlavním mechanismem detoxikace iontů kovů v rostlinách je chelatace s ligandy, doplněná odloučením vzniklých komplexů do subcelulárních prostor (převážně do vakuol) nebo do specifických pletiv rostlin. Na detoxikaci těžkých kovů v buňce se jako chelatující ligandy podílí převážně organické kyseliny. Nejčastěji se jedná o kyseliny malonovou, šťavelovou, vinnou nebo citrónovou ve vakuole. Komplexy o větší stabilitě se vytváří vazbou na histidin, metalothioneinům podobné látky a fytochelatinu. Anorganickými ligandy jsou chloridy, fluoridy, sulfáty a další<sup>4,7</sup>. V této práci jsme se pokusili posoudit, jaké typy vazeb toxických prvků převládají v listech vrby (*Salix spp.*) rostoucí na silně kontaminované půdě.

### Experimentální část

*Vzorky.* Směs listů (VK) *Salix smithiana*, *S. alba*, *S. rubens* a *S. dasyclados* byla sbírána na podzim roku 2007 v okolí řeky Litavky na Příbramsku, kde došlo k extrémní kontaminaci půdy způsobené několikanásobným vylitím odkalovacích nádrží blízké kovohutě při povodních. Půda obsahovala 64,1±4,3 mg kg<sup>-1</sup> As, 30,5±2,9 mg kg<sup>-1</sup> Cd, 2297±42 mg kg<sup>-1</sup> Pb a 3718±317 mg kg<sup>-1</sup> Zn

\* Kateřina Mališová tuto práci úspěšně prezentovala na soutěži O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

(cit.<sup>8</sup>). Dva kontrolní vzorky byly sbírány v nekontaminované oblasti u řeky Vltavy v Praze Zbraslavi na jaře (VZJ) a na podzim (VZP) roku 2008.

**Chemikálie.** Použité kyseliny dusičná a chlorovodíková, hydroxid sodný a amoniak byly třídy Suprapur<sup>®</sup> (Merck, Německo), octová kyselina byla čistoty p.a. (Lachema, ČR). Základní roztoky prvků o koncentraci 1000 mg l<sup>-1</sup> byly získány od firmy Merck. Látka tris (hydroxymethyl) aminomethan (Tris) byla získána od firmy Fluka (Německo). K ředění roztoků byla použita destilovaná demineralizovaná voda (Millipore, USA).

**Příprava extraktu v 0,02 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl.** Navážka 2 g homogenizované biomasy byla extrahována 50 ml pufru 0,02 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,5) po dobu jedné hodiny v PE lahvičce. Poté byla směs odstředěna (20 000 g, 4 °C, 20 min), odstředěná kapalina byla použita k dalším analýzám.

**Příprava extraktu v 1 M-NaOH.** Navážka 0,5 g homogenizované biomasy byla extrahována 5 ml 1 M-NaOH v PP zkumavce po dobu jedné hodiny. Po naředění byla suspenze neutralizována na pH 7,5 přidávkou kyseliny octové o koncentraci 1,7 mol l<sup>-1</sup> a 0,17 mol l<sup>-1</sup> za neustálého míchání a sledování pH, směs byla doplněna na objem 50 ml a odstředěna (20 000 g, 4 °C, 20 min), odstředěná kapalina byla použita k dalším analýzám.

**Stanovení celkového obsahu prvků.** 0,5 g homogenizované biomasy nebo 10 ml extraktu bylo v 110 ml PTFE nádobce rozkládáno ve 3 ml kyseliny dusičné za zvýšené-

ho tlaku s fokusovaným mikrovlnným ohřevem (Uniclever BM1-Z, Plazmatronika, Polsko). Rozložený vzorek byl převeden do 50 ml odměrné baňky a obsah prvků byl stanoven metodou ICP-MS, na přístroji Elan DRC-e (Perkin – Elmer, Norwalk, USA).

**Spojení GPC/ICP-MS.** Aparatura pro kvantitativní vyhodnocení frakcionace stopových prvků byla sestavena z vysokotlakého čerpadla Varian Inert 9012 (Varian, Walnut Creek, USA), dvou injektorů umístěných před (smyčka 100 µl pro dávkování vzorku) a za kolonou (smyčka 500 µl pro dávkování kalibračních roztoků prvků) a kolony Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko); jako detektor sloužil hmotnostní spektrometr, mobilní fáze byla Tris-HCl (pH 7,5) o průtoku 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Pro preparativní separace byla použita kolona Fractogel EMD Bio SEC (Merck), smyčka pro dávkování vzorku měla objem 2 ml, jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr a detektor 9050 UV (Varian), jako mobilní fáze byl použit pufr Tris-HCl (pH 7,5), průtok 2 ml min<sup>-1</sup>.

**Izolace ligandů stopových prvků pomocí afinitní chromatografie.** Ligandy stopových prvků obsažené v nízkomolekulární frakci extraktu v roztoku Tris-HCl byly zachyceny absorpcí v 1 ml chelatační kolonce HiTrap (GE Healthcare Bio Science AB, Uppsala, Švédsko) nasycené ionty Cu<sup>2+</sup>. Absorbované látky byly eluovány pomocí 0,3 mol l<sup>-1</sup> roztoku amoniaku a eluát byl lyofilizován.

Tabulka I

Celkové obsahy stopových prvků v sušině homogenizované biomasy listů vrb [µg g<sup>-1</sup>]

Prvek	Vzorek		
	VK <sup>a</sup>	VZJ <sup>b</sup>	VZP <sup>c</sup>
V	0,230±0,021	0,657±0,065	3,5±0,2
Ag	0,0611±0,0062	0,0088±0,0019	0,0476±0,0028
Cd	60,4±4,0	0,398±0,032	1,81±0,14
Co	0,742±0,034	1,299±0,068	7,86±0,33
Cu	7,33±0,38	9,28±0,40	39,5±1,8
Cr	0,462±0,054	0,655±0,074	3,77±0,53
Fe	200±11	290±22	1452±233
Mo	0,096±0,012	0,205±0,012	1,351±0,078
Mn	318±28	120,0±8,3	1057±62
Ni	8,93±0,53	1,94±0,12	13,8±1,8
Zn	1543±101	66,4±5,2	334±21
As	0,535±0,059	0,1224 ±0,0091	1,303±0,075
Tl	0,0318±0,0019	0,00486±0,00049	0,0275±0,0023
Pb	89,7±8,6	0,518±0,044	3,74±0,21
Sušina	91,8 %	90,2 %	98,0 %

<sup>a</sup> Vrba rostoucí v kontaminované půdě v okolí řeky Litavky na Příbramsku, <sup>b</sup> vrba rostoucí v nekontaminované půdě v okolí řeky Vltavy na Praze – Zbraslavi, jarní sběr, <sup>c</sup> vrba rostoucí v nekontaminované půdě v okolí řeky Vltavy na Praze – Zbraslavi, podzimní sběr

**MALDI-MS.** Měření proběhlo na spektrometru Biflex IV (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Německo), jako matrice byla použita kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, měření probíhalo v pozitivním módu.

**Stanovení obsahu aminokyselin v rostlinné biomase.** Po kyselinovém rozkladu vzorku byly aminokyseliny stanoveny iontově výměnnou chromatografií s pokolonovou derivatizací ninhydrinem a spektrofotometrickou detekcí.

## Výsledky a diskuse

Celkové obsahy stanovených prvků v analyzovaných vzorcích shrnuje tab. I. Ze získaných dat je patrné, že listí kontaminovaných vzorků obsahuje výrazně více kadmia (30×), olova (30×) a zinku (5×) než listí nekontaminované. Arzen, který byl v půdě obsažen také ve zvýšeném množství, nebyl rostlinou akumulován. To potvrzuje dřívější poznatky zaznamenané u vrb pěstovaných na půdě z této oblasti<sup>8</sup>. Z porovnání obsahů stopových prvků v nekontaminovaných vzorcích VZJ a VZP vyplývá, že během vegetačního období došlo k pěti až desetinásobnému nárůstu obsahu stopových prvků. Dále je patrné, že nekontaminovaný vzorek VZP obsahuje výrazně více železa, manganu a mědi, než vzorek kontaminovaný. Vassilev a spol.<sup>9</sup> pozorovali snížení obsahu železa a fotosyntetických pigmentů u vrb exponovaných zinku a lze spekulovat, že podobně se vysoký obsah zinku mohl projevit i v našem případě. Tab. II ukazuje extrahovatelné obsahy

stopových prvků ve vzorku VK. Při extrakci do pufru Tris-HCl se vyextrahovalo více Fe, Mn a Tl; při extrakci do roztoku NaOH se vyextrahovalo více Cu, Mo, Ni, Zn, As a Pb. Pro identifikaci vazeb prvků na složky rostlinné biomasy metodou GPC/ ICP-MS byly sledovány pouze prvky obsažené v extraktu ve vyšších koncentracích (Cd, Zn, Pb, Mn a Ni). Tab. II ukazuje podíly těchto prvků prošlé kolonou GPC. Tato hodnota určuje podíl kovů vázaných do stabilních komplexů. Zbýlý podíl obsažený v iontové formě je GPC kolonou pevně vázán a musí být po skončení analýzy odstraněn nástřikem roztoku EDTA. Je patrné, že při extrakci do NaOH se v případě Cd, Pb a Zn uvolňuje vyšší podíl stabilních komplexů. V případě Ni a Mn podíly prošlé kolonou na použitém typu extrakčního činidla nezávisí. Obr. 1 ukazuje prvkově specifické chromatogramy extraktu v pufru Tris-HCl a v roztoku NaOH. Je patrné, že pro případ extrakce do roztoku Tris-HCl jsou ligandy eluovány převážně v jednom retenčním čase v nízkomolekulární oblasti, zatímco v případě extrakce do roztoku NaOH jsou ligandy eluovány ve více retenčních časech ve vysokomolekulární, středně i nízkomolekulární oblasti. Použité extrakční činidlo tedy může významně ovlivnit konečnou interpretaci výsledků.

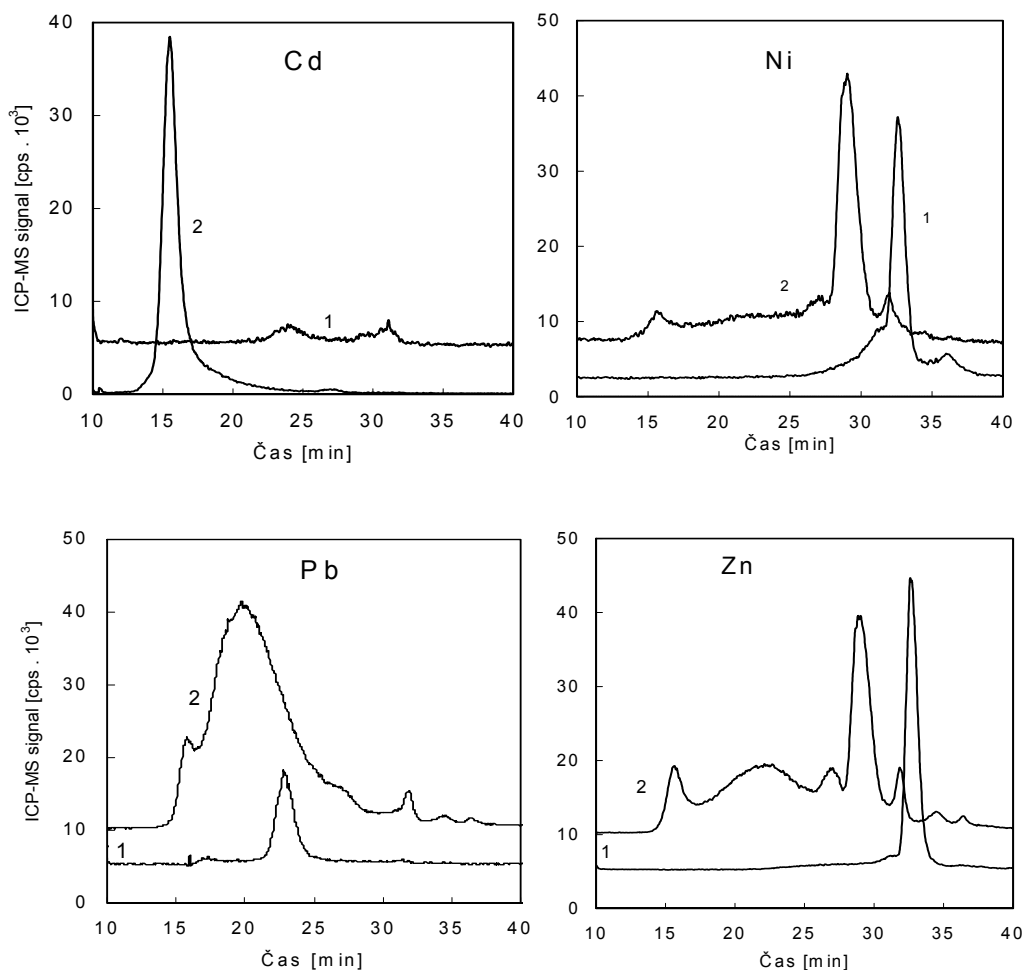
Nízkomolekulární frakce extraktu v pufru Tris-HCl byla separována metodou preparativní GPC (kolona Fractogel), dále přečištěna technikou afinitní chromatografie s imobilizovaným iontem kovu a podrobena další analýzám. V tab. III jsou ukázány nalezené obsahy aminokyselin. Je zřejmý vysoký výskyt kyseliny asparagové či aspa-

Tabulka II

Extrahovatelné obsahy prvků v rostlinné biomase vzorek VK a podíly prošlé kolonou

Prvek	Extrahovatelný podíl <sup>a</sup>		Podíl prošlý kolonou <sup>b</sup>	
	extrakce do Tris	extrakce do NaOH	extrakce do Tris	extrakce do NaOH
V	<0,001 (<1 %)	<0,001 (<1 %)		
Ag	0,002 (3 %)	0,009 (15 %)		
Cd	8,8 (15 %)	9,9 (16 %)	0,045 (<1 %)	7,5 (76 %)
Co	0,31 (42 %)	0,27 (37 %)		
Cu	1,1 (14 %)	3,3 (45 %)		
Cr	0,01 (2 %)	0,25 (54 %)		
Fe	56 (28 %)	37 (19 %)		
Mo	0,03 (34 %)	0,06 (61 %)		
Mn	245 (77 %)	193 (61 %)	0,16 (<1 %)	0,13 (<1 %)
Ni	5,4 (61 %)	6,5 (73 %)	4,0 (61 %)	4,4 (66 %)
Zn	573 (37 %)	956 (62 %)	10,5 (1 %)	60,8 (6 %)
As	0,096 (18 %)	0,39 (73 %)		
Tl	0,012 (37 %)	0,0052 (16 %)		
Pb	2,6 (3 %)	18,9 (21 %)	0,21 (1 %)	5,4 (29 %)

Výsledky jsou uvedeny v  $\mu\text{g g}^{-1}$ , v závorce je uveden procentický podíl vztažený k celkovému obsahu<sup>(a)</sup> nebo k extrahovatelnému množství<sup>(b)</sup>



Obr. 1. GPC profily jednotlivých prvků pro extrakci do Tris-HCl (1) a do NaOH (2)

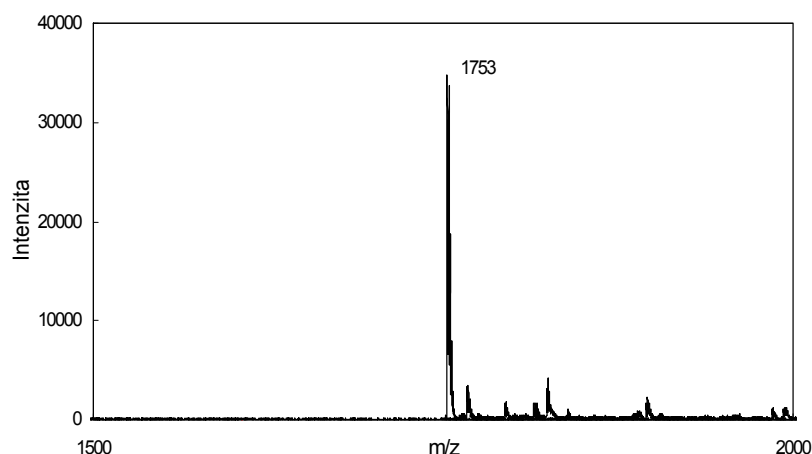
Tabulka III

Výsledky analýzy aminokyselinového složení nízkomolekulární frakce extraktu rostlinné biomasy

Aminokyselina	Zastoupení [% mol mol <sup>-1</sup> ]
Asp	19
Ser	12
Glu	13
Gly	14
Cys	36
Lys	6

raginu a glutamové či glutaminu, serinu, glycinu a cysteinu. V MALDI-MS spektru této přečištěné frakce byl nalezen jeden pík odpovídající molekulové hmotnosti 1753 Da (obr. 2).

Výsledky potvrdily již známou schopnost vrb rostoucích na kontaminované půdě akumulovat vysoké obsahy zejména Cd a Zn<sup>8,10,11</sup>, přičemž tyto kovy jsou obsaženy převážně v nerozpustné frakci analyzované biomasy. Nízkomolekulární látky tvořící rozpustné komplexy s kovy v extraktech obsahují vysoký podíl aminokyselin cysteinu a kyselin asparagové a glutamové, tedy látek s vysokou komplexační schopností. Výsledky tedy naznačují, že vrby pravděpodobně mají účinné detoxikační mechanismy, díky jimž jsou tyto dřeviny tolerantní k vysokým obsahům toxických prvků v půdě. Přesné popsání těchto mechanismů však vyžaduje další intenzivní výzkum.



Obr. 2. MALDI-MS spektrum nízkomolekulární frakce extraktu listů vrby VK přečištěné technikou IMAC

*Tato práce vznikla za podpory výzkumných záměrů MŠMT ČR MSM 6046137307 a MSM 6046070901.*

## LITERATURA

1. Soudek P., Petrová Š., Benešová D., Koryta J., Vaněk T.: Chem. Listy 102, 346 (2008).
2. Iskandar I. K., Adriano D. C. (ed.): *Remediation of Soils Contaminated with Metals (Advances in Environmental Science)*. Middlesex, Northwood 1997.
3. Dercová K., Makovnicková J., Barančíková G., Žuffa J.: Chem. Listy 99, 682 (2005).
4. Prasad M. N. V. (ed.): *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin 1999.
5. Pulford I. D., Watson C.: Environ. Intern. 29, 529 (2003).
6. Robinson B. H., Mills T. M., Petit D., Fung L. E., Green S. R., Clothier B. E.: Plant Soil 227, 301 (2000).
7. Sanità di Toppi L., Gabbriellini R.: Environ. Exp. Bot. 41, 105 (1999).
8. Tlustoš P., Száková J., Vysloužilová M., Pavlíková D., Weger J., Javorská H.: Centr. Eur. J. Biol. 2, 254 (2007).
9. Vassiliev A., Perez-Sanz A., Cuypers A., Vangronsveld J.: J. Plant Nutr. 30, 1471 (2007).
10. Klang-Westin E., Eriksson J.: Plant Soil 249, 127 (2003).
11. Eriksson J., Ledin S.: Water Air Soil Poll 114, 171 (1998).

**K. Mališová<sup>a</sup>, O. Mestek<sup>a</sup>, J. Komínková<sup>a</sup>, J. Šantrůček<sup>a</sup>, J. Száková<sup>b</sup>, and P. Tlustoš<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Chemical Technology, Prague*, <sup>b</sup>*Czech University of Life Sciences, Prague*): **Concentration of Trace Metals in Willow (*Salix spp.*) Leaves**

The title method was used for phytoremediation of soils. The experiments were performed with leaves of willow (*S. smithiana*, *S. alba*, *S. rubens* and *S. dasyclados*) grown in soil contaminated with heavy metals (Cd, Zn, Pb). The ability of the leaves to accumulate these metals was confirmed. The total contents of metals in 0.02 mol l<sup>-1</sup> Tris buffer (pH 7.5) and in 1 mol l<sup>-1</sup> sodium hydroxide extracts were determined. Size exclusion chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry was used for separation and determination of metals in the extracts. The metals in the extracts are present mainly in low-molecular-weight fractions ( $M \approx 2$  kDa). These fractions were obtained by preparative size exclusion chromatography and refined by immobilized metal affinity chromatography. The compounds in the fractions were analyzed by amino acid analysis and MALDI mass spectrometry. The results show that majority of heavy metals in willow biomass remained in insoluble residue whereas the extracts contain substantial amounts of chelating agents, which suggests their role in metal detoxication processes in willow plants.



## ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE mRNA IZOLOVANÉ Z ROSTLINNÝCH PLETIV ZA VYUŽITÍ PARAMAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC

Věnováno padesátému výročí udělení Nobelovy ceny Prof. Jaroslavu Heyrovskému

DALIBOR HÚSKA<sup>a,\*</sup>, VOJTĚCH ADAM<sup>a,b</sup>,  
LIBUŠE TRNKOVÁ<sup>c</sup> a RENÉ KIZEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, <sup>b</sup> Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>c</sup> Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
kizek@sci.muni.cz

Došlo 10. 4. 2009, přepracováno 8.10.09, přijato 2.11.09.

Klíčová slova: magnetická separace, messenger RNA, elektrochemický senzor, bioelektrochemie, DNA, eliminační voltametrie

### Úvod

Paramagnetické mikro- a nanočástice jsou – vzhledem k jejich široké působnosti od separace a izolace celých buněk (bakterií), proteinů, virových částic, nukleových kyselin až po magnetickou zobrazovací rezonanci a magnetickou hypertermii – stále častěji využívány v pokročilých technologiích. Mezi ně bezesporu patří i technologie senzorů, neboť jednoduché, selektivní a citlivé senzory a biosenzory představují unikátní nástroje pro rychlou detekci vybraného analytu i v poměrně složité matrici<sup>1–6</sup>. Unikátnost nabývá na významu, pokud existuje možnost napojení vhodného a spolehlivého senzoru do automatizovaného režimu, který umožňuje snížení kontaminace vzorku a experimentálních chyb způsobených lidským faktorem, což je důležité i v analýze nukleových kyselin (DNA, RNA) jak pro účely diagnostické, tak kriminalistické<sup>7</sup>. Proto odběr vzorku a následná izolace analytu představuje jeden z klíčových momentů analýzy. Vzhledem ke stále zvětšujícímu se tlaku na snížení množství materiálu dostupného k analýze (vlas, kapka krevního séra či krve, několik málo buněk tkáně) výrazným způsobem narůstá možnost kontaminace vzorku personálem.

Získaný falešně pozitivní výsledek pak může ovlivnit závěry vyšetřování nebo návrh léčebného postupu. Možnou změnu do procesu izolace nukleových kyselin mohou přinést paramagnetické částice<sup>8</sup>. Ukazuje se, že propojení paramagnetických částic s elektrochemickou detekcí umožňuje izolaci sledovaných molekul<sup>9–14</sup>. Celou izolaci je možné rozdělit do tří samostatných kroků vázaných na tři různé povrchy. První krok je podmíněn povrchem, kdy dochází k interakci mezi vzorkem (nukleovou kyselinou) a paramagnetickou částicí, druhý krok povrchem, kdy k separaci dochází díky interakci magnetu a paramagnetických částic, zatímco nevázané molekuly jsou ze systému vymyty. Poslední krok – detekce – je reprezentovaný povrchem vysoce účinného elektrochemického detektoru (obr. 1).

Kromě DNA je nejčastěji studovanou nukleovou kyselinou RNA, konkrétněji pak RNA významná pro sledování exprese genů (mRNA – messenger RNA). Magnetická separace nabízí velmi elegantní cestu jak zachycovat cílenou nukleovou kyselinu z krve, kosti, kostní dřeni, buněčných kultur, rostlinných pletiv a dalších biologických materiálů před dalším zpracováním, jako je např. její amplifikace nebo detekce. Molekula mRNA je na 3'-konci ukončena řetězcem z 50–250 adenin-nukleotidů (polyadenylační sekvence). Pomocí této sekvence můžeme velmi snadno mRNA zachytit na paramagnetické mikročástice nesoucí řetězec thyminů (obr. 1). Následnou tepelnou denaturací lze zachycenou mRNA z paramagnetických částic uvolnit a následně s ní dále pracovat za využití analytických nebo molekulárně-biologických technik<sup>15,16</sup>.

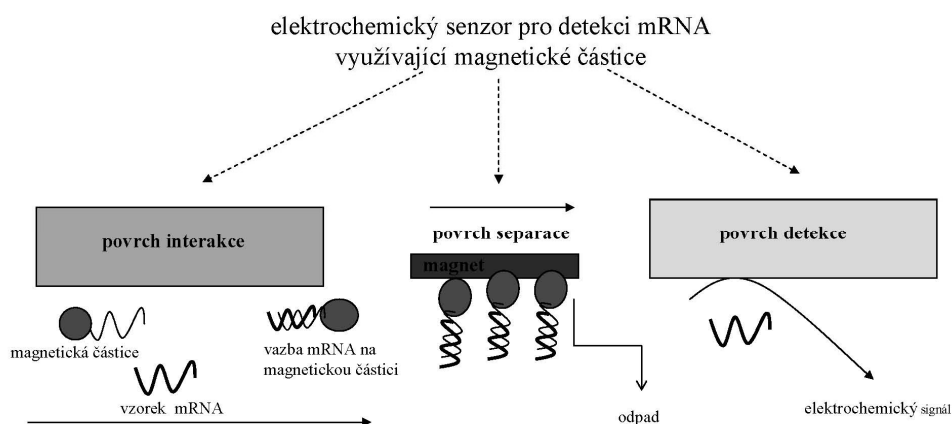
Cílem této práce je ukázat aplikaci paramagnetických částic jako základ jednoduchého elektrochemického senzoru pro analýzu mRNA.

### Experimentální část

**Chemikálie:** Roztoky polyadenylové kyseliny (poly(A)) byly připravovány ze zásobního roztoku o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  z lyofilizované poly(A) ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ )  $M_r = 400\,000$  (Sigma-Aldrich, USA). Oligonukleotidy s řetězcem 25, 30, 35, 40 adeninů byly syntetizovány společností Sigma-Aldrich (USA) a přečištěny metodou HPLC. Koncentrace zásobních roztoků byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm na přístroji Specord 210 (Analytic Jena, Německo).

**Pufry použité pro experimenty:** a) fosfátový pufr: 0,1 M-NaCl + 50 mM- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,2 M-NaCl + 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; b) acetátový pufr: 0,2 M- $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0,2 M- $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Ostatní použité chemikálie byly získány v čistotě ACS od společnosti Sigma-Aldrich.

\* Dalibor Húska získal 3. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou práci v oboru analytická chemie.



Obr. 1. **Elektrochemický senzor pro detekci mRNA využívající paramagnetické částice.** Jednotlivé kroky ukazující záchyt, oddělení a stanovení mRNA pomocí paramagnetických částic: interakce (probíhá interakce mezi paramagnetickou částicí a nukleovou kyselinou), separace (dochází k oddělení specificky zachycených molekul od ostatních), detekce (stanovení zachycené molekuly nukleové kyseliny)

*Paramagnetické mikročástice* byly zakoupeny od společnosti Dynal Biotech ASA (Norsko). Povrch těchto mikročástic je modifikován navázáním oligonukleotidové sekvence (dT)25. Velikost částic je  $2,80 \pm 0,20 \mu\text{m}$ .

*Elektrochemická detekce na rtuťové elektrodě:* Elektrochemické stanovení s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE; plocha kapky  $0,40 \text{ mm}^2$ ) jako pracovní elektrodou bylo provedeno pomocí přístroje AUTOLAB analyzátor (EcoChemie, Holandsko), ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byla používána pracovní cela s tříelektrodovým zapojením. Referenční elektroda byla Ag/AgCl/3 M-KCl a pomocná elektroda byla uhlíková tyčinka. Základní elektrolyt acetátový pufr (pH 5,0). LSV parametry: počátek a konec potenciálového okna: 0 V a  $-1,65 \text{ V}$ , potenciálový krok:  $5 \text{ mV}$ , rychlost polarizace: 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 a  $600 \text{ mV s}^{-1}$ .

*Eliminační voltametrie:* metoda EVLS (eliminační voltametrie s lineárním skenem) byla uskutečněna programem evls.exe (vytvořen na Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity), z LSV (voltametrie s lineárním skenem) křivek registrovaných při různých rychlostech polarizace. Získané EVLS záznamy byly hodnoceny dle dřívě publikovaných prací<sup>17–25</sup>.

*Postup izolace:* Izolace poly(A) byla prováděna pomocí paramagnetických částic Dynabeads Oligo (dT)25 od firmy Dynal Biotech ASA (Norsko). Zachycení nukleových kyselin polyA, ODN (oligonukleotidů) a mRNA na paramagnetické částice spočívá v hybridizaci mezi řetězcem adeninu, kterým je tvořena polyA a řetězcem thyminu ukotveným na povrchu paramagnetických částic. Paramagnetické částice byly přitahovány magnetickým stojanem MPC-S (Magnetic Particle Concentrator) firmy Dynal Biotech ASA (Norsko). Všechny experimenty s paramagnetickými částicemi byly prováděny za sterilních podmínek, které zajišťoval RNA/DNA UV cleaner box UVT-S-AR (Biosan, Litva). Pro centrifugaci a třepání

vzorků byla využita centrifuga multi-spin MSC-3000 firmy Biosan, Riga, Lotyšsko, která byla umístěna v RNA/DNA UV boxu UVT-S-AR. Proces denaturace probíhal za konstantní teploty  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  za využití přístroje Thermomixer 5355 Comfort/ Compact (Eppendorf, Hamburg, Německo).

*In vitro kultivace rostlin:* Obilky kukuřice odrůdy Gila (hybrid F1) byly sterilizovány v roztoku 5% chlornanu sodného v biohazard boxu od firmy Schoeller Instruments, Praha. Poté byly omyty v destilované vodě. Takto připravené obilky byly klíčeny na vlhkém filtračním papíru po dobu sedmi dnů ve tmě při  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Následně byla každá vyklíčená obilka umístěna do skleněné zkumavky s kultivačním médiem obsahujícím  $\text{CdCl}_2$  (0, 5, 10, 25, 50 a  $100 \mu\text{M}$ ). Kultivační médium, připravené podle Murashige-Skooga<sup>26</sup>, obsahovalo pevnou složku, kterou tvořil gerlit. Takto připravené experimentální rostliny byly umístěny do kultivačního boxu (Sanyo, Tokyo, Japonsko) s 14h osvětlením 8000 luxů, teplotou vzduchu  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  a 60% vlhkostí vzduchu a 10 h ve tmě s teplotou vzduchu  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  a 60% vlhkostí. Všechny experimenty byly uskutečněny ve třech nezávislých opakováních. Všechny chemikálie použité pro kultivaci byly zakoupeny od společnosti Duchefa (Nizozemí). Suspenzní kultura tabáku linie BY-2 byla udržována v tekutém MS médiu. Suspenze (20 ml) v 50ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce Enviromental Shaker – Incubator ES-20 od firmy Biosan Riga, Lotyšsko, za těchto kultivačních podmínek: tma, teplota  $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $135 \text{ ot min}^{-1}$ . Subkultivace byla prováděna po 3 nebo 4 dnech přenesením 2 resp. 1 ml suspenze do čerstvého média.

*Statistická analýza dat.* Úseky a směrnice kalibračních křivek studovaných nukleových kyselin byly testovány t-testem ( $P < 0,05$ ) programem STATISTICA.CZ 8.0 (StatSoft CR, Praha, Česká republika).

## Výsledky a diskuse

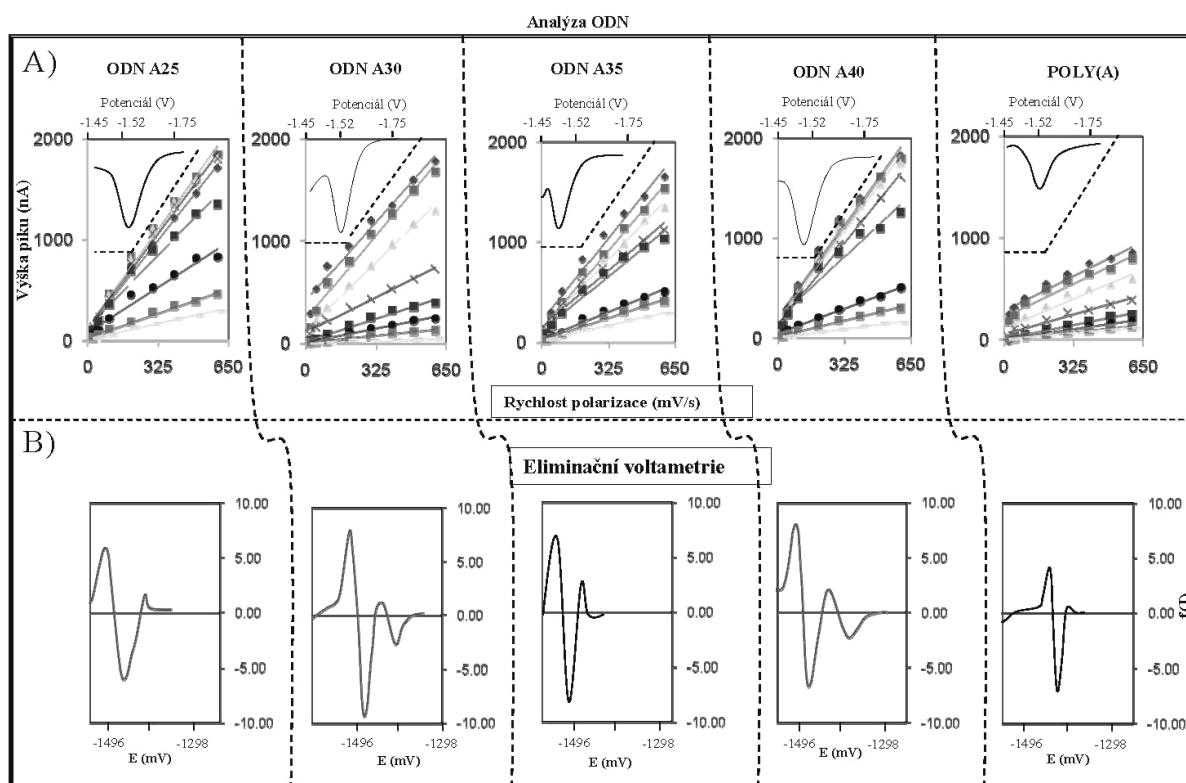
### Isolace mRNA za využití paramagnetických mikročastic

Pro izolaci nukleových kyselin byly vypracovány různé postupy vycházející z odstranění interferujících proteinů a následného vysrážení alkoholem nebo ionty těžkých kovů. Klasická izolace vykazuje stále nejvyšší výtěžky nukleové kyseliny, ale je časově náročná a vnáší do postupu řadu systematických chyb způsobených lidským faktorem. Tento závažný problém je řešen několika různými způsoby, především za využití pevných sorbentů a nejnověji pomocí paramagnetických miničastic, resp. mikročastic. Využití paramagnetických mikročastic pro poloautomatizovanou izolaci nukleových kyselin bylo nedávno popsáno v práci Huska a spol.<sup>27</sup> Zkráceně je možné postup shrnout do následujících kroků: ze zásobního roztoku se odebere 10  $\mu\text{l}$  mikročastic do mikrozkuřavky, která se přenese do magnetického stojanu, přidá se 20  $\mu\text{l}$  promývacího roztoku (0,1 M-NaCl + 50 mM- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 50 mM- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Následně se mikrozkuřavka přesune ze stojanu a krátce protřepe tak, aby se paramagnetické částice

v promývacím roztoku dostatečně rozptýlily. Následuje série kroků za použití přístroje multispin MSC-3000, u kterého se střídá centrifugace s třepáním. Oba procesy se 6 $\times$  opakují. Po odstranění zbylého promývacího roztoku se k paramagnetickým částicím přidá hybridizační roztok, který je složen z 0,5 M-NaCl, 0,1 M fosfátového pufru a 0,6 M guanidium thiokyanátu. Celkový objem hybridizačního roztoku i se vzorkem je 30  $\mu\text{l}$ . Hybridizace probíhá opět na přístroji multi-spin MSC-3000 po dobu 40 min. Po hybridizaci následuje stejné promytí paramagnetických částic, které se opět 3 $\times$  opakuje. Promyté paramagnetické částice s navázanou nukleovou kyselinou se umístí na Thermomixer 5355 a při teplotě 85  $^\circ\text{C}$  po dobu 5 min probíhá denaturace. Poté se paramagnetické částice přitáhnou magnetickým stojanem a roztok obsahující pouze mRNA se odsaje a přenese do nové sterilní mikrozkuřavky.

### Elektrochemická detekce mRNA

V naší práci jsme využili dostupné paramagnetické částice Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>, které mají na svém povrchu ukotven oligonukleotidový řetězec složený z thyminů. Principem izolace je pak komplementarita mezi



Obr. 2. (A) LSV záznamy ODN A25, A30, A35, A40 a poly(A) na HMDE. Jednotlivé přímky ukazují závislost výšky signálu na rychlosti polarizace  $\text{mV s}^{-1}$  při koncentracích 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,078125; 0,039063  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Všechny voltamogramy ve výseku byly získány při koncentraci 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . (B) Eliminační voltamogramy čtvrté eliminační funkce pro studované oligonukleotidy o koncentraci 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (rychlosti polarizace 100, 200 a 400  $\text{mV s}^{-1}$ )

Tabulka I  
Závislost výšky signálu studovaných oligonukleotidů na jejich koncentraci

Data	Potenciál píku [V]	Rovnice kalibrační přímky	R <sup>2</sup>	Rozsah linearity [μM]	LOD <sup>a</sup> [nM]	LOQ <sup>b</sup> [nM]	Relativní směrodatná odchylka [%; n = 3]
polyA <sup>25 mV/s</sup>	-1,32 ± 0,01	I = 48,98c - 4,992 <sup>(*)</sup>	0,975	0,15–1,25	0,40	1,3	4,2
polyA <sup>50 mV/s</sup>	-1,34 ± 0,01	I = 109,0c + 1,663 <sup>(*)</sup>	0,981	0,15–1,25	0,03	0,1	4,5
polyA <sup>100 mV/s</sup>	-1,38 ± 0,01	I = 179,5c + 1,768 <sup>(*)</sup>	0,993	0,15–1,25	0,02	0,07	4,0
polyA <sup>200 mV/s</sup>	-1,37 ± 0,02	I = 239,2c + 31,56	0,997	0,15–1,25	0,25	0,85	5,1
polyA <sup>300 mV/s</sup>	-1,37 ± 0,01	I = 320,6c + 51,60	0,998	0,15–1,25	0,30	1,0	5,3
polyA <sup>400 mV/s</sup>	-1,38 ± 0,02	I = 336,1c + 80,85	0,999	0,15–1,25	0,50	1,7	5,1
polyA <sup>500 mV/s</sup>	-1,39 ± 0,01	I = 343,7c + 118,0	0,994	0,15–1,25	0,69	2,3	5,3
polyA <sup>600 mV/s</sup>	-1,39 ± 0,01	I = 380,7c + 132,3	0,993	0,15–1,25	0,70	2,3	5,2
PRŮMĚR			0,991		0,36	1,2	4,8
A40 <sup>25 mV/s</sup>	-1,38 ± 0,03	I = 421,8c - 12,48 <sup>(*)</sup>	0,996	0,03–0,30	0,12	0,40	4,6
A40 <sup>50 mV/s</sup>	-1,40 ± 0,03	I = 811,6c - 27,39 <sup>(*)</sup>	0,982	0,03–0,30	0,14	0,50	5,4
A40 <sup>100 mV/s</sup>	-1,41 ± 0,03	I = 1363c - 42,26 <sup>(*)</sup>	0,971	0,03–0,30	0,12	0,40	5,2
A40 <sup>200 mV/s</sup>	-1,42 ± 0,04	I = 2345c - 70,56 <sup>(*)</sup>	0,953	0,03–0,30	0,12	0,40	4,3
A40 <sup>300 mV/s</sup>	-1,43 ± 0,04	I = 2794c - 57,65 <sup>(*)</sup>	0,967	0,03–0,30	0,10	0,35	5,0
A40 <sup>400 mV/s</sup>	-1,44 ± 0,04	I = 3402c - 61,17 <sup>(*)</sup>	0,967	0,03–0,30	0,07	0,25	4,9
A40 <sup>500 mV/s</sup>	-1,45 ± 0,04	I = 3478c - 30,47 <sup>(*)</sup>	0,973	0,03–0,30	0,04	0,15	4,7
A40 <sup>600 mV/s</sup>	-1,46 ± 0,05	I = 4020c - 37,69 <sup>(*)</sup>	0,985	0,03–0,30	0,04	0,15	4,6
PRŮMĚR			0,974		0,09	0,30	4,8
A35 <sup>25 mV/s</sup>	-1,39 ± 0,02	I = 226,1c + 2,869 <sup>(*)</sup>	0,953	0,03–0,30	0,03	0,10	5,3
A35 <sup>50 mV/s</sup>	-1,40 ± 0,03	I = 497,3c - 4,347 <sup>(*)</sup>	0,971	0,03–0,30	0,04	0,15	5,4
A35 <sup>100 mV/s</sup>	-1,42 ± 0,03	I = 792,0c + 14,47 <sup>(*)</sup>	0,911	0,03–0,30	0,04	0,15	4,3
A35 <sup>200 mV/s</sup>	-1,50 ± 0,18	I = 1425c + 52,39 <sup>(*)</sup>	0,970	0,03–0,30	0,07	0,25	4,9
A35 <sup>300 mV/s</sup>	-1,44 ± 0,04	I = 1855c + 78,39 <sup>(*)</sup>	0,965	0,03–0,30	0,09	0,30	5,6
A35 <sup>400 mV/s</sup>	-1,45 ± 0,04	I = 2269c + 102,5 <sup>(*)</sup>	0,967	0,03–0,30	0,09	0,30	5,1
A35 <sup>500 mV/s</sup>	-1,46 ± 0,04	I = 2507c + 132,4 <sup>(*)</sup>	0,968	0,03–0,30	0,11	0,40	5,3
A35 <sup>600 mV/s</sup>	-1,45 ± 0,03	I = 2680c + 159,3 <sup>(*)</sup>	0,974	0,03–0,30	0,12	0,40	5,8
PRŮMĚR			0,960		0,07	0,25	5,2
A30 <sup>25 mV/s</sup>	-1,34 ± 0,01	I = 63,88c + 0,391 <sup>(*)</sup>	0,990	0,03–0,30	0,01	0,04	5,3
A30 <sup>50 mV/s</sup>	-1,36 ± 0,02	I = 127,2c + 1,224 <sup>(*)</sup>	0,984	0,03–0,30	0,02	0,07	5,0
A30 <sup>100 mV/s</sup>	-1,38 ± 0,03	I = 266,9c + 2,652 <sup>(*)</sup>	0,974	0,03–0,30	0,02	0,07	4,8
A30 <sup>200 mV/s</sup>	-1,40 ± 0,03	I = 519,3c + 13,17 <sup>(*)</sup>	0,974	0,03–0,30	0,05	0,17	4,6
A30 <sup>300 mV/s</sup>	-1,41 ± 0,03	I = 802,0c + 5,260 <sup>(*)</sup>	0,992	0,03–0,30	0,01	0,04	5,3
A30 <sup>400 mV/s</sup>	-1,42 ± 0,04	I = 1015c + 6,956 <sup>(*)</sup>	0,990	0,03–0,30	0,01	0,04	5,4
A30 <sup>500 mV/s</sup>	-1,42 ± 0,04	I = 1126c + 16,43 <sup>(*)</sup>	0,972	0,03–0,30	0,03	0,10	5,1
A30 <sup>600 mV/s</sup>	-1,41 ± 0,01	I = 1236c + 19,39 <sup>(*)</sup>	0,975	0,03–0,30	0,03	0,10	4,9
PRŮMĚR			0,981		0,02	0,07	5,1

<sup>a</sup> Mez detekce (Limit of Detection – LOD) určený jako 3 signál/šum (S/N), kde N vyjadřuje směrodatnou odchylku šumu, <sup>b</sup> mez stanovitelnosti (Limit of Quantification – LOQ) určený jako 10 S/N, I – proudová výška píku (nA), c – koncentrace studované nukleové kyseliny (μg ml<sup>-1</sup>), <sup>(\*)</sup> – úsek rovnice kalibrační křivky studovaných nukleových kyselin je statisticky nevýznamný (P < 0,05)

Tabulka I  
Pokračování

Data	Potenciál píku [V]	Rovnice kalibrační přímky	R <sup>2</sup>	Rozsah linearity [μM]	LOD <sup>a</sup> [nM]	LOQ <sup>b</sup> [nM]	Relativní směrodatná odchylka [%; n = 3]
A25 <sup>25 mV/s</sup>	-1,38 ± 0,01	I = 308,3c + 6,087 <sup>(*)</sup>	0,942	0,03–0,30	0,04	0,14	5,4
A25 <sup>50 mV/s</sup>	-1,41 ± 0,03	I = 570,1c + 6,739 <sup>(*)</sup>	0,995	0,03–0,30	0,02	0,07	5,6
A25 <sup>100 mV/s</sup>	-1,43 ± 0,04	I = 1105c + 20,13 <sup>(*)</sup>	0,986	0,03–0,30	0,04	0,14	5,0
A25 <sup>200 mV/s</sup>	-1,44 ± 0,04	I = 2108c + 52,69 <sup>(*)</sup>	0,965	0,03–0,30	0,05	0,17	5,2
A25 <sup>300 mV/s</sup>	-1,45 ± 0,04	I = 2672c + 72,78 <sup>(*)</sup>	0,995	0,03–0,30	0,05	0,17	4,7
A25 <sup>400 mV/s</sup>	-1,46 ± 0,04	I = 3010c + 120,5 <sup>(*)</sup>	0,987	0,03–0,30	0,08	0,27	4,3
A25 <sup>500 mV/s</sup>	-1,47 ± 0,05	I = 3746c + 128,2 <sup>(*)</sup>	0,977	0,03–0,30	0,07	0,24	4,1
A25 <sup>600 mV/s</sup>	-1,47 ± 0,05	I = 3881c + 162,6 <sup>(*)</sup>	0,992	0,03–0,30	0,08	0,27	4,6
PRŮMĚR			0,980		0,05	0,17	4,9

<sup>a</sup> Mez detekce (Limit of Detection – LOD) určený jako 3 signál/šum (S/N), kde N vyjadřuje směrodatnou odchylku šumu, <sup>b</sup> mez stanovitelnosti (Limit of Quantification – LOQ) určený jako 10 S/N, I – proudová výška píku (nA), c – koncentrace studované nukleové kyseliny (μg ml<sup>-1</sup>), <sup>(\*)</sup> – úsek rovnice kalibrační křivky studovaných nukleových kyselin je statisticky nevýznamný (P < 0,05)

oligoT řetězcem a poly(A) řetězcem obsaženým na polyadenylační sekvenci, jenž je součástí každé molekuly mRNA (obr. 1). Lze tak získat 100% čistou molekulu mRNA. V našem experimentu jsme nejdříve sledovali interakci paramagnetických částic se syntetickými oligonukleotidy (ODN) o různé délce řetězce (25, 30, 35, 40 a poly(A)). Izolované molekuly jednotlivých ODN (podrobný postup je uveden v části materiály a metody) byly následně elektrochemicky analyzovány voltametrií s lineárním skenem při různých rychlostech polarizace (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 a 600 mV s<sup>-1</sup>) a době akumulace ODN na HMDE 240 s (obr. 2A). Potenciál píku se pohyboval kolem -1,3 až -1,4 V (vs. Ag/AgCl/3 M-KCl). Podrobné elektroanalytické hodnocení studovaných ODN je uvedeno v tab. I a tab. II.

Kalibrační křivky ( $I_p$  v závislosti na koncentraci ODN) byly lineární (R<sup>2</sup> = od 0,960 do 0,991, detaily v tab. I). Úseky získaných kalibračních křivek byly statisticky testovány. Statisticky významné úseky kalibračních křivek byly naměřeny pouze v případě poly(A) za vyšších rychlostí polarizace. Průměrné limity detekce se pohybovaly od 0,020 do 0,360 nM (3 S/N) a limity kvantifikace od 0,080 do 1,200 nM (10 S/N). Relativní směrodatná odchylka stanovení jednotlivých ODN kolísala od 4,8 do 5,2 %.

Na základě zhodnocení získaných voltametriických dat (ze závislosti log  $I_p$  na log v) bylo možné potvrdit, že se jedná o adsorpci kontrolovaný elektrodový proces. Na základě směrnice přímek potenciálu píku vs. logaritmu rychlosti polarizace jsme vypočetli hodnoty součinu koeficientu přenosu náboje a počtu elektronů vstupujících do nejpomalejšího kroku ( $\alpha n$ ) pro ireverzibilní elektrodový proces redukce (tab. II). Celkový počet vyměněných elektronů při elektroredukci bází nukleových kyselin byl 2.

Pomocí navrženého elektrochemického senzoru jsme sledovali hladinu mRNA izolované z rostlin tabáku a kukuřice kultivovaných v podmínkách explantátové kultury. Pro experiment bylo použito velmi malé množství vzorku (okolo 100 mg) ve třech nezávislých opakováních. Na paramagnetických částicích izolovaná mRNA poskytla redukční píky (cytosinu a adeninu) lineárně závislé na výšce píku a rychlosti polarizace (R<sup>2</sup> = 0,999) a  $\alpha n$  bylo podobné jako u syntetických ODN (1,73 a 1,74). Pro přesnější charakterizaci elektrodového procesu s přenosem náboje v adsorbovaném stavu byla voltametriická data podrobena eliminační proceduře. Získané eliminační voltamogramy pomocí funkce E4 (eliminace kinetického a kapacitního proudu a zachování proudu difúzního) jsou ukázány na obr. 2B. Podle tvaru signálu (pík-protipík) je patrné, že se nukleové kyseliny na povrchu elektrody chovají jako adsorbované částice.

#### *In vitro* kultivované rostliny kukuřice v přítomnosti kademnatých iontů

Navrženým postupem byla izolována mRNA ze suspenzní kultury BY2 tabáku a z rostlin kukuřice bez ovlivnění Cd(II). Na získaných voltametriických záznamech byly pozorovány dobře rozlišené píky při potenciálu kolem -1,5 V (vs. Ag/AgCl/3 M-KCl) jak je ukázáno na obr. 3A. Izolované molekuly mRNA tabáku a kukuřice byly následně elektrochemicky analyzovány voltametrií s lineárním skenem při různých rychlostech polarizace (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 a 600 mV s<sup>-1</sup>) a době akumulace ODN na HMDE 240 s (obr. 3A). Elektrochemické chování mRNA izolované z rostlin tabáku a kukuřice je podrobně popsáno v tab. III. Pozorované změny pravděpodobně

Tabulka II

Elektrochemické chování oligonukleotidů na HMDE po jejich separaci za využití paramagnetických mikročastic

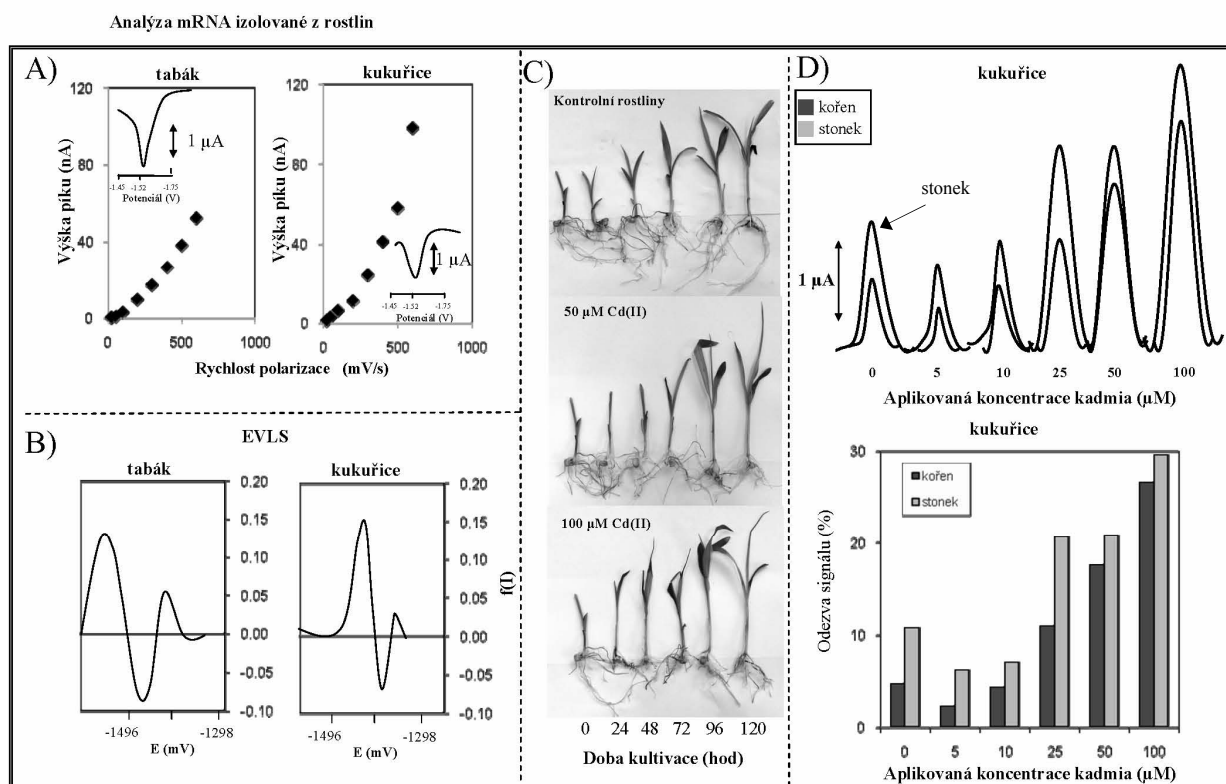
Nukleová kyselina	Rovnice A <sup>a</sup>	Elektrodový proces <sup>b</sup>	R <sup>2</sup>	Rovnice B <sup>c</sup>	$\alpha$ <sup>d</sup>	$\alpha n$ <sup>d</sup>
polyA <sup>5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,398 \log v + 1,825$	0,602	0,996	$E_p = 0,088 \log v + 1,172$	0,39	1,73
polyA <sup>2,5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,468 \log v + 1,594$	0,283	0,995	$E_p = 0,061 \log v + 1,229$	0,56	1,72
polyA <sup>1,25</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,717 \log v + 0,838$	0,274	0,972	$E_p = 0,049 \log v + 1,257$	0,69	1,74
polyA <sup>0,6</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,726 \log v + 0,598$	0,274	0,952	$E_p = 0,048 \log v + 1,262$	0,69	1,77
polyA <sup>0,3</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 1,137 \log v - 0,687$	-0,137	0,979	$E_p = 0,048 \log v + 1,260$	0,69	1,77
polyA <sup>0,15</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 1,152 \log v - 0,861$	-0,152	0,978	$E_p = 0,046 \log v + 1,264$	0,70	1,83
polyA <sup>0,08</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,987 \log v - 0,585$	0,013	0,983	$E_p = 0,046 \log v + 1,258$	0,72	1,78
polyA <sup>0,04</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 1,069 \log v - 0,861$	-0,69	0,972	$E_p = 0,045 \log v + 1,254$	0,78	1,68
PRŮMĚR		0,058	0,978		0,65	1,75
A40 <sup>5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,759 \log v + 1,173$	0,241	0,995	$E_p = 0,061 \log v + 1,342$	0,57	1,71
A40 <sup>2,5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,817 \log v + 1,015$	0,183	0,995	$E_p = 0,060 \log v + 1,339$	0,57	1,72
A40 <sup>1,25</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,803 \log v + 1,033$	0,197	0,998	$E_p = 0,073 \log v + 1,273$	0,48	1,68
A40 <sup>0,6</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,784 \log v + 1,032$	0,216	0,997	$E_p = 0,055 \log v + 1,293$	0,64	1,69
A40 <sup>0,3</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,725 \log v + 1,121$	0,275	0,989	$E_p = 0,057 \log v + 1,285$	0,60	1,72
A40 <sup>0,15</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,717 \log v + 0,686$	0,283	0,998	$E_p = 0,048 \log v + 1,287$	0,70	1,76
A40 <sup>0,08</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,877 \log v + 0,055$	0,123	0,998	$E_p = 0,049 \log v + 1,265$	0,71	1,70
A40 <sup>0,04</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,967 \log v - 0,452$	0,033	0,996	$E_p = 0,048 \log v + 1,264$	0,70	1,76
PRŮMĚR		0,187	0,996		0,63	1,72
A35 <sup>5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,737 \log v + 1,191$	0,263	0,994	$E_p = 0,065 \log v + 1,347$	0,52	1,75
A35 <sup>2,5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,780 \log v + 1,022$	0,22	0,998	$E_p = 0,085 \log v + 1,274$	0,39	1,79
A35 <sup>1,25</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,739 \log v + 1,078$	0,261	0,998	$E_p = 0,050 \log v + 1,319$	0,70	1,69
A35 <sup>0,6</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,717 \log v + 1,080$	0,283	0,996	$E_p = 0,050 \log v + 1,312$	0,67	1,76
A35 <sup>0,3</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,816 \log v + 0,791$	0,184	0,993	$E_p = 0,051 \log v + 1,307$	0,67	1,73
A35 <sup>0,15</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,899 \log v + 0,233$	0,101	0,993	$E_p = 0,052 \log v + 1,268$	0,64	1,76
A35 <sup>0,08</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,988 \log v - 0,090$	0,012	0,994	$E_p = 0,042 \log v + 1,288$	0,81	1,74
A35 <sup>0,04</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,941 \log v - 0,128$	0,059	0,971	$E_p = 0,042 \log v + 1,283$	0,85	1,65
PRŮMĚR		0,173	0,992		0,65	1,73
A30 <sup>5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,529 \log v + 1,774$	0,471	0,983	$E_p = 0,061 \log v + 1,325$	0,53	1,83
A30 <sup>2,5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,719 \log v + 1,245$	0,281	0,984	$E_p = 0,065 \log v + 1,295$	0,52	1,75
A30 <sup>1,25</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,762 \log v + 1,003$	0,238	0,997	$E_p = 0,064 \log v + 1,257$	0,51	1,80
A30 <sup>0,6</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,650 \log v + 1,045$	0,35	0,996	$E_p = 0,076 \log v + 1,220$	0,42	1,84
A30 <sup>0,3</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,960 \log v - 0,018$	0,04	0,995	$E_p = 0,050 \log v + 1,259$	0,68	1,74
A30 <sup>0,15</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,981 \log v - 0,295$	0,019	0,994	$E_p = 0,048 \log v + 1,262$	0,70	1,76
A30 <sup>0,08</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,964 \log v - 0,537$	0,036	0,992	$E_p = 0,050 \log v + 1,258$	0,68	1,74
A30 <sup>0,04</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,998 \log v - 1,074$	0,002	0,987	$E_p = 0,050 \log v + 1,261$	0,75	1,59
PRŮMĚR		0,180	0,991		0,59	1,75

<sup>a</sup> Rovnice A – vliv rychlosti polarizace ( $v$ ) na výšku píku ( $I$ ), závislost  $\log I$  na  $\log v$ , <sup>b</sup> elektroodový proces určený jako rozdíl mezi teoretickou hodnotou 1 – hodnota směrnice přímky, <sup>c</sup> rovnice B vliv rychlosti polarizace ( $v$ ) na potenciál píku ( $E_p$ ), závislost  $E_p$  na  $\log v$ , <sup>d</sup>  $\alpha = 47,7/E_p - E_p/2$ ;  $\alpha$  – koeficient přenosu náboje

Tabulka II  
Pokračování

Nukleová kyselina	Rovnice A <sup>a</sup>	Elektroodový proces <sup>b</sup>	R <sup>2</sup>	Rovnice B <sup>c</sup>	$\alpha$ <sup>d</sup>	$\alpha n$ <sup>d</sup>
A25 <sup>5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,880 \log v + 0,807$	0,12	0,992	$Ep = 0,058 \log v + 1,356$	0,59	1,73
A25 <sup>2,5</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,913 \log v + 0,770$	0,087	0,992	$Ep = 0,056 \log v + 1,357$	0,59	1,79
A25 <sup>1,25</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,841 \log v + 0,946$	0,159	0,998	$Ep = 0,061 \log v + 1,347$	0,54	1,81
A25 <sup>0,6</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,845 \log v + 0,918$	0,155	0,999	$Ep = 0,063 \log v + 1,338$	0,55	1,69
A25 <sup>0,3</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,840 \log v + 0,843$	0,16	0,993	$Ep = 0,050 \log v + 1,307$	0,65	1,81
A25 <sup>0,15</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,830 \log v + 0,661$	0,17	0,989	$Ep = 0,050 \log v + 1,305$	0,69	1,71
A25 <sup>0,08</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,897 \log v + 0,190$	0,103	0,997	$Ep = 0,041 \log v + 1,290$	0,87	1,66
A25 <sup>0,04</sup> $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,989 \log v - 0,253$	0,011	0,995	$Ep = 0,043 \log v + 1,286$	0,77	1,79
PRŮMĚR		0,121	0,994		0,65	1,75

<sup>a</sup> Rovnice A – vliv rychlosti polarizace ( $v$ ) na výšku piku ( $I$ ), závislost  $\log I$  na  $\log v$ , <sup>b</sup> elektroodový proces určený jako rozdíl mezi teoretickou hodnotou 1 – hodnota směrnice přímky, <sup>c</sup> rovnice B vliv rychlosti polarizace ( $v$ ) na potenciál piku ( $Ep$ ), závislost  $Ep$  na  $\log v$ , <sup>d</sup>  $\alpha = 47,7/Ep - Ep/2$ ;  $\alpha$  – koeficient přenosu náboje



Obr. 3. (A) Závislost výšky signálu (nA) na rychlosti polarizace. Křivky ve výseku byly získány po izolaci mRNA z rostlin kukuřice a suspenzní kultury tabáku. Navážka vzorku byla 0,2 g. (B) Eliminační voltamogramy čtvrté eliminační funkce pro reálné vzorky při rychlostech polarizace 100, 200 a 400  $\text{mV s}^{-1}$ . (C) Fotografie rostlin kukuřice vystavených abiotickému stresu způsobenému kadmiovými ionty. V závislosti na době kultivace a koncentraci  $\text{Cd(II)}$ . (D) LSV záznamy reálných vzorků mRNA z tabáku a kukuřice na HMDE. Závislost na koncentraci kadmiových iontů ( $\mu\text{M}$ ) a odezvy signálu (%)

Tabulka III

Elektrochemické chování mRNA izolované z rostlin tabáku a kukuřice pomocí paramagnetických mikročásteček na HMDE

Nukleová kyselina	Rovnice A <sup>a</sup>	Elektrodový proces <sup>b</sup>	R <sup>2</sup>	Rovnice B <sup>c</sup>	$\alpha$ <sup>d</sup>	$\alpha n$ <sup>d</sup>
mRNA <sup>tabák</sup>	$I = 1,685c - 2,937$	-0,685	0,999	$I = 0,043c + 1,264$	0,80	1,73
mRNA <sup>kukuřice</sup>	$I = 1,274c - 1,700$	-0,274	0,976	$I = 0,047c + 1,260$	0,72	1,74

<sup>a</sup> Rovnice A – vliv rychlosti polarizace ( $v$ ) na výšku píku ( $I$ ), závislost  $\log I$  na  $\log v$ , <sup>b</sup> elektrodový proces určený jako rozdíl mezi teoretickou hodnotou  $I$  – hodnota směrnice přímky, <sup>c</sup> rovnice B vliv rychlosti polarizace ( $v$ ) na potenciál píku ( $E_p$ ), závislost  $E_p$  na  $\log v$ , <sup>d</sup>  $\alpha = 47,7/(E_p - E_p/2)$ ;  $\alpha$  – koeficient přenosu náboje

souvisí s více složitými procesy na pracovních elektrodách a také se sekvencí izolovaných mRNA (cit.<sup>28</sup>). Čtvrtá funkce EVLS u mRNA tabáku a kukuřice opět ukazuje typický obrázek adsorbované částice – signál ve tvaru píku-protipíku (obr. 3B).

V dalším experimentu byly sledovány rostliny kukuřice vystavené abiotickému stresu způsobenému kadmnatými ionty. Z růstové charakteristiky bylo zřejmé, že se zvyšující se koncentrací kadmnatých iontů a dobou kultivace byl růst rostlin inhibován a rostliny vykazovaly morfologické rozdíly (menší počet listů, degradované části listů, celková inhibice růstu) na rozdíl od rostlin kontrolních (obr. 3C).

Histochemicky byly sledovány změny v pletivech (thiolových a flavonoidních sloučenin).  $K_3[Fe(CN)_6]$  je v pletivech redukováno látkami s volnými –SH skupinami na modře zbarvené redukční produkty. U kontrolních rostlin byla přítomnost látek s volnými –SH skupinami omezena pouze na rhizodermis (pokožka kořene). Vyšší syntéza látek s –SH skupinami byla pozorována v případě 10  $\mu$ M koncentrace Cd(II). Naopak téměř žádné látky s volnými –SH skupinami nebyly prokázány u dvou nejvyšších koncentrací kadmia. Zde bylo pozorováno, že v buňkách mezodermis docházelo k syntéze červeně zbarvených látek, tj. látek ze skupiny polyfenolů s výraznými antioxidačními vlastnostmi (další podrobnosti jsou uveřejněny v práci Húska a spol.<sup>27</sup>).

Vliv zvyšující se koncentrace Cd(II) na rostliny kukuřice v nadzemní i podzemní části ukazuje obr. 3D. V horní části jsou zobrazeny voltamogramy izolované mRNA ze stonkové a kořenové části kukuřice po ovlivnění Cd(II) v prvním dni experimentu. Obsahy mRNA jsou přepočteny na koncentraci poly(A) podle kalibrační křivky tab. I. Množství izolované mRNA se pohybovalo od 10 do 30  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> po jejich přepočtu na polyA. Z výsledků se dá předpokládat, že rostliny vystavené abiotickému stresu jsou nuceny zvýšit syntézu různých biologicky aktivních molekul, jako jsou sloučeniny obsahující volné –SH skupiny (glutathion, fytochelatin, proteiny podobné metalothioneinu). Řada takových molekul je syntetizována chemickou reakcí, avšak enzymy účastníci se těchto reakcí jsou genově regulovány. Z těchto příčin je možné pozorovat zvýšenou expresi určité skupiny genů, které povedou k nárůstu hladiny celkové mRNA (transkriptomu)

v rostlinách. V takto velmi dobře charakterizované mRNA je možné hledat specifickou sekvenci konkrétního genu. V oblasti stresové reakce na kadmnaté ionty u rostlin jsou to geny spojené s aktivitou thiolových sloučenin (glutathionu a fytochelatinu).

## Závěr

Isolace a detekce nukleových kyselin bude hrát stále významnější roli v oblasti trvale udržitelných průmyslově využitelných technologií. Navrhovaný postup využívající paramagnetické částice ve spojení s elektrochemickou detekcí je pro takové účely velmi vhodný. Při působení stresového faktoru v podobě kadmnatých iontů dochází ke zvyšování množství mRNA ve vzorcích.

*Prezentované výsledky bylo možné získat za podpory projektů GA ČR 102/08/1546 a INCHEMBIOL MSM0021622412. Za histochemické analýzy autoři děkují Doc. Petrovi Babulovi z FF VFU v Brně.*

## LITERATURA

- Adam V., Petřlová J., Potěšil D., Lubal P., Zehnálek J., Sures B., Kizek R.: Chem. Listy 99, 353 (2005).
- Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Kubáň V.: Chem. Listy 97, 1003 (2003).
- Kravčuková P., Mareková M., Ostro A.: Chem. Listy 102, 15 (2008).
- Polohová V., Šnejdárková M.: Chem. Listy 102, 173 (2008).
- Vopálenský P., Ruml T., Kotrba P.: Chem. Listy 101, 468 (2007).
- Zajoncová L., Šebela M.: Chem. Listy 101, 36 (2007).
- Húska D., Hubálek J., Adam V., Kizek R.: Electroanalysis 29, 4964 (2008).
- Paleček E., Fojta M.: Talanta 74, 276 (2007).
- Paleček E., Fojta M., Jelen F.: Bioelectrochemistry 56, 85 (2002).
- Paleček E., Jelen F.: Crit. Rev. Anal. Chem. 32, 261 (2002).
- Paleček E., Kizek R., Havran L., Billová S., Fojta M.:



- Anal. Chim. Acta 469, 73 (2002).
12. Paleček E., Masařík M., Kizek R., Kuhlmeier D., Hassmann J., Schulein J.: Anal. Chem. 76, 5930 (2004).
  13. Paleček E., Billová S., Havran L., Kizek R., Miculková A., Jelen F.: Talanta 56, 919 (2002).
  14. Húska D., Adam V., Trnková L., Kizek R.: J. Magn. Magn. Mater. 321, 1474 (2009).
  15. Húska D., Křížková S., Adam V., Hubálek J., Trnková L., Průša R., Havel L., Kizek R.: Tumor Biol. 28, 124 (2007).
  16. Průša R., Kukačka J., Vajtr D., Húska D., Alba J., Adam V., Kizek R.: Clin. Chem. 54, A156 (2008).
  17. Mikelová R., Trnková L., Jelen F.: Electroanalysis 19, 1807 (2007).
  18. Mikelová R., Trnková L., Jelen F., Adam V., Kizek R.: Electroanalysis 19, 348 (2006).
  19. Jelen F., Kouřilová A., Hason S., Kizek R., Trnková L.: Electroanalysis 21, 439 (2008).
  20. Dračka O.: J. Electroanal. Chem. 402, 19 (1996).
  21. Skopalová J., Navrátil T.: Chem. Anal. 52, 961 (2007).
  22. Trnková L.: Chem. Listy 95, 518 (2001).
  23. Trnková L., Jelen F., Petrlová J., Adam V., Potěšil D., Kizek R.: Sensors 5, 448 (2005).
  24. Trnková L., Kizek R., Dračka O.: Electroanalysis 12, 905 (2000).
  25. Trnková L., Jelen F., Postbieglová I.: Electroanalysis 15, 1529 (2003).
  26. Murashige T., Skoog F.: Physiol. Plant. 15, 473 (1962).
  27. Húska D., Hubálek J., Adam V., Vajtr D., Horna A., Trnková L., Havel L., Kizek R.: Talanta 79, 402 (2009).
  28. Trnková L., Postbieglová I., Holík M.: Bioelectrochemistry 63, 25 (2003).

**D. Húska<sup>a</sup>, V. Adam<sup>a,b</sup>, L. Trnková<sup>c</sup>, and R. Kizek<sup>a</sup>**  
(<sup>a</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, <sup>b</sup>Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University, Brno, <sup>c</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno):  
**Electrochemical Detection of mRNA Isolated from Plant Tissues Using Paramagnetic Microparticles**

The aim of this study was to utilize paramagnetic microparticles in isolation of mRNA using electrochemical detection. In this way mRNA from maize seedlings treated with a Cd(II) salt was isolated. The interaction of paramagnetic particles with synthetic oligo- and polynucleotides of various chain lengths was investigated. The average detection limits were 0.020–0.360 nM and the quantification limits 0.080–1.200 nM.

## VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 1-NITROPYRENU A 1-AMINOPYRENU NA BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

OKSANA YOSYPCHUK\*,  
KAROLINA PECKOVÁ a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
oksana.yosypchuk@seznam.cz

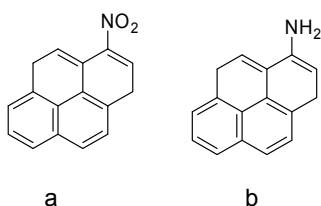
Došlo 24.7.09, přijato 12.11.09.

**Klíčová slova:** 1-nitropyren, 1-aminopyren, borem dopovaná diamantová filmová elektroda, diferenční pulsní voltametrie

### Úvod

1-Nitropyren (1-NP) patří mezi nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH), které jsou významnou skupinou ekotoxických a karcinogenních kontaminantů životního prostředí a představují značný rizikový faktor pro zdraví člověka. Již od konce 70. let je zřejmé, že jsou přítomny ve všech složkách životního prostředí, do něhož pronikají jako důsledek spalovacích procesů<sup>1</sup>. Jsou významnou součástí výfukových plynů naftových i benzínových motorů. V emisích naftových motorů, bylo zjištěno více než padesát NPAH, přičemž převládající sloučeninou je právě 1-NP (cit.<sup>2</sup>) (obr. 1). Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (IARC) řadí tuto látku do skupiny 2B, tj. mezi podezřelé karcinogeny pro člověka.

1-Aminopyren (1-AP) patří do skupiny amino derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH),



Obr. 1. Strukturální vzorce 1-nitropyrenu (a) a 1-aminopyrenu (b)

kteří jsou také známé svými karcinogenními účinky a hojným výskytem v životním prostředí a navíc jsou metabolity příslušných NPAH (cit.<sup>3</sup>). Konkrétně 1-AP je jedním z produktů přeměny 1-NP v savcích organismech a byl nalezen v moči, stolici, krvi, ledvinách, játrech a plicích laboratorních zvířat exponovaných 1-NP (cit.<sup>4</sup>). Rovněž se používá jako biomarker pro biologické monitorování expozice NPAH (cit.<sup>3</sup>). Přestože IARC tuto látku dosud neklasifikovala z hlediska jejích možných karcinogenních účinků, na základě analogie s řadou strukturně příbuzných aromatických aminů, lze důvodně předpokládat její genotoxické účinky.

Polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich deriváty se obecně stanovují nejčastěji chromatografickými technikami vzhledem k jejich mimořádné selektivitě, citlivosti a vhodnosti pro sériové analýzy. Jelikož nitroskupina a aminoskupina na aromatickém systému jsou elektrochemicky aktivní, je možno k jejich stanovení použít i moderní voltametrické metody. Pro tyto účely se používají rtuťové<sup>5</sup>, amalgámové<sup>6,7</sup>, uhlíkové<sup>8</sup> a další pracovní elektrody. Borem dopovaná diamantová filmová elektroda (BDDFE) patří mezi nejnovější typy elektrod odpovídající konceptu tzv. zelené analytické chemie. Kvůli svým vhodným mechanickým a elektrochemickým vlastnostem se používá i pro stanovení NPAH (cit.<sup>9</sup>) a APAH (cit.<sup>10</sup>). Vzhledem k tomu, že v literatuře doposud nebyla nalezena zmínka o stanovení 1-NP a 1-AP na BDDFE, byla v předkládané studii věnována pozornost právě této problematice. Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou i chemickou stabilitou. Je jedním z nejlepších přírodních izolátorů a pro jeho elektroanalytické využití<sup>11</sup> je nutné jej dopovat atomy jiných prvků, nejčastěji atomy boru. Hlavní výhody<sup>12–17</sup>, které činí borem dopovaný diamant neobyčejně perspektivním elektrodovým materiálem, jsou:

- nízká kapacita elektrické dvojvrstvy mající za následek nízký zbytkový proud a velmi malý šum,
- široké potenciálové okno zhruba od  $-1,5$  V do  $+1,5$  V v  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ,
- parafinický charakter povrchu ( $\text{sp}^3$  hybridizované atomy uhlíku) mající za následek nízkou adsorpci látek na tomto elektrodovém materiálu, což snižuje pravděpodobnost deaktivace zablokováním aktivních center na povrchu a tudíž minimalizuje problémy související s pasivací elektrody produkty elektrodové reakce či interferenty v analyzovaném roztoku,
- mechanická robustnost a stabilita umožňující využití těchto elektrod v průtokových systémech,
- biokompatibilita umožňující snadnou implantaci těchto elektrod do živé tkáně s minimální pravděpodobností negativní biologické odezvy.

Elektrochemické vlastnosti diamantových filmových elektrod jsou ovlivněny zejména typem dopantu a jeho

\* Oksana Yosypchuk se s touto prací úspěšně zúčastnila soutěže O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

koncentrací, morfologickými vlastnostmi (přítomností povrchových defektů), přítomností nečistot uhlíku nemající strukturu diamantu a druhem povrchové terminace (H, F, O aj.). V našem případě byl diamantový film terminován vodíkem. Takový povrch má obdobnou strukturu jako alkany, a proto má jen velmi nízkou tendenci adsorbovat polární sloučeniny z roztoku. Díky tomu jsou elektrodové procesy, které zahrnují adsorpci intermediátu na povrch elektrody (např. vývoj vodíku, kyslíku nebo halogenů), silně zpomaleny.

Cílem této práce bylo na základě studia elektrochemického chování roztoků 1-NP a 1-AP ve vodně-methanolicím prostředí nalézt optimální podmínky pro jejich stanovení metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV) na BDDFE.

## Experimentální část

### Reagencie

Zásobní roztok 1-NP (čistota p. a., 99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,02473 g 1-NP v methanolu (čistota p. a., 99,8%, Penta, ČR) za pomoci ultrazvuku a doplněním na celkový objem 100 ml. Zásobní roztok 1-AP (čistota p. a., 99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,02171 g 1-AP v methanolu a doplněním na celkový objem 100 ml.

Dále byl použit 2-propanol pro spektrofotometrii (Merck, SRN), kyselina boritá (p. a., Lachema, Brno), kyselina orthofosforečná (p. a., 85%, Lach-Ner, ČR), octová kyselina (p. a., 99,8%, Lach-Ner, ČR), hydroxid sodný (p. a., Lach-Ner, ČR), deionizovaná voda (Milli-Q plus systém, Millipore, USA).

Brittonův-Robinsonův (BR) pufr o pH 2–12 byl připraven obvyklým způsobem, tj. smísením kyselé složky (obsahující kyselinu boritou, octovou kyselinu a kyselinu fosforečnou o koncentraci  $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$ ) a složky zásadité obsahující  $0,2 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$ .

### Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna na přístroji Eco-Tribo Polarograf PC-ETP (Polaro-Sensors, Praha) s programem PolarPro verze 5 (Eco-Trend Plus, Praha). Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení s argentchloridovou referenční elektrodou ( $3 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$ , typ RAE 113, Monokrystaly, Turnov, ČR) a pomocnou platinovou plíškovou elektrodou (typ PPE, Monokrystaly, Turnov, ČR).

Jako pracovní elektroda byla použita BDDFE (průměr 3 mm, plocha  $7,1 \text{ mm}^2$ , výř. č. D-112-SA, Windsor Scientific, Velká Británie). Dále byl použit digitální pH-metr Jenway 4330 (Jenway, Chelmsford, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou a ultrazvuková lázeň: PSO 200A Ultrasonic Compact Cleaner (Notus-powersonic, Vrable, Slovensko).

### Pracovní postupy

Byla použita diferenční pulsní voltametrie (DPV) s následujícími parametry: polarizační rychlost  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , pulsy o šířce 100 ms, modulační amplituda  $-50 \text{ mV}$  pro měření 1-NP a  $+50 \text{ mV}$  pro měření 1-AP. Elektrochemická regenerace BDDFE byla v případě 1-NP prováděna před každým měřením pomocí padesáti potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3 \text{ s}$  a  $E_{\text{reg}}^2 = -500 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3 \text{ s}$ . V případě 1-AP nebylo nutno regeneraci provádět. Po ukončení měření byla pracovní elektroda uchovávána v deionizované vodě.

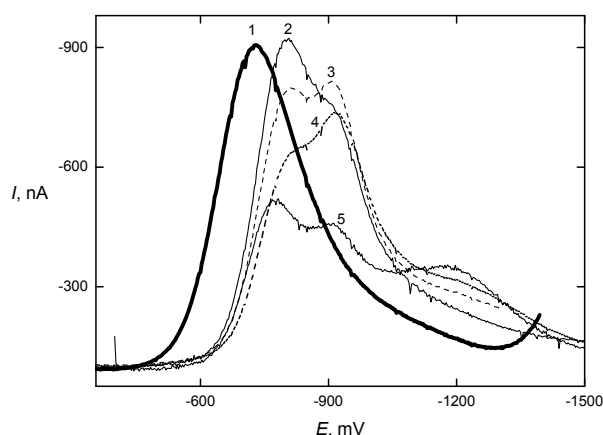
Při přípravě roztoku 1-NP a 1-AP pro voltametrické měření se postupovalo následovně: do odměrné baňky na 10 ml bylo odměřeno dané množství roztoku 1-NP nebo 1-AP v methanolu, přidán methanol do celkového objemu 7 ml a roztok byl doplněn po značku BR pufrém o daném pH. Vzdušný kyslík byl z roztoku odstraňován pětiminutovým probubláním dusíkem. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě.

Výška píků obou sledovaných látek při diferenční pulsní voltametrické měření byla vyhodnocována od spojnice minim před a za píkem.

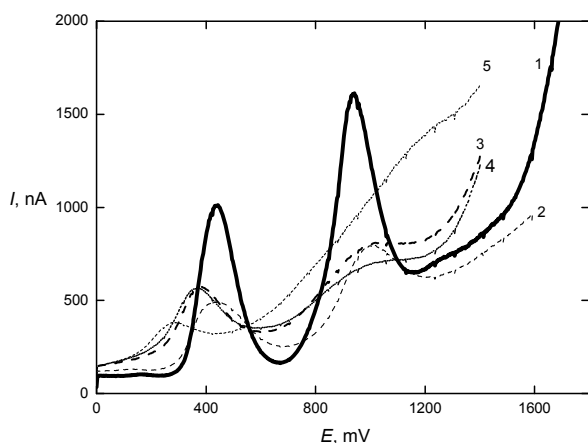
Mez detekce (LOD) byla počítána jako trojnásobek směrodatné odchylky stanovení odpovídající nejnižšímu bodu proměřené koncentrační závislosti a mez stanovitelnosti (LOQ) jako desetinásobek této směrodatné odchylky.

## Výsledky a diskuse

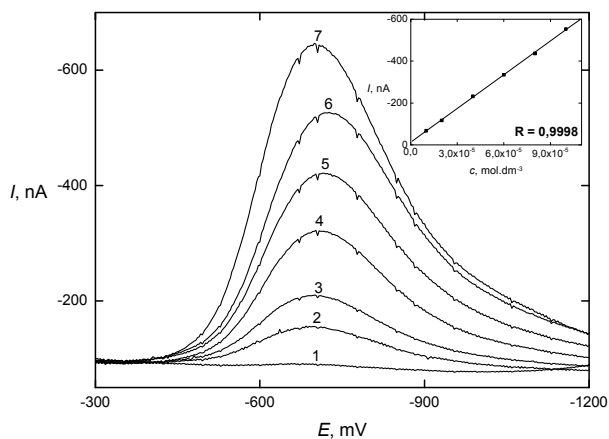
Nejprve byl sledován vliv pH na chování 1-NP a 1-AP při DPV na BDDFE v prostředí methanol – BR pufr o pH 2 až 12 (7:3) (viz obr. 2 a 3). Jako optimální bylo pro obě látky zvoleno prostředí methanol – BR pufr o pH 3,0 (7:3, výsledné pH vodně-methanolickeho roztoku 4,5), kde byly získány nejvyšší, nejlépe vyvinuté a nejsnáze vyhodnotitelné píky.



Obr. 2. DP voltamogramy 1-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na BDDFE v prostředí MeOH-BR pufr (7:3), pH BR pufru 3,0 (1), 6,0 (2), 7,0 (3), 9,0 (4) a 12,0 (5)

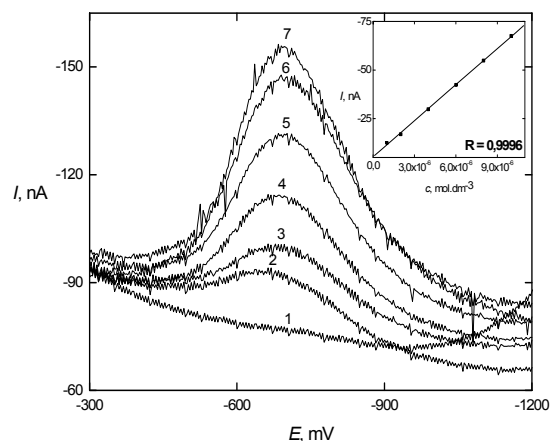


Obr. 3. DP voltamogramy 1-AP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na BDDFE v prostředí MeOH-BR pufru (7:3), pH BR pufru 3,0 (1), 4,0 (2), 7,0 (3), 9,0 (4) a 12,0 (5)

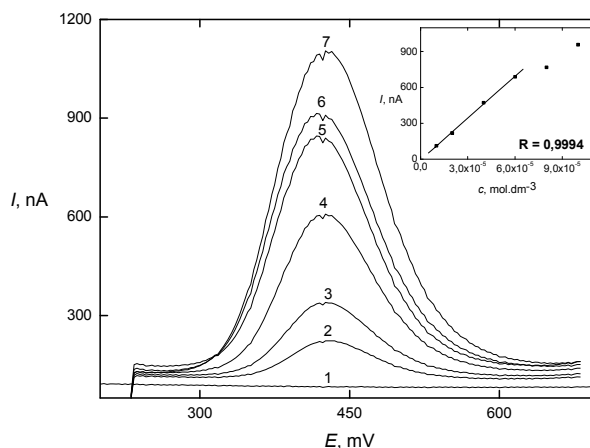


Obr. 4. DP voltamogramy 1-NP na BDDFE v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . MeOH-BR pufru pH 3,0 (7:3). Koncentrace 1-NP: 0 (1)  $1 \cdot 10^{-5}$  (2),  $2 \cdot 10^{-5}$  (3),  $4 \cdot 10^{-5}$  (4),  $6 \cdot 10^{-5}$  (5),  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  (7). Vložena je kalibrační přímka

Koncentrační závislost byla proměřena v tomto prostředí v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  pro 1-NP (viz obr. 4 a 5) a  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  pro 1-AP (viz obr. 6–8). Parametry kalibračních přímek obou látek jsou uvedeny v tab. I. Hodnota korelačního koeficientu pro 1-NP ( $R = 0,9998$ ) ukazuje vysokou linearitu v celém koncentračním rozsahu. U 1-AP je tomu obdobně ( $R = 0,9996$ ) v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Odchylení od linearity v úseku  $6 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  může souviset s adsorpcí 1-AP na povrchu elektrody nebo s její pasivací. Na druhou stranu se u 1-AP podařilo dosáhnout poměrně nízké meze detekce  $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ , zatímco u 1-NP je to jen  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ .



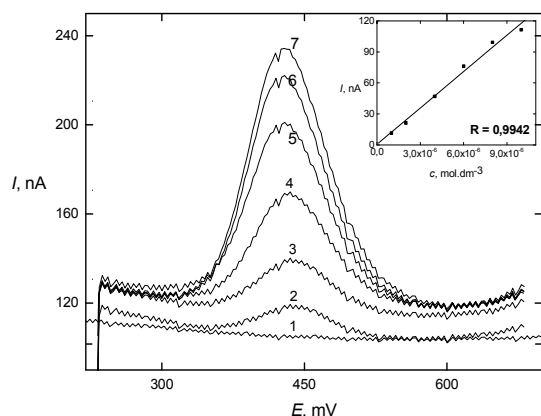
Obr. 5. DP voltamogramy 1-NP na BDDFE v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . MeOH-BR pufru pH 3,0 (7:3). Koncentrace 1-NP: 0 (1),  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5)  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (6). Vložena je kalibrační přímka



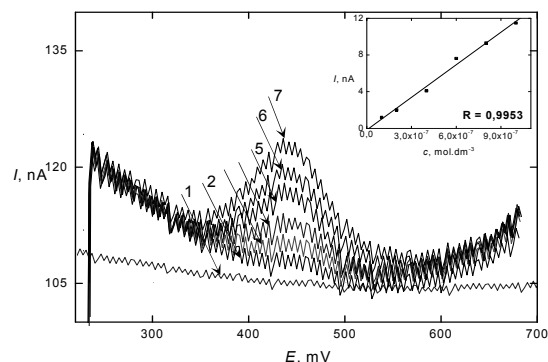
Obr. 6. DP voltamogramy 1-AP na BDDFE v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . MeOH-BR pufru pH 3,0 (7:3). Koncentrace 1-AP: 0 (1)  $1 \cdot 10^{-5}$  (2),  $2 \cdot 10^{-5}$  (3),  $4 \cdot 10^{-5}$  (4),  $6 \cdot 10^{-5}$  (5),  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  (7). Vložena je kalibrační přímka

## Závěr

Na základě provedené studie elektrochemického chování roztoků 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu na borem dopované diamantové filmové elektrodě metodou diferenční pulsní voltametrie byly nalezeny následující optimální podmínky pro DPV stanovení studovaných látek na BDDFE: prostředí methanol: BR pufru o pH 3,0 (7:3) (výsledné pH vodně-methanolickeho roztoku 4,5), polarizační rychlost  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , pulsy o šířce 100 ms, modulační



Obr. 7. DP voltamogramy 1-AP na BDDFE v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . MeOH-BR pufr pH 3,0 (7:3). Koncentrace 1-AP: 0 (1),  $1 \cdot 10^{-6}$  (2),  $2 \cdot 10^{-6}$  (3),  $4 \cdot 10^{-6}$  (4),  $6 \cdot 10^{-6}$  (5),  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (7). Vložena je kalibrační přímka



Obr. 8. DP voltamogramy 1-AP na BDDFE v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . MeOH-BR pufr pH 3,0 (7:3). Koncentrace 1-AP: 0 (1),  $1 \cdot 10^{-7}$  (2),  $2 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $6 \cdot 10^{-7}$  (5),  $8 \cdot 10^{-7}$  (6) a  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (7). Vložena je kalibrační přímka

Tabulka I

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 1-NP a 1-AP metodou DPV na BDDE v prostředí MeOH-BR pufr pH 3,0 (7:3)

Látka	$c$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	Směrnice [nA mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> ]	R	LOD [mol dm <sup>-3</sup> ]	LOQ [mol dm <sup>-3</sup> ]
1-NP	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	$-5,39 \cdot 10^6$	0,9998	$3 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$
1-AP	$1 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5}$	$1,50 \cdot 10^7$	0,9996	$6 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$

amplituda  $-50 \text{ mV}$  pro měření 1-NP a  $+50 \text{ mV}$  pro měření 1-AP. V případě 1-NP doporučujeme provádět elektrochemickou regeneraci BDDFE před každým měřením pomocí padesáti potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3 \text{ s}$  a  $E_{\text{reg}}^2 = -500 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3 \text{ s}$ . V případě 1-AP není nutno regeneraci provádět. Koncentrační závislost 1-NP proměřená v rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  je lineární v celém rozsahu s  $R = 0,9998$ . Dosažená mez detekce je  $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  a mez stanovitelnosti  $8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  (stanoveno z 11 paralelních měření roztoku 1-nitropyrenu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

Koncentrační závislost 1-AP proměřená v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  je lineární v úseku  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  s  $R = 0,9996$ . Dosažená mez detekce je  $6 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$  a mez stanovitelnosti  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  (stanoveno z 11 paralelních měření roztoku 1-aminopyrenu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Z provedené studie tudíž plyne, že za uvedených podmínek lze na BDDFE provést voltametrické stanovení 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu s dostatečnou citlivostí a přesností. V současné době věnujeme pozornost možnosti dalšího zvýšení citlivosti a selektivity tohoto stanovení pomocí předběžné separace a pre-koncentrace extrakcí tuhou fází a spojení elektrochemické detekce studovaných látek s jejich separací vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

*Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekty MSM0021620857, LC 06035 a RP 14/63).*

#### LITERATURA

- Barek J., Cvačka J., Moreira J. C., Zima, J.: Chem. Listy 90, 805 (1996).
- Barek J., Bencko V., Cvačka J., Šuta M.: Chem. Listy 92, 794 (1998).
- Moreira J. C., Barek J.: Quimica Nova 18, 362 (1995).
- Kielhorn J., Wahnschaffe U., Mangelsdorf I.: Environmental Health Criteria 229: Selected Nitro-Oxy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. World Health Organization, Geneva 2003.
- Barek J., Pumera M., Muck A., Kadeřábková M., Zima J.: Anal. Chim. Acta 393, 141 (1999).
- Daňhel A., Pecková K., Čížek K., Barek J., Zima J., Yosypchuk B., Navrátil T.: Chem. Listy 101, 144 (2007).
- Fischer J., Vanourkova L., Danhel A., Vyskocil V., Čížek K., Barek J., Peckova K., Yosypchuk B., Navratil T.: Int. J. Electrochem. Sci. 2, 226 (2007).
- Šebková S., Navrátil T., Kopanica M.: Anal. Lett. 36, 2767 (2003).

9. Čížek K.: *PhD disertační práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.
10. Jandová K.: *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2007.
11. Gragner M. C., Xu J., Strojek J. W., Swain G. M.: *Anal. Chim. Acta* 397, 145 (1999).
12. Barek J., ve skriptech: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*, str. 119, Pražské analytické centrum inovací, Praha 2007.
13. Musilová J., Barek J., Pecková K.: *Chem. Listy* 103, 469 (2009).
14. Peckova K., Musilova J., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 148 (2009).
15. Cizek K., Barek J., Fischer J., Peckova K., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 1295 (2007).
16. Barek J., Jandova K., Peckova K., Zima J.: *Talanta* 74, 421 (2007).
17. Peckova K., Mocko V., Opekar F., Swain G. M., Zima J., Barek J.: *Chem. Listy* 100, 124 (2006).

**O. Yosypchuk, K. Pecková, and J. Barek** (*Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague*): **Voltammetric Determination of 1-Nitropyrene and 1-Aminopyrene at a Boron-Doped Diamond Film Electrode**

Optimum conditions for the determination of carcinogenic 1-nitropyrene (NP) and 1-aminopyrene (AP) by differential pulse voltammetry with a boron-doped diamond film electrode were found – aqueous-methanolic (3:7) Britton-Robinson buffer (pH 3), scan rate 20 mV s<sup>-1</sup>, pulse duration 100 ms, pulse amplitude –50 mV (NP) and 50 mV (AP). The regeneration in NP determination was carried out before analysis by switching fifty-times between the potentials 800 mV and –500 mV every 0.3 s. In determination of AP, no regeneration was needed. The limits of quantification were 8·10<sup>-7</sup> and 2·10<sup>-7</sup> mol dm<sup>-3</sup> for NP and AP, respectively.

# STANOVENÍ AMINOBIFENYLŮ V PITNÉ A V ŘÍČNÍ VODĚ HPLC S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ POMOCÍ BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODY

LUCIE MAIXNEROVÁ<sup>a\*</sup>,  
KAROLINA PECKOVÁ<sup>b</sup>, JIŘÍ BAREK<sup>b</sup>  
a HELENA KLÍMOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra učitelství a didaktiky chemie, Hlavova 2030/8, 128 43, Praha 2, <sup>b</sup> Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43, Praha 2  
maixner1@natur.cuni.cz

Došlo 5.10.09, přijato 23.11.09.

Klíčová slova: 2-aminobifenyl, 3-aminobifenyl, 4-aminobifenyl, HPLC, ampérometrická detekce, borem dopovaná diamantová filmová elektroda, extrakce tuhou fází

## Úvod

Aminoderiváty bifenyly jsou toxické při vdechování, styku s kůží a při požití, mají kumulativní účinky, jsou škodlivé pro vodní organismy a mohou vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí<sup>1</sup>. Současně představují metabolity dalších genotoxických polutantů – nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH)<sup>2</sup>, a tudíž mohou sloužit jako biomarkery míry expozice těmto nebezpečným látkám<sup>3</sup>. Proto neustále roste poptávka po stanovení těchto genotoxických látek v nejrůznějších matricích.

Elektrochemická detekce (ED) získala od svého zavedení v průtokových metodách v 70. letech minulého století nezastupitelné místo mezi ostatními detekčními metodami<sup>4</sup>, podpořené v posledních deseti letech zájmem o miniaturizované detekční systémy<sup>5</sup>. Největší uplatnění nacházejí materiály obsahující různé formy uhlíku (skelný uhlík, uhlíková vlákna, porézní grafit, modifikované uhlíkové pasty a inkousty), a dále platina, zlato a stříbro, které jsou zpravidla používány v komerčně dostupných přístrojích. Velkou oblibu v posledních dvou desetiletích si v elektroanalytické chemii získaly borem dopované dia-

mantové filmové elektrody (BDDFE). K jejich výhodným vlastnostem patří mechanická a chemická stabilita, malá náchylnost k pasivaci, široké potenciálové okno, nízký zbytkový proud a biokompatibilita<sup>6–9</sup>.

Extrakce patří mezi separační metody, které jsou založené na kontaktu dvou makroskopicky zřetelně oddělených nemísitelných fází. Při extrakci tuhou fází (SPE) v dynamickém uspořádání je tuhý sorbent v extrakční koloně proléván roztokem vzorku. V analytické chemii se SPE využívá zejména k prekoncentraci a předběžné separaci látek<sup>10</sup>.

Cílem této práce bylo stanovení 2-aminobifenyly (2-AB), 3-aminobifenyly (3-AB) a 4-aminobifenyly (4-AB) v modelových vzorcích pitné a říční vody metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) v tenkovrstvé cele pomocí BDDFE a nalezení vhodných podmínek pro jejich předběžnou separaci a prekoncentraci pomocí extrakce na tuhou fází.

## Experimentální část

### Reagencie

Zásobní roztoky 2-AB (Sigma-Aldrich, 97%), 3-AB (syntetizováno na katedře organické chemie PřF UK v Praze) a 4-AB (Sigma-Aldrich, 97%) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky v 250 ml deionizované vody (Milli-Q plus system, Millipore, USA), za pomoci ultrazvuku. Dále byly použity tyto chemikálie čistoty p.a.: octová kyselina (Lach-Ner, Neratovice), hydroxid sodný (Lach-Ner, Neratovice), kyselina fosforečná (Lach-Ner, Neratovice), aceton (Lach-Ner, Neratovice), diethylether (Lachema, Neratovice), ethylester kyseliny octové (Lachema, Brno), kyselina chlorovodíková (Lachema, Neratovice). Methanol a acetonitril v chromatografické čistotě dodal Merck, Praha. Octanový tlumivý roztok o koncentraci 0,01 mol  $l^{-1}$  a pH 5,0 byl připraven směsím 0,577 ml 99% kyseliny octové s 900 ml deionizované vody. pH vzniklého roztoku bylo upraveno na hodnotu 5,0 roztokem 0,2 M-NaOH. Roztok byl doplněn deionizovanou vodou na 1 l. Fosfátový tlumivý roztok o koncentraci 0,01 mol  $l^{-1}$  a pH 1,5 byl připraven smísením 0,068 ml 85% kyseliny fosforečné s 90 ml deionizované vody. pH vzniklého roztoku bylo upraveno na hodnotu 1,5 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a doplněno deionizovanou vodou na 100 ml. Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). pH-metr byl kalibrován standardními vodními pufrý za laboratorní teploty.

\* Lucie Maixnerová se s touto prací úspěšně zúčastnila soutěže O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

## Aparatura

HPLC byla prováděna na kapalinovém chromatografu ve složení: gradientová pumpa L-7100, autosampler L-7200, spektrofotometrický UV/VIS detektor L-7400, řídicí jednotka D-7000 (vše Merck-Hitachi, SRN). Obsluhu systému, sběr a vyhodnocení dat zajišťoval osobní počítač s programem HSM (Merck-Hitachi, SRN) pracující v operačním systému MS Windows NT (Microsoft Corporation, USA). Pro HPLC separaci aminobifenylů byla použita kolona LiChroCART ChiraDex<sup>®</sup> (250 × 4 mm, 5 μm, Merck, SRN) s kovalentně vázaným β-cykloextrinem a předkolonka LiChroCART ChiraDex<sup>®</sup> (4 × 4 mm, 5 μm, Merck, SRN). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, kolona nebyla termostatována. Používané mobilní fáze byly odvzdušňovány ultrazvukem. Spektrofotometrický UV/VIS detektor byl stabilně nastaven na vlnovou délku detekce 290 nm (cit.<sup>8</sup>). Tenkovrstvý ampérometrický detektor pracující v tříelektrodovém uspořádání, kde pracovní elektrodou byla BDDFE, byl sériově zapojen za výstup ze spektrofotometrického UV/VIS detektoru. Pracovní potenciál, tj. potenciál vkládaný na pracovní elektrodu, při kterém dosahuje poměr signálu k šumu maximální hodnoty, byl +1,2 V (převzato z práce<sup>11</sup>). Pro vkládání pracovního potenciálu na elektrodový systém detektoru byl použit potenciostat ADLC 2 (Laboratorní přístroje, ČR).

Pracovní elektroda byla poskytnuta prof. G. M. Swainem (Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA). Jednalo se o borem dopovaný mikrokrytalický diamantový film připravený technikou chemické depozice par ze směsi methanu, vodíku a diboranu<sup>7–9</sup>. Před prvním použitím byl povrch BDDFE zoxidován vložením potenciálu +2,4 V po dobu 60 min v 0,1 M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Jako referenční elektroda byla použita argentchloridová referenční elektroda typu 66-EE009 (Cypress Systems, Chelmsword, USA). Použitá tenkovrstvá detekční cela<sup>12</sup> se skládá ze dvou polychlorotrifluoroethylenových (Kel-F) částí. V horní jsou vyvrtány tři otvory – pro vstup a výstup mobilní fáze a pro umístění referenční elektrody. Pomocnou elektrodu představuje 6 cm dlouhá kapilára z nerezové oceli sloužící zároveň pro výstup mobilní fáze z kolony. Na spodním dílu je uložen měděný plíšek zajišťující elektrický kontakt a pracovní elektroda. Oddělení pracovní elektrody od horního dílu je zajištěno 0,1 cm silným těsněním z Vitonu<sup>®</sup> (GÜSCHU – těsnicí technika, ČR). Předpokládáme-li 25% stlačení Vitonu<sup>®</sup> při utažení šroubu, pak by objem detekční cely měl být 10 μl.

## Pracovní postupy

Používaná mobilní fáze byla připravována smísením 40 objemových dílů 0,01 mol l<sup>-1</sup> octanového pufru o pH 5,0, 30 dílů methanolu a 30 dílů acetonitrilu<sup>11</sup>. Před měřením byla mobilní fáze 10 min odvzdušňována ultrazvukem a dále 10 min probublávána heliem. Po každém dni měření byl podle doporučení dodavatele kolony celý systém minimálně 15 min promýván směsí methanolu,

acetonitrilu a deionizované vody v poměru 30:30:40 (v/v/v), čímž došlo k vymytí pufru ze systému.

Při přímém stanovení aminobifenylů v pitné a říční vodě byly modelové vzorky připraveny tak, že do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno potřebné množství zásobních roztoků 2-AB, 3-AB a 4-AB o koncentraci 1·10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup> a doplněno na 10 ml pitnou nebo říční vodou. Říční voda byla před přípravou modelového vzorku přefiltrována.

Extrakce tuhou fází byla prováděna na kolonách LiChrolut<sup>®</sup>EN (Merck, SRN, objem 6 ml, 500 mg sorbentu divinylbenzenu a ethylvinylbenzenu) za použití vzduchové vývěvy a dvanáctimístného extrakčního rozvodu. Tato kolonka je výrobcem doporučována pro prekoncentraci aromatických aminů.

Při extrakci 2-AB, 3-AB a 4-AB z pitné a říční vody byla příprava vzorků, aktivace extrakčních kolonek (LiChrolut<sup>®</sup> EN) a dávkování vzorku prováděny dle postupu uvedeného výrobcem pro stanovení anilinu<sup>13</sup>. pH vzorků bylo před extrakcí upraveno na hodnotu 9,0 roztokem 0,2 M-NaOH. Byla provedena aktivace kolony jejím postupným promytím 3 ml ethylacetátu, 3 ml methanolu a 3 ml deionizované vody. Následně bylo na kolonku naneseno 100 ml analyzovaného vzorku a prosáto rychlostí 2 ml min<sup>-1</sup>. Poté byla kolonka promyta 1 ml destilované vody sloužící k vymytí nežádoucích příměsí a 1 min vysušována vzduchem. Zachycené analyty byly eluovány 10 ml diethyletheru. Eluát byl následně odpařen odfoukáním dusíkem, k odparku byl přidán 1,0 ml mobilní fáze obsahující směs methanolu, acetonitrilu a octanového pufru o koncentraci 0,01 mol l<sup>-1</sup> a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v) a 20 μl takto připraveného roztoku bylo dávkováno do systému HPLC. Výtěžek extrakce byl vždy vyhodnocován jako poměr výšky píku analytu při extračním stanovení  $I_p^{Ex}$  k výšce píku  $I_p^0$  získaného přidávkem potřebného objemu standardního roztoku k roztoku po extrakci slepého vzorku. Slepý vzorek byl vždy podrobován stejným extračním postupům jako modelové vzorky říční a pitné vody. Meze detekce ( $L_D$ ) byly určeny jako koncentrace analytů poskytující signál odpovídající trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

## Výsledky a diskuse

### Přímé stanovení aminobifenylů v pitné a říční vodě

Při přímém stanovením metodou HPLC-ED v pitné vodě byly získány lineární kalibrační závislosti pro 2-AB, 3-AB a 4-AB v koncentračním rozmezí 2·10<sup>-7</sup>–1·10<sup>-5</sup> mol l<sup>-1</sup>. Jejich parametry jsou uvedeny v tabulce I. Chromatogramy směsi získané v koncentračním rozmezí 1·10<sup>-7</sup>–1·10<sup>-6</sup> mol l<sup>-1</sup> jsou zobrazeny na obr. 1. Dále byla při přímém stanovení aminobifenylů v pitné vodě sledována opakovatelnost odezvy detektoru s BDDFE. Relativní směrodatná odchylka (RSD) odezvy detektoru pro 7 po sobě následujících nástríků 2-AB, 3-AB a 4-AB o koncentraci 1·10<sup>-5</sup> mol l<sup>-1</sup> byla menší než 2,9 %. RSD v šesti jednotlivých

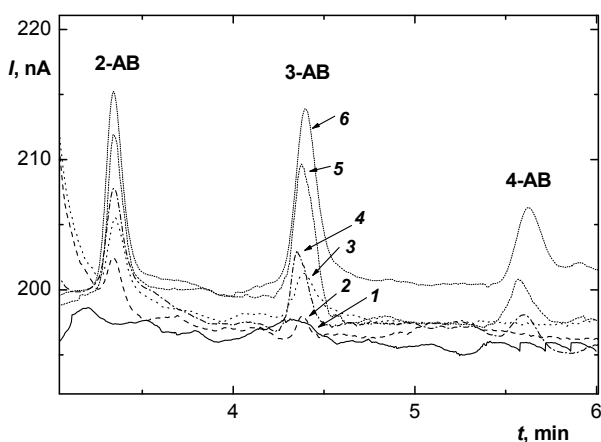


Tabulka I

Parametry kalibračních přímk 2-AB, 3-AB a 4-AB vyhodnocené z výšek pík při jejich přímém stanovení v pitné vodě. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , nastříkáváno 20  $\mu\text{l}$  vzorku, mobilní fáze methanol:acetonitril: octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v)

Látka	LDR <sup>a</sup> [ $\text{mol l}^{-1}$ ]	Směrnice [ $\text{mA mol}^{-1} \text{l}$ ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_D^b$ [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
2-AB	$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	12,7	-0,1	0,9992	$2,1 \cdot 10^{-7}$
3-AB	$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	9,0	2,1	0,9996	$3,0 \cdot 10^{-7}$
4-AB	$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	4,4	0,8	0,9988	$6,2 \cdot 10^{-7}$

<sup>a</sup> Lineární dynamický rozsah, <sup>b</sup> mez detekce



Obr. 1. Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB při jejich přímém stanovení v pitné vodě; koncentrace analytů: 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $1 \cdot 10^{-6}$  (6)  $\text{mol l}^{-1}$ ; nastříkáváno 20  $\mu\text{l}$  vzorku. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , mobilní fáze methanol:acetonitril:octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v)

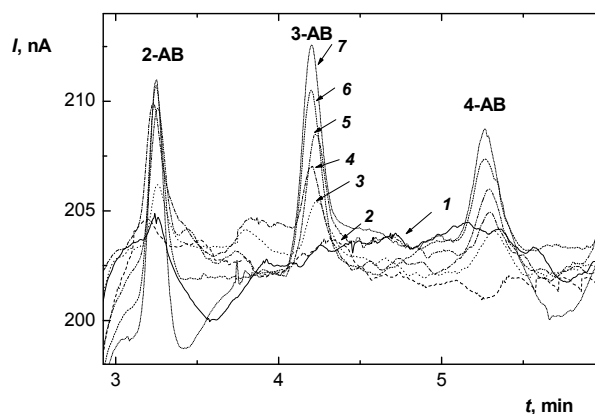
dnech v průběhu dvou měsíců byla 7 % pro proudové pozadí a maximálně 20 % pro odezvu detektoru na studované analyty, což svědčí o dostatečné stálosti odezvy elektrochemického detektoru při jeho dlouhodobém používání.

Při přímém stanovení metodou HPLC-ED v říční vodě byly obdobně jako v pitné vodě získány lineární kalibrační závislosti pro 2-AB a 3-AB v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  a pro 4-AB v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ . Jejich parametry jsou uvedeny v tab. II. Chromatogramy směsi získané v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  jsou zobrazeny na obr. 2.

Stanovení aminobifenylů v pitné a říční vodě po extrakci tuhrou fází

Ke stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné a říční vodě s využitím SPE k předběžné separaci a prekoncentraci

bylo nejprve nutné nalézt optimální podmínky, tj. především vhodnou SPE kolonku a eluční činidlo. Na základě doporučení výrobce byla zvolena kolonka LiChrolut® EN obsahující kopolymer ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu. Při volbě elučního činidla byla testována směs methanol – acetonitril – aceton (50:50:1), směs acetonitril –  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  fosfátový pufr pH 1,5 (1:1) a samotný diethylether. Nejlépe se osvědčil samotný diethylether, který poskytl nejvyšší výtěžek a který byl zvolen i pro svůj nízký bod varu umožňující snadné odpaření. Při eluci 10,0 ml diethyletheru bylo dosaženo výtěžku 69,0 % pro 2-AB, 71,3 % pro 3-AB a 63,9 % pro 4-AB. Ostatní výše uvedené eluční směsi poskytly výtěžek kolem 30 % pro malé objemy eluentů do 3 ml, které by umožnily dostatečnou prekoncentraci analytů. Opakovatelnost tohoto stanovení pro 10,0 ml diethyletheru byla testována analýzou čtyř modelových vzorků pitné vody obsahující 2-AB a 4-AB ( $c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ ). Výsledky jsou shrnuty v tab. III.



Obr. 2. Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB při jejich přímém stanovení v říční vodě; koncentrace analytů: 0 (1),  $1 \cdot 10^{-7}$  (2),  $2 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $6 \cdot 10^{-7}$  (5),  $8 \cdot 10^{-7}$  (6),  $1 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol l}^{-1}$ ; nastříkáváno 20  $\mu\text{l}$  vzorku. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , mobilní fáze methanol:acetonitril:octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v)

Tabulka II

Parametry kalibračních přímk 2-AB, 3-AB a 4-AB vyhodnocené z výšek pík při jejich přímém stanovení v říční vodě. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , nastříkáváno 20  $\mu\text{l}$  vzorku, mobilní fáze methanol:acetonitril: octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v)

Analyt	LDR <sup>a</sup> [mol l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [mA mol <sup>-1</sup> l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_D$ <sup>b</sup> [mol l <sup>-1</sup> ]
2-AB	$1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	12,8	–0,7	0,9993	$2,1 \cdot 10^{-7}$
3-AB	$1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	9,7	–0,4	0,9996	$2,8 \cdot 10^{-7}$
4-AB	$2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	4,9	0,3	0,9996	$5,5 \cdot 10^{-7}$

<sup>a</sup> Lineární dynamický rozsah, <sup>b</sup> mez detekce

Tabulka III

Výtěžek extrakce tuhou fází 2-AB a 4-AB ( $c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ ) ze 100 ml pitné vody vyhodnocovaný jako poměr  $I_p^{\text{Ex}}/I_p^0$ , kde  $I_p^0$  je výška píku standardu ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ) a  $I_p^{\text{Ex}}$  je výška píku po extrakci. Opakovatelnost extrakce ( $n = 4$ ) je vyjádřena směrodatnou odchylkou  $s$  a relativní směrodatnou odchylkou  $RSD$  výtěžku. Kolonka LiChrolut<sup>®</sup> EN (500 mg/6 ml), eluováno 10 ml diethyletheru

Analyt	$I_p^0$ [nA]	$I_p^{\text{Ex}}$ [nA]	$I_p^{\text{Ex}}/I_p^0$ [%]	$s$ [%]	$RSD$ [%]
2-AB	88,9	61,3	69,0	4,0	5,8
4-AB	37,5	24,0	63,9	11,6	18,1

Pro stanovení aminobifenyľů v pitné vodě metodou HPLC-ED s využitím SPE a eluce diethyletherem s jeho následným odpařením byly získány lineární kalibrační závislosti pro 2-AB v koncentračním rozmezí  $2,5 \cdot 10^{-9}$  až  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ , pro 3-AB a 4-AB v koncentračním rozmezí  $5 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Jejich parametry jsou uvedeny v tab. IV.

Při stanovení aminobifenyľů v říční vodě metodou HPLC-ED s využitím SPE byla rovněž použita eluce diethyletherem a jeho následné odpaření. Byly proměřeny kalibrační závislosti 2-AB v koncentračním rozmezí  $2,5 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ , 3-AB v koncentračním rozmezí  $2,5 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  a 4-AB v rozmezí  $5,0 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Pro 2-AB nebylo možno reprodukovatelně vyhodnotit nižší koncentrace vzhledem k interferenci odezvy 2-

AB s píky odpovídajícími mrtvému času kolony. Tato interference je výrazně vyšší pro komplikovanější matrici říční vodu než pro vodu pitnou, kde tolik neovlivnila měření nejnižšího koncentračního řádu. Získané závislosti jsou lineární v rozsahu uvedeném spolu s parametry kalibračních přímk v tabulce V. Chromatogramy směsi v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  jsou zobrazeny na obr. 3.

Meze detekce pro stanovení 2-AB a 3-AB v modelových vzorcích pitné vody s využitím SPE (viz tab. IV) leží v koncentračním řádu  $10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ , tj. až při stokrát nižších koncentracích, než jsou limity detekce pro přímé stanovení aminobifenyľů v této matrici. Pro říční vodu jsou limity detekce s využitím SPE vyšší než pro pitnou vodu, jelikož se jedná o složitější matrici.

Tabulka IV

Parametry kalibračních závislostí vyhodnocené z výšek pík při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné vodě s využitím SPE. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , mobilní fáze methanol:acetonitril:octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v), kolonka LiChrolut<sup>®</sup> EN (500 mg/6 ml), eluováno 10 ml diethyletheru

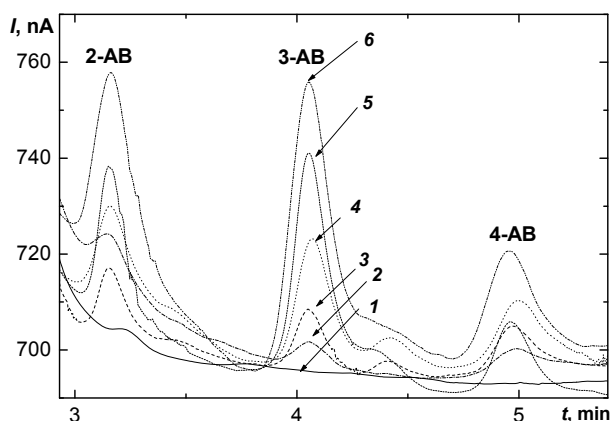
Analyt	LDR [mol l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [A mol <sup>-1</sup> l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol l <sup>-1</sup> ]
2-AB	$5,0 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7}$	0,78	–4,1	0,9925	$3,4 \cdot 10^{-9}$
3-AB	$7,5 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7}$	0,62	–5,2	0,9851	$4,4 \cdot 10^{-9}$
4-AB	$7,5 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7}$	0,25	–2,1	0,9849	$1,1 \cdot 10^{-8}$

## Tabulka V

Parametry kalibračních závislostí vyhodnocené z výšek pík při stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v říční vodě s využitím SPE. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , mobilní fáze methanol:acetonitril:octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v). Kolonka LiChrolut® EN (500 mg/6 ml), eluováno 10 ml diethyletheru

Analyt	LDR <sup>a</sup> [mol l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [A mol <sup>-1</sup> l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_D^b$ [mol l <sup>-1</sup> ]
2-AB	$2,5 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$	0,32	-1,0	0,9869	$8,4 \cdot 10^{-9}$
3-AB	$2,5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	0,20	0,2	0,9985	$1,3 \cdot 10^{-8}$
4-AB	$5,0 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	0,16	0,2	0,9953	$1,7 \cdot 10^{-8}$

<sup>a</sup> Lineární dynamický rozsah, <sup>b</sup> mez detekce



Obr. 3. Chromatogramy směsi 2-AB, 3-AB a 4-AB při jejich stanovení v říční vodě s využitím SPE; koncentrace analytů: 0 (1),  $1,0 \cdot 10^{-8}$  (2),  $2,5 \cdot 10^{-8}$  (3),  $5,0 \cdot 10^{-8}$  (4),  $7,5 \cdot 10^{-8}$  (5),  $1 \cdot 10^{-7}$  (6) mol l<sup>-1</sup>. Měřeno metodou HPLC-ED s BDDFE,  $F_m = 1,0 \text{ ml s}^{-1}$ ,  $E_{\text{det}} = +1,2 \text{ V}$ , mobilní fáze methanol:acetonitril:octanový pufr o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 5,0 v poměru 30:30:40 (v/v/v), kolonka LiChrolut® EN (500 mg/6 ml), eluováno 10 ml diethyletheru

## Závěr

V této práci bylo HPLC ve spojení s ampérometrickým detektorem s BDDFE použito pro analýzu aminobifenyly v modelových vzorcích pitné a říční vody. Nejprve byla ověřena možnost přímého stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné a říční vodě metodou HPLC-ED. Kalibrační závislosti 2-AB, 3-AB a 4-AB v pitné vodě byly změřeny v koncentračním řádu  $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ , v říční vodě v koncentračním řádu  $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  pro 2-AB a 3-AB a  $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  pro 4-AB. Dosažené meze detekce jsou srovnatelné s hodnotami dosaženými v destilované vodě jako ideální matici a leží v koncentračním řádu  $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ .

Dále bylo navrženo stanovení využívající předběžnou separaci a prekoncentraci extrakcí tuhou fází na kolonkách LiChrolut® EN. Jako nejvhodnější eluční činidlo byl zvolen diethylether. Kalibrační závislosti v pitné vodě jsou pro 2-AB lineární v rozmezí  $5 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ , pro 3-AB a 4-AB v rozmezí  $7,5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . Kalibrační závislosti v říční vodě byly změřeny pro 2-AB v rozmezí  $2,5 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ , pro 3-AB v rozmezí  $2,5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  a pro 4-AB v rozmezí  $5 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ .

Ze získaných výsledků vyplývá, že popsané metody HPLC-ED jsou za daných podmínek vhodné pro stanovení 2-AB, 3-AB a 4-AB ve vzorcích pitné a říční vody a testovaný ampérometrický detektor s borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodou poskytuje stabilní odezvu pro studované analyty.

*Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSM0021620857, LC 06035 a RP 14/63) a Grantovou agenturou České republiky (projekt GA ČR 203/07/P261).*

## LITERATURA

1. Sigma-Aldrich s.r.o.: *Material safety data sheets*. Sigma-Aldrich, Praha 2006. <http://www.sigmaaldrich.com>, staženo 9. října 2009.
2. O'Neill I. K., Fishbein L.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 26, 229 (1986).
3. Moreira J. C., Berek J.: *Quim. Nova* 18, 362 (1995).
4. Štulík K., Pacáková V.: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. SNTL, Praha 1989.
5. Pecková K., Mocko V., Opekar F., Swain G. M., Zima J., Berek J.: *Chem. Listy* 100, 124 (2006).
6. Pecková K., Musilová J., Berek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 148 (2009).
7. Pecková K., Jandová K., Maixnerová L., Swain G. M., Berek J.: *Electroanalysis* 21, 316 (2009).
8. Cizek K., Berek J., Fischer J., Pecková K., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 1295 (2007).

9. Barek J., Jandova K., Peckova K., Zima J.: *Talanta* 74, 421 (2007).
10. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Karolinum, Praha 2002.
11. Jandová K.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha 2007.
12. Jolley S., Koppang M., Jackson T., Swain G. M.: *Anal. Chem.* 69, 4099 (1997).
13. Merck s.r.o.: *ChromBook 06/07, Chromatography at Merck – Experience Drives Innovation*. Merck, Darmstadt 2006. <http://chrombook.merck.de>, staženo 21. října 2009.

**L. Maixnerová<sup>a</sup>, K. Pecková<sup>b</sup>, J. Barek<sup>b</sup>, and H. Klímová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Charles University, Faculty of Science, Department of Teaching and Didactics of Chemistry*, <sup>b</sup> *Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague*): **HPLC Determination of Aminobiphenyls in Drinking and River Water Using Electrochemical Detection with Boron-Doped Diamond Film Electrode**

Optimum conditions are described for the HPLC determination of submicromolar and nanomolar concentrations of 2-, 3-, and 4-aminobiphenyls in deionized water, drinking water and river water. The limits of the detection with a boron-doped diamond film electrode are ca.  $10^{-7}$  mol l<sup>-1</sup>. Using solid phase extraction with diethyl ether as eluent, the limits decrease to  $10^{-8}$  –  $10^{-9}$  mol l<sup>-1</sup>.

## POUŽITÍ AUTOMATIZOVANÉ ELEKTROFORÉZY NA ČIPU PRO STUDIUM LAKTOFERINU A MATRIXOVÝCH METALOPROTEINAS

ONDŘEJ ZÍTKA<sup>a,b,\*</sup>, SOŇA KRÍŽKOVÁ<sup>b</sup>,  
VOJTĚCH ADAM<sup>b,c</sup>, ALEŠ HORNA<sup>d,e</sup>,  
JIRÍ KUKAČKA<sup>f</sup>, RICHARD PRŮŠA<sup>f</sup>,  
VĚRA ŽÍŽKOVÁ<sup>g</sup> a RENÉ KIZEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, <sup>b</sup> Ústav chemie a biochemie a <sup>c</sup> Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>d</sup> Univerzitní institut, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, <sup>e</sup> Radanal s.r.o., Okružní 613, 530 03 Pardubice, <sup>f</sup> Ústav klinické biochemie a patobiochemie, 2. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, <sup>g</sup> Výzkumný ústav pletářský, Šujanovo náměstí 3, 602 00 Brno  
kizek@sci.muni.cz

Došlo 18.6.09, přepracováno 9.11.09, přijato 3.12.09.

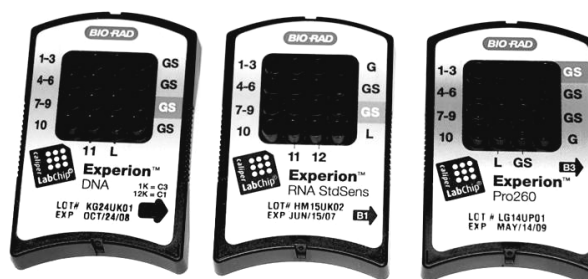
Klíčová slova: čipová elektroforéza, gelová elektroforéza, proteiny, laktoferin, metaloproteiny, automatizace

### Úvod

Kapilární elektroforéza na čipu umožňuje simultánní analýzu až několika desítek vzorků během několika minut. Nespornou výhodou mikročipů je minimální objem vzorku potřebný pro analýzu, obvykle v řádech pikolitřů. Prvním přístrojem založeným na mikročipech byl integrovaný plynový chromatograf v roce 1979 (cit.<sup>1</sup>). I přesto, že toto zařízení nebylo komerčně úspěšné, předznamenalo nástup dalších zařízení založených na mikročipech, především v kapilární elektroforéze nukleových kyselin, nízkomolekulárních látek, ale i peptidů a proteinů. Separace analytů probíhá v kanálcích vyleptaných do mikročipu za použití mikrofabricačních technik. Poté, co jsou na čip naneseny všechny roztoky, jsou vzorky elektrokineticky vpraveny do injektorové oblasti. Následně probíhá elektroforetická separace vzorků a detekce nejčastěji pomocí laserem indikované fluorescence<sup>2–4</sup>. Komerčně dodávané čipy pro detekci proteinů, RNA a DNA jsou ukázány na obr. 1.

První systém pro denaturační čipovou elektroforézu proteinů v přítomnosti SDS (dodecyl síran sodný) popsal Yao a spol.<sup>5</sup>, přičemž první komerční zařízení bylo vyvinuto firmou Caliper Technologies v roce 2001 (cit.<sup>6</sup>). V současné době jsou k dispozici automatizované systémy pro SDS elektroforézu na čipu např. od firem Caliper Life Sciences, Agilent Technologies, Bio-Rad, GE Healthcare nebo Shimadzu Biotech.

Experion je automatický systém pro elektroforézu na čipu vyvinutý firmou Bio-Rad. Tento systém je použitelný pro detekci a separaci DNA, RNA a proteinů. Separace probíhá tzv. „Lab on Chip“ mikrofluidní technologií (Caliper Life Sciences) na malém destičkovém čipu s následnou fluorimetrickou detekcí. Na jednom čipu je možné provést analýzu až 10 proteinových nebo 12 vzorků nukleových kyselin během 30 min. Hlavní výhodou, je jednoduchost provedení, snadná obsluha a rychlost provedení celé analýzy včetně zpracování dat. Při analýze proteinů oproti klasické SDS-PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS) odpadají časově náročné kroky zahrnující přípravu gelů a detekci proteinů pomocí Coomassie Blue, odbarvování gelů, jejich dehydrataci a dokumentaci. V případě analýzy RNA vzhledem k jejich náchylnosti k degradaci všudypřítomnými RNAsami je obrovskou výhodou celého procesu jeho rychlost. Výsledky jsou dostupné ihned po analýze. Další výhodou je i automatická relativní i absolutní kvantifikace separovaných biomakromolekul. Při práci s Experionem je nutné mít na paměti určitá omezení, kterými jsou posun molekulových hmotností některých detegovaných proteinů ve srovnání s SDS-PAGE, popř. problematická analýza polypeptidů s molekulovou hmotností nižší než 10 kDa, která je způsobena emisním maximem použitého fluorescenčního barviva<sup>7–9</sup>.



Obr. 1. Komerčně dodávané čipy pro detekci proteinů, RNA a DNA od firmy Bio-Rad

\* Prezentováno Ondřejem Zítkou na 12. ročníku celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie O cenu firmy Merck.

Pro své přednosti lze předpokládat uplatnění přístroje Experion pro rutinní aplikace jako klinická praxe<sup>10</sup>, sledování a ověřování separačních procesů<sup>11,12</sup>, ověřování odrůdové jakosti<sup>13–15</sup>, přesnější a reprodukovatelné vyhodnocení restriční analýzy DNA<sup>16</sup> a kontroly kvality extrahovaných nukleových kyselin<sup>17</sup>. Získané závislosti intenzity fluorescence na čase mohou být zahrnuty do databází odrůd a využity pro ověřování odrůdové jakosti a kvality výrobků<sup>13–15,18</sup>.

Cílem tohoto článku je shrnutí našich dosavadních zkušeností s použitím systému Experion pro detekci laktoferinu a matrixové metaloproteinasy 9 (MMP-9). Oba proteiny jsou kovy vázající a bez jejich přítomnosti nejsou aktivní. Laktoferin (laktotransferin) je metaloprotein vyskytující se v granulích neutrofilů a mukózních sekretech, především v mléce. Nižší koncentrace byly nalezeny v slzách, slinách a dalších tělesných tekutinách. Biologický význam laktoferinu dosud není zcela objasněn, vzhledem ke své schopnosti vázat železo z okolí vykazuje baktericidní vlastnosti, kromě toho má také antiflogistické schopnosti<sup>19</sup>. Mimo jiné je schopen modulovat imunitní odpovědi a má pozitivní efekt na růst mléčných bakterií, což ještě zesiluje jeho antimikrobiální působení<sup>20</sup>. Matrixové metaloproteinasy jsou enzymy schopné štěpit proteiny extracelulární matrix. Tato schopnost je spojuje s mnoha fyziologickými procesy, jako jsou apoptóza, děložní cyklus, embryonální vývoj, ovulace anebo zánět, ale také jsou dávány do souvislosti s mnoha onemocněními, např. artritida, Alzheimerova choroba, ateroskleróza, cévní onemocnění, gastritický vřed, choroby centrální nervové soustavy, jaterní cirhóza, metastázy a rakovina. Podle substrátové specifity a mechanismů štěpení substrátu se dělí na želatinasy, kolagenasy, stromelysiny, matrilysiny, membránově vázané MMP a ostatní, přičemž MMP-9 se řadí mezi želatinasy, které štěpí především kolagen (IV, V, VII, X a XIV) jako základní stavební složku pojivové tkáně<sup>21</sup>.

Bioanalytická chemie zahrnuje řadu rozdílných oblastí počínaje kvantifikací cílového analytu ve vzorku až po určení struktury či schopnosti interakce biomakromolekuly s dalšími látkami. Proto je nezbytné hledat nástroje, které by bylo možné využít pro různé aplikace s dobrou opakovatelností a zároveň nízkou časovou náročností. V naší práci jsme se zaměřili na možnost testovat přístroj Experion pro kvantifikaci proteinů a zároveň pro studium interakce proteinu s dalším proteinem.

## Experimentální část

### Chemikálie

Lidská MMP-9 byla dodána firmou Chemicon International (Temecula, USA). Lyofilizovaný prasečí kolagen byl získán od Výzkumného ústavu pletářského (Brno, Česká republika). Standard laktoferinu byl dodán firmou NUTRA ingredients (Nizozemí). Ostatní použité chemikálie byly od firmy Sigma-Aldrich (USA) v ACS čistotě.

### Čipová gelová elektroforéza – Experion

Pro analýzy byl použit čipový elektroforetický systém Experion (Bio-Rad, USA). Vzorky byly připraveny podle metodického postupu dodavatele analytických kitů (Bio-Rad). Všechny analyzované vzorky byly ředěny tak, aby koncentrace proteinů nepřesáhla  $300 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Následně byly  $4 \mu\text{l}$  naředěného vzorku smíchány s  $2 \mu\text{l}$  redukčního pufru (systémový pufr ve směsi s merkaptoethanolem (100%) v poměru 30:1 (v/v)). Tato směs byla ponechána 4 min při  $100^\circ\text{C}$  a poté bylo přidáno  $84 \mu\text{l}$  vody (ACS kvalita, Sigma-Aldrich, Německo). Po naplnění čipu gelem a přípravě barvicího roztoku byla zředěná směs vzorku, redukčního pufru a vody ( $6 \mu\text{l}$ ) nanášena do jednotlivých jamek v čipu. Jako standard byl použit Pro260 Ladder (Bio-Rad), který je součástí analytického kitu. Pro inkubaci vzorků před analýzou byl použit termomixer (Eppendorf 5430, USA).

### SDS-PAGE

Analýzy vzorků byly ověřeny polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Pro studium metaloproteinasy a laktoferinu byl použit 7,5% separační gel a koncentrace zaostřovacího gelu byla 5 %. SDS-PAGE probíhala na aparatuře Maxigel od firmy Biometra (Německo). Separace probíhala při napětí 150 V dokud čelo proteinů nedosáhlo dolního konce gelu ( $\sim 2$  h). Během separace byl gel chlazen vodou. SDS-PAGE a detekce proteinů stříbrem byly provedeny podle klasických protokolů<sup>22</sup>.

### Purifikace laktoferinu

Vzorky kravského kolostra odebrané po 1, 12, 24, 36 a 48 hodinách od porodu byly obdrženy ze Školního statku Mendelovy univerzity v Žabčicích. Vzorky ( $\sim 10$  ml) byly po odběru zamrazeny na  $-20^\circ\text{C}$ . Po rozmražení byl vzorek  $10\times$  naředěn v  $0,2$  M fosfátovém pufru, vortexován a centrifugován po dobu 30 min při  $14\,000$  rpm (Hettich centrifugen, Německo). Po centrifugaci byl vzorek filtrován přes  $0,45 \mu\text{m}$  filtr a opět  $10\times$  naředěn  $0,2$  M fosfátovým pufrům. Jeden ml takto připraveného vzorku byl za použití peristaltické pumpy Minipulse 3 (Gilson, Francie) aplikován na monolitickou kolonu tvořenou iontoměničovým diskem CIM (BIA separations, Slovinsko).

### Enzymová reakce

Štěpení kolagenu pomocí MMP-9 bylo prováděno v  $0,066$  M fosfátovém pufru o pH 7,5. Enzymová reakce probíhala po dobu 30 min při teplotě  $70^\circ\text{C}$ . Byla použita následující vstupní koncentrace jednotlivých reaktantů:  $100$  ng MMP-9 a  $20$  ng kolagenu.

## Výsledky a diskuse

### Kvantifikace proteinů

Software k přístroji Experion nám umožňuje zobrazit výsledky v podobě elektroforeogramu, kde sledujeme závislost výšky fluorescenčního signálu na čase. Na obr. 2a je zobrazena detekce standardů laktoferinu o různých koncentracích. Kalibrační přímka pro laktoferin ( $y = 0,0126x - 1,978$ ,  $R^2 = 0,994$ , relativní směrodatná odchylka 5,5 %) je ukázána na vloženém obrázku v obr. 2a. Detekční limit byl stanoven postupným ředěním jako 125 ng proteinu v 90  $\mu\text{l}$  (1,4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). V porovnání s průtokovou injekční analýzou spojenou s UV detektorem je detekční limit téměř o dva řády vyšší, ale pro detekci laktoferinu v mléce a dalších biologických vzorcích, které tento protein obsahují, je dostatečný. Navíc nám tato technika nabízí možnosti sledovat rozklad popř. tvorbu složitějších struktur (vicemerů), které bychom nebyli schopni průtokovou injekční analýzou postihnout.

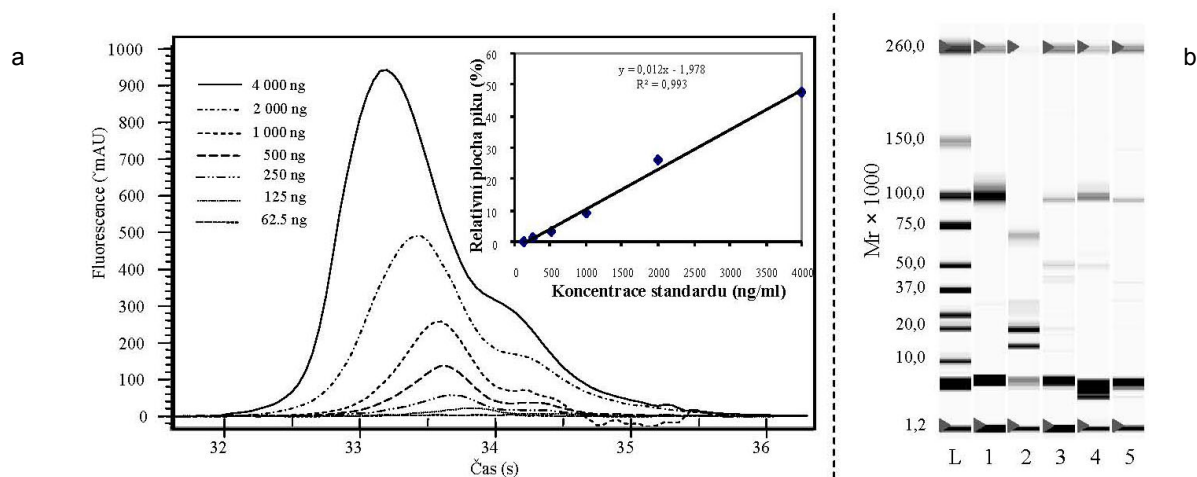
Izolace laktoferinu z kravského kolostra byla provedena pomocí monolitické kolony a postupu převzatého z práce Adam a spol.<sup>23</sup>. Průtok mobilní fáze (5 mM fosfátový pufr o pH 7,25) byl po dobu prvních 20 min separace 0,75 ml  $\text{min}^{-1}$ . Během této doby došlo k zachycení proteinů o izoelektrickém bodu 7,25. V 21. min separace byl fosfátový pufr nahrazen 1,3; 1,5 anebo 2,0 M-NaCl, čímž došlo k eluci zachycených proteinů. Po uplynutí 35 min byla kolona regenerována pomocí 1 M-NaOH po dobu 10 min. Na obr. 2b je ukázána optimalizace separace laktoferinu na monolitické koloně. Dráha číslo 1 zobrazuje standard laktoferinu, kde můžeme vidět intenzivní signál

v oblasti  $M_r \sim 100\,000$ . V dráze číslo 2 je vzorek kravského kolostra před purifikací. Z obrázku je jasně patrné, že zastoupení laktoferinu v původním vzorku bylo minimální, byly detegovány především balastní proteiny. Proto jsme následně použili pro vymytí z monolitické kolony tři výše zmíněné roztoky NaCl o různých koncentracích (1,3; 1,5 a 2,0 M). Analýzu získaných frakcí můžeme vidět v drahách číslo 3, 4 resp. 5. Z obrázku je jasně patrné, že k neúčinnější eluci navázaných proteinů došlo za použití 1,5 M-NaCl (dráha č. 4, obr. 2b). Výsledky byly srovnatelné s daty získanými metodou SDS-PAGE (není ukázáno). Množství laktoferinu kvantifikovaného ve vzorcích kolostra odebraných po 1, 12, 24, 36 a 48 hodinách od porodu byly 0,8; 0,9; 1,2; 0,6 a 0,4  $\text{g l}^{-1}$ . Výsledky kvantifikace laktoferinu byly srovnatelné s výsledky obdrženy pomocí UV detekce<sup>23</sup>.

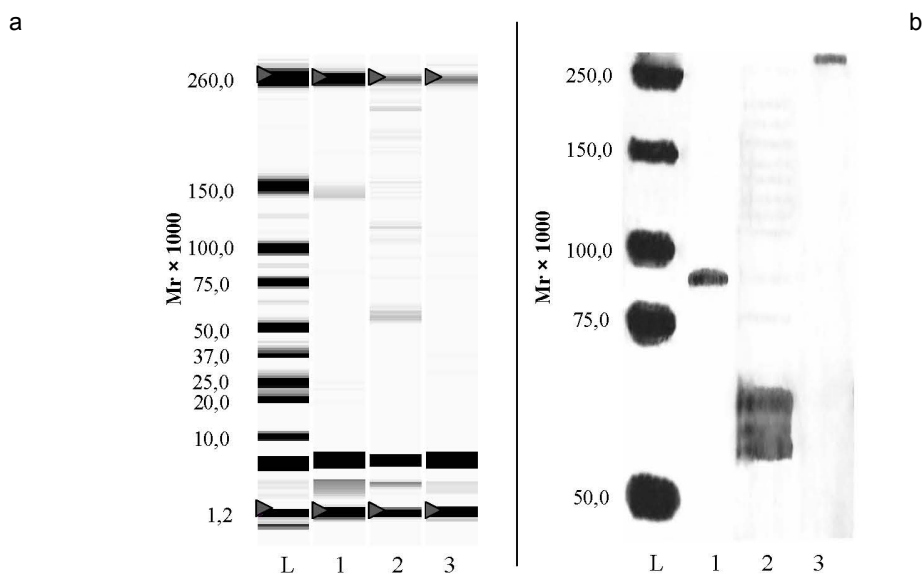
### Protein-protein interakce

Dále jsme se zaměřili na další kovy vázající protein MMP-9. Použili jsme stejnou koncentrační řadu jako v případě laktoferinu a získali jsme lineární závislost výšky detegovaného signálu na koncentraci v podobě  $y = 0,0112x - 2,015$ ,  $R^2 = 0,990$ . Relativní směrodatná odchylka stanovení byla 6,4 %. Detekční limit stanovený postupným ředěním byl 31,3 ng proteinu v 90  $\mu\text{l}$  (350  $\text{ng ml}^{-1}$ ).

V předchozí práci jsme studovali elektrochemickými technikami interakci MMP-9 s kolagenem a prokázali jsme, že jsme schopni tento děj citlivě detegovat<sup>24</sup>. Rozhodli jsme se použít čipovou elektroforézu pro studium štěpení kolagenu pomocí MMP-9 a ověřit tak schopnost této techniky nejen kvantifikovat proteiny, ale také postihnout



Obr. 2. Detekce laktoferinu čipovou gelovou elektroforézou. Elektroforeogram 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000 a 4000 ng laktoferinu (množství proteinu je vztaženo na objem 90  $\mu\text{l}$ ) (a), ve vloženém obrázku je zobrazena kalibrační křivka. Virtuální gel, L: standard Pro-260, dráha 1: standard laktoferinu, 500 ng, dráhy 2–5: kolostrum získané 24 h po porodu izolované za různých experimentálních podmínek, dráha 2: vzorek surového kolostra 10 $\times$  naředěný v 5 mM fosfátovém pufru o pH 7,25, dráha 3: 1,3 M-NaCl, dráha 4: 1,5 M-NaCl, dráha 5: 2,0 M-NaCl, šipka ukazuje systémové piky (b)



Obr. 3. Použití přístroje Experion studium štěpení kolagenu pomocí MMP-9. Virtuální gelový výstup z přístroje Experion: L: standard Pro260, dráha 1: 100 ng MMP-9, dráha 2: 100 ng MMP-9 a 20 ng kolagenu po 30 min při 70 °C, dráha 3: 20 ng kolagenu (a). SDS-PAGE dráha 1: 100 ng MMP-9, dráha 2: 100 ng MMP-9 a 20 ng kolagenu po 30 min při 70 °C, dráha 3: 20 ng kolagenu (b)

nout jejich vzájemné interakce. V dráze číslo 1 na obr. 3a je zobrazena detekce 100 ng MMP-9. V případě analýzy kolagenu (dráha č. 3) není na virtuálním gelu zachycen žádný signál, což odpovídá kompaktnosti a velké molekulové hmotnosti vláken kolagenu. Interakce obou proteinů přinesla výsledek v podobě směsi fragmentů o různé molekulové hmotnosti, která je zobrazena v dráze číslo 2. Tento výsledek nejen potvrzuje štěpení kolagenu pomocí MMP-9, ale také fakt, že jsme schopni tuto interakci detegovat automatickou elektroforézou na čipu. Celý experiment jsme také uskutečnili na SDS-PAGE (obr. 3b). V drahách číslo 1 a 3 můžeme vidět standardy MMP-9 resp. kolagenu. Pomocí této techniky jsme byli schopni detegovat přítomnost fragmentu kolagenu o molekulové hmotnosti přesahující  $M_r$  250 000, kterou jsme díky přístrojovému omezení nebyli schopni rozlišit pomocí Experionu. V případě analýzy směsi obou proteinů jsme získali řadu fragmentů o různých molekulových hmotnostech s nejsilnějším pásem mezi  $M_r$  50 000 až 75 000, což zcela odpovídá záznamu z automatické elektroforézy na čipu (obr. 3a, b). Další fragmenty již nejsou dobře kvantifikovatelné, na rozdíl od čipové elektroforézy, která je citlivější.

## Závěr

Automatizovaná čipová elektroforéza je alternativou klasické SDS-PAGE, kde vyjma několikanásobného zrychlení analýzy jsou její další výhodou výstupy v elektronické podobě ve formě virtuálních gelů a závislosti intenzity fluorescence na čase, což umožňuje spoleh-

livou kvantifikaci sledovaných proteinů a zvyšuje spolehlivost a opakovatelnost analýz.

*Tato práce byla financována ze zdrojů MPO 2A-1591/122 a GA AV KAN208130801. Dále autoři děkují Ing. Marii Balabánové za poskytnutí vzorků kravského kolostra.*

## LITERATURA

1. Terry S. C., Jerman J. H., Angell J. B.: IEEE Trans. Electron Devices 26, 1880 (1979).
2. Dolnik V., Liu S. R., Jovanovich S.: Electrophoresis 21, 41 (2000).
3. Dolnik V.: Electrophoresis 29, 143 (2008).
4. Dolnik V., Liu S. R.: J. Sep. Sci. 28, 1994 (2005).
5. Yao S., Anex D. S., Caldwell W. B., Arnold D. W., Smith K. B., Schultz P. G.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 5372 (1999).
6. Bousse L., Mouradian S., Minalla A., Yee H., Williams K., Dubrow R.: Anal. Chem. 73, 1207 (2001).
7. Zhu K., Nguyen M., Strong W., Whitman-Guliaev C.: Bio-Rad bulletin 2005, 5299.
8. Zhu K., Strong W.: Bio-Rad bulletin 2006, 5423.
9. Wu F., Strong W.: Bio-Rad bulletin 2007, 5784.
10. Debaugnies F., Gulbis B., Cotton F.: Acta Clin. Belg. 64, 179 (2009).
11. He X., Strong W.: Mol. Cell. Proteomics 4, S365 (2005).
12. Gingrich J., Freeby S., Paulus A.: Mol. Cell. Proteomics 4, S364 (2005).



13. Siriamornpun S., Suttajit M., Uthayakumaran S., Wrigley C. W.: *Food Aust.* 57, 448 (2005).
14. Uthayakumaran S., Batey I. L., Wrigley C. W.: *J. Cereal Sci.* 41, 371 (2005).
15. Uthayakumaran S., Listiohadi Y., Baratta M., Batey I. L., Wrigley C. W.: *J. Cereal Sci.* 44, 34 (2006).
16. Minucci A., Delibato E., Castagnola M., Concolino P., Ameglio F., Zuppi C., Giardina B., Capoluongo E.: *J. Sep. Sci.* 31, 2694 (2008).
17. Pfaffl M. W., Fleige S., Riedmaier I.: *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 22, 829 (2008).
18. Butikofer U., Meyer J., Rehberger B.: *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* 61, 263 (2006).
19. Jenssen H., Hancock R. E. W.: *Biochimie* 91, 19 (2009).
20. Gonzalez-Chavez S. A., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 8 (2009).
21. Puente X. S., Sanchez L. M., Overall C. M., Lopez-Otin C.: *Nat. Rev. Genet.* 4, 544 (2003).
22. Krizkova S., Hrdinova V., Adam V., Burgess E. P. J., Kramer K. J., Masarik M., Kizek R.: *Chromatographia* 67, S75 (2007).
23. Adam V., Zitka O., Dolezal P., Zeman L., Horna A., Hubalek J., Sileny J., Krizkova S., Trnkova L., Kizek R.: *Sensors* 8, 464 (2008).
24. Huska D., Adam V., Zitka O., Kukacka J., Prusa R., Kizek R.: *Electroanalysis* 21, 536 (2008).

**O. Zitka<sup>a,b</sup>, S. Křížková<sup>b</sup>, V. Adam<sup>b,c</sup>, A. Horna<sup>d,e</sup>, J. Kukacka<sup>f</sup>, R. Průša<sup>f</sup>, V. Žízková<sup>g</sup>, and R. Kizek<sup>b</sup>**  
 (<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, <sup>b</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, and <sup>c</sup>Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University, Brno, <sup>d</sup>University Institute, Tomas Bata University, Zlin, <sup>e</sup>Radanal Ltd., Pardubice, <sup>f</sup>Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, <sup>g</sup>Research Institute for Knitting, Brno): **Utilizing Automated Chip Electrophoresis for Study of Lactoferrin and Matrix Metalloproteinases**

Automated chip capillary electrophoresis was used in detection and isolation of lactoferrin and a human matrix metalloproteinase (MMP-9) as well as in investigation of interactions and cleavage of collagen with MMP-9. The method is a sensitive and simple technique superior to SDS-PAGE. It is useful in proteomic research.

## SLEDOVÁNÍ ZPŮSOBU VAZBY MODELOVÝCH LÁTEK NA NANOČÁSTICE STŘÍBRA

PAVEL ŽVÁTORA\*, PAVEL ŘEZANKA,  
KAMIL ZÁRUBA a VLADIMÍR KRÁL

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-  
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
pavel.zvatora@vscht.cz

Došlo 10.9.08, přepracováno 16.7.09, přijato 21.10.09.

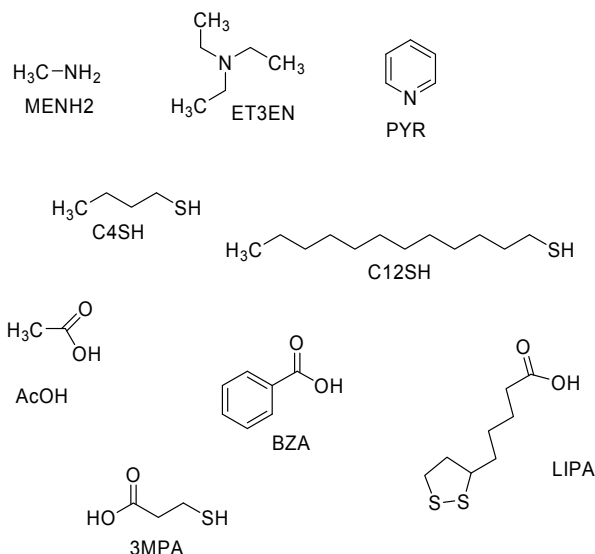
Klíčová slova: nanočástice stříbra, interakce s povrchem,  
SERS, koloidní roztok,

### Úvod

Přímá imobilizace analyticky užitečných receptorů na povrchu nanočástic často není možná, protože neobsahují vhodné funkční skupiny. Proto je nutná předřazená povrchová modifikace multifunkčními molekulami (spacery<sup>1,2</sup>). Jedna funkční skupina je využita pro vazbu na povrch nanočástice, zatímco další, prostorově volná, umožní imobilizaci požadovaného receptoru. Z těchto důvodů je vhodné věnovat se studiu modifikace nanočástic stříbra látkami s různými funkčními skupinami tak, aby při následné modifikaci bylo zřejmé, za jakých podmínek se daná funkční skupina váže nebo s povrchem neinteraguje.

Asi nejznámější je vazba thiolových derivátů<sup>3</sup>, na povrch nanočástic stříbra se ale váží i aminy a dusíkaté heterocykly<sup>4</sup> a s povrchem interagují i karboxylové deriváty<sup>5</sup>. Některé z těchto látek (citrát sodný) lze pak použít při přípravě a stabilizaci koloidních roztoků nanočástic ušlechtilých kovů<sup>6,7</sup>.

Tvar a velikost nanočástic, tedy i vlastnosti povrchu, souvisí se zvolenou metodou přípravy. Tyto faktory mají zásadní vliv na fyzikální a chemické vlastnosti nanočástic. Vhodnou metodou sledování jejich povrchové modifikace je spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS). Jde o techniku, při které dochází k interakci excitujícího laserového záření s povrchovými elektrony některých kovů, mezi něž patří stříbro, zlato a měď. Při vhodné morfologii kovu a vhodné vlnové délce excitujícího záření dochází k řádovému zesílení Ramanova rozptylu<sup>8</sup>. Intenzita měřeného signálu závisí na vzdálenosti molekuly od povrchu nanočástice a s rostoucí vzdáleností výrazně klesá.



Obr. 1. **Struktury modelových látek použitých v této práci.** (MENH2) methylamin; (ET3EN) triethylamin; (PYR) pyridin; (C4SH) butanethiol; (C12SH) dodekanethiol; (AcOH) octová kyselina; (BZA) benzoová kyselina; (LIPA) lipoová kyselina; (3MPA) 3-merkaptopropanová kyselina

V této práci byl sledován vliv koncentrace modelových látek (obr. 1) a vliv pH na způsob jejich vazby na povrch nanočástic stříbra stabilizovaných citrátem. Modelové látky byly vybrány tak, aby jejich struktury a vazebné schopnosti pokryly co možná nejširší oblast molekul, které by bylo možné použít pro zprostředkování imobilizace analyticky užitečných receptorů.

### Experimentální část

#### Chemikálie a zařízení

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. Pro přípravu nanočástic byla použita voda od firmy Merck (LiChrosolv,  $R = 1 \text{ M}\Omega$ ). Absorpční spektra byla měřena na přístroji Varian Cary 400 SCAN. Měření bylo prováděno ve skleněné kyvetě o tloušťce 1 cm v rozsahu 200 až 900 nm s krokem 1 nm a v rozsahu 375 až 475 nm s krokem 0,25 nm. Ramanova spektra byla změřena pomocí Ramanova spektrometru (Deltanu Advantage 785 Near-Infrared Raman Spectrometer). Vlnová délka excitačního laserového zdroje byla 785 nm, měřicí rozsah 100–2000  $\text{cm}^{-1}$ . K interpretaci Ramanových spekter byla použita výpočetní metoda *ab-initio*. Optimalizace molekul a výpočty spekter byly prováděny programem Gaussian<sup>9</sup>. Pou-

\* Pavel Žvátora získal zvláštní cenu poroty v soutěži o cenu firmy Merck 2008 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

žitá metoda a báze byla B3LYP/6-31G\*. Vypočtená spektra byla porovnána s naměřenými spektry, kdy byly identifikovány nejintenzivnější pásy. Z důvodu posunu vlnočtu při imobilizaci nebo interakci s citrátem bylo v případě podobnosti obou spekter vypočtené spektrum vynásobeno korelačním faktorem 0,96 v ose x.

Centrifugace byly prováděny v umělohmotných zku-mavkách o objemu 2 ml na centrifuze Eppendorf Centrifuge 5418. Vzorky byly odstředěny při 13 000 otáčkách za minutu po dobu 10 min (odstředivé zrychlení  $92\,665\text{ m s}^{-2}$ ).

Sonifikace byla prováděna v ultrazvukové lázni Transsonic 570 (Elma<sup>®</sup>, Německo) při 35 kHz.

Při měření pH byl používán pH-metr Mettler Toledo s kombinovanou skleněnou elektrodou (Inlay<sup>®</sup> 413). Přístroj byl kalibrován pufrý o třech hodnotách pH (4,01, 7,00 a 10,00; Merck).

#### Příprava nanočástic

Byly připraveny roztoky nanočástic stříbra vzniklé redukcí  $\text{AgNO}_3$  citrátem sodným. Roztoky byly po přípravě ponechány jeden den v temnu. Ke 2 ml roztoku nanočástic byl poté přidán vodný roztok modelové látky (výsledná koncentrace byla  $1,46 \cdot 10^{-3}$ ,  $3,64 \cdot 10^{-4}$ ,  $9,10 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,275 \cdot 10^{-5}$ ,  $5,70 \cdot 10^{-6}$  a  $1,42 \cdot 10^{-6}\text{ mol l}^{-1}$ ) a výsledný roztok byl po modifikaci ponechán 24 h v temnu.

V případě analýzy necentrifugovaných nanočástic bylo změřeno Ramanovo spektrum a pro měření UV-Vis absorpčního spektra byl roztok, z důvodu zachování platnosti Lambertova-Beerova zákona, před měřením  $10\times$  zředěn vodou. V případě analýzy centrifugovaných nanočástic byl roztok modifikovaných nanočástic centrifugován, redispersován (v ultrazvukové lázni) v původním objemu vody a poté bylo změřeno Ramanovo spektrum. Pro měření UV-Vis absorpčního spektra byl roztok před měřením  $10\times$  zředěn vodou.

Při studiu vlivu pH na imobilizaci AcOH a 3MPA byly užity dva různé postupy, které se lišily okamžikem přidání látky k roztoku nanočástic a okamžikem, kdy bylo upravováno pH. V prvním případě byla přidána studovaná látka a po 24 h v temnu byly modifikované nanočástice odcentrifugovány a redispersovány ve vodném roztoku HCl nebo NaOH podle požadované hodnoty pH. Ve druhém experimentu byl nejprve roztok nedomodifikovaných nanočástic odcentrifugován a redispersován ve vodném roztoku HCl nebo NaOH podle požadované hodnoty pH. K takto připravenému roztoku nedomodifikovaných nanočástic byl přidán vodný roztok studovaných látek a spektra byla měřena po 24 h.

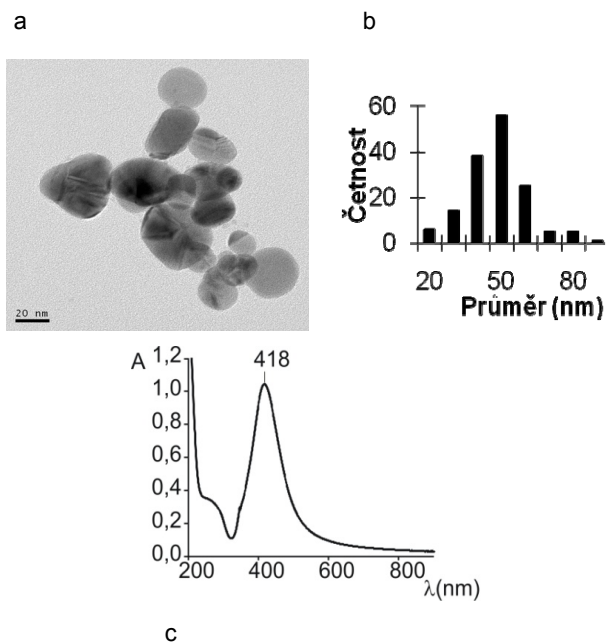
V obou případech byly koncentrace látek v měřených roztocích  $1,46 \cdot 10^{-3}$ ,  $9,10 \cdot 10^{-5}$  a  $5,70 \cdot 10^{-6}\text{ mol l}^{-1}$ . Nastavované hodnoty pH byly 1, 4, 7, 10 a 13. Skutečná hodnota pH byla zjišťována pomocí pH-metru.

Interakce AcOH a 3MPA byly sledovány UV-Vis spektroskopii a povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS). Podmínky měření byly shodné jako v předchozím případě.

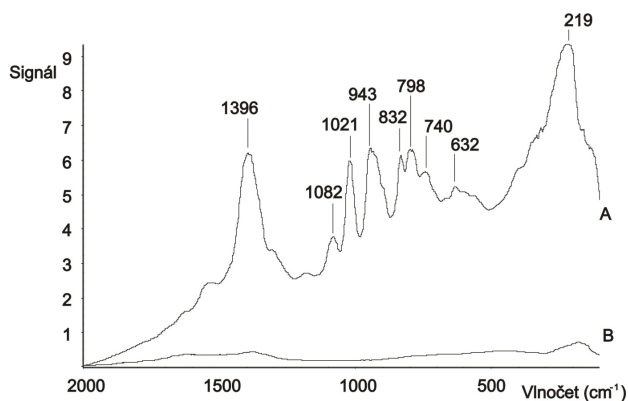
## Výsledky a diskuse

### Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice byly připraveny redukcí  $\text{AgNO}_3$  citrátem sodným za varu<sup>6</sup>. Takto připravené nanočástice poskytovaly dobrý signál v SERS. Touto metodou byly připraveny koloidní roztoky stříbra s širokou distribucí velikosti částic převážně kulovitěho tvaru (obr. 2). Maximum absorbance



Obr. 2. a) Fotografie nanočástic stříbra (TEM); b) rozdělení velikosti těchto nanočástic; c) UV-Vis absorpční spektrum nanočástic stříbra připravených redukcí citrátem sodným



Obr. 3. Ramanovo spektrum citrátu (B) ( $c = 1 \cdot 10^{-6}\text{ mol l}^{-1}$ ) a SERS spektrum citrátu (A) na povrchu nanočástic stříbra. Jednotlivé označené pásy odpovídají spektru citrátu imobilizovaného na povrchu nanočástic stříbra<sup>10</sup>

Tabulka I

Hodnoty absorbance a změny vlnové délky absorpčního maxima ( $\cong 430$  nm) roztoku nanočástic stříbra v závislosti na koncentraci přidané látky. Roztoky nanočástic nebyly přečištěny centrifugací

Vazebný atom	Látka	Koncentrace [ $\text{mol l}^{-1}$ ]					
		$1,46 \cdot 10^{-3}$ A/ $\Delta\lambda$	$3,64 \cdot 10^{-4}$ A/ $\Delta\lambda$	$9,10 \cdot 10^{-5}$ A/ $\Delta\lambda$	$2,28 \cdot 10^{-5}$ A/ $\Delta\lambda$	$5,70 \cdot 10^{-6}$ A/ $\Delta\lambda$	$1,42 \cdot 10^{-6}$ A/ $\Delta\lambda$
N	MENH2	0,666 / 1	0,790 / -2	0,754 / -1	0,742 / 0	0,714 / -6	0,804 / -6
	ET3EN	0,750 / 1	0,778 / 3	0,780 / 2	0,753 / 3	0,778 / 3	0,798 / 3
	PYR	1,060 / 3	1,099 / 3	1,108 / 3	1,060 / 3	1,091 / 3	1,118 / 3
S	C4SH	0,141 / 13	0,175 / 7	0,132 / -1	0,158 / 4	0,495 / 10	0,747 / 7
	C12SH	0,714 / 0	0,774 / 0	0,801 / 1	0,790 / 0	0,821 / 1	0,750 / 0
O	AcOH	0,499 / -3	0,653 / 1	0,695 / 2	0,718 / 1	0,729 / 2	0,772 / 1
	BZA	0,974 / 4	1,025 / 2	1,096 / 2	1,114 / 2	1,098 / 2	1,114 / 2
O/S	LIP	0,239 / -14	0,747 / -5	0,787 / -2	0,764 / -2	0,696 / 1	0,713 / 1
	3MPA	0,301 / 18	0,836 / 10	0,970 / 12	0,528 / 5	1,002 / 0	1,014 / 2

Tabulka II

Hodnoty absorbance a změny vlnové délky absorpčního maxima ( $\cong 430$  nm) roztoku nanočástic stříbra v závislosti na koncentraci přidané látky. Roztoky nanočástic byly přečištěny centrifugací

Vazebný atom	Látka	Koncentrace [ $\text{mol l}^{-1}$ ]					
		$1,46 \cdot 10^{-3}$ A/ $\Delta\lambda$	$3,64 \cdot 10^{-4}$ A/ $\Delta\lambda$	$9,10 \cdot 10^{-5}$ A/ $\Delta\lambda$	$2,275 \cdot 10^{-5}$ A/ $\Delta\lambda$	$5,70 \cdot 10^{-6}$ A/ $\Delta\lambda$	$1,42 \cdot 10^{-6}$ A/ $\Delta\lambda$
N	MENH2	0,438 / -5	0,484 / -5	0,424 / -5	0,435 / -5	0,328 / -5	0,453 / -5
	ET3EN	0,252 / 5	0,277 / 7	0,179 / 8	0,237 / 12	0,155 / 8	0,145 / 9
	PYR	0,787 / 0	0,777 / 1	0,802 / -1	0,848 / -1	0,644 / 1	0,859 / -1
S	C4SH	0,116 / 4	0,122 / 7	0,144 / 10	0,160 / 10	0,252 / 11	0,575 / 10
	C12SH	0,306 / 0	0,441 / 1	0,414 / 1	0,373 / 1	0,418 / 2	0,406 / 1
O	AcOH	0,216 / -8	0,281 / -4	0,367 / 0	0,367 / -1	0,333 / 2	0,442 / 2
	BZA	0,404 / -7	0,674 / -3	0,859 / -1	0,870 / -1	0,752 / -2	0,855 / 0
O/S	LIP	0,227 / -11	0,384 / -2	0,557 / -3	0,501 / -3	0,410 / 0	0,276 / 1
	3MPA	0,310 / 19	0,418 / 8	0,720 / 12	0,197 / 12	0,684 / -2	0,639 / -2

takto připravených nanočástic se pohybovalo od 415 do 430 nm.

Na obr. 3 je Ramanovo spektrum vodného roztoku citrátu sodného a SERS spektrum citrátu absorbovaného na povrchu nanočástic<sup>10</sup>. Koncentrace byla v obou případech stejná. Díky povrchovému zesílení stříbrných nanočástic byly v SERS spektru pozorovány intenzivní signály citrátu.

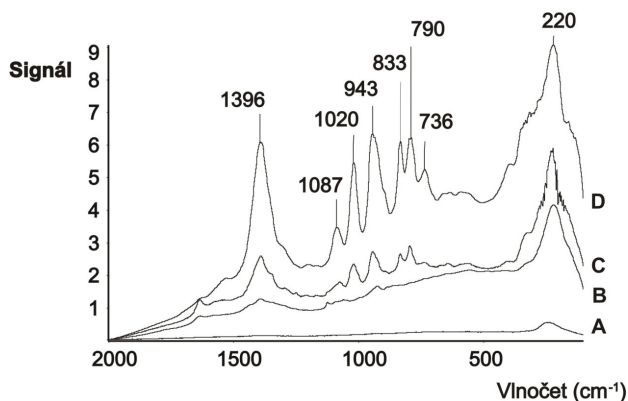
Vliv koncentrace modelových látek na UV-Vis absorpční spektra nanočástic stříbra

Byla změřena UV-Vis absorpční spektra připravených roztoků nanočástic jak před modifikací, tak po jejím provedení. Nanočástice byly modifikovány modelovými lát-

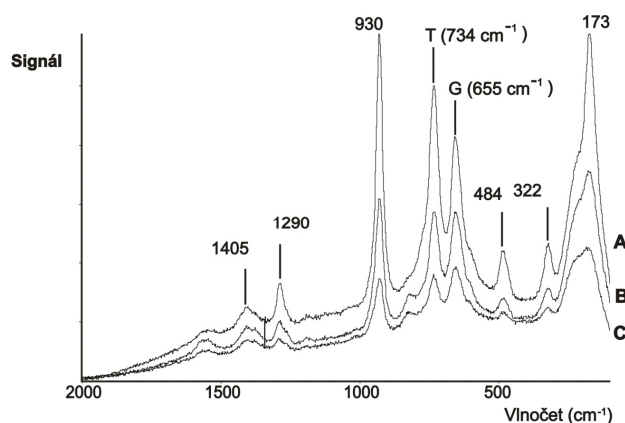
kami a výsledky jsou shrnuty v tab. I a II. Přídavek látek ve všech případech způsobil změnu maximální hodnoty absorbance a v řadě případů i posun vlnové délky tohoto maxima<sup>11</sup>. O interakci studovaných látek s povrchem nanočástic svědčí také to, že posuny vlnové délky absorpčního maxima byly naměřeny i v roztocích modifikovaných nanočástic po centrifugaci, čímž byly z roztoku odstraněny látky nenavázané na povrch nanočástic.

Vliv koncentrace modelových látek na SERS nanočástic stříbra

V případě modifikace stříbrných nanočástic dusíkatými látkami (MENH2, ET3EN, PYR), došlo k výraznému snížení intenzity SERS signálu (obr. 4) oproti nemo-  
 difikovaným.



Obr. 4. SERS spektra (A – PYR, B – MENH<sub>2</sub>, C – AcOH, D – nanočástice stříbra), koncentrace látek byla  $1,46 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Pásky spektra (D) odpovídají spektru citrátu imobilizovaného na povrchu nanočástic stříbra



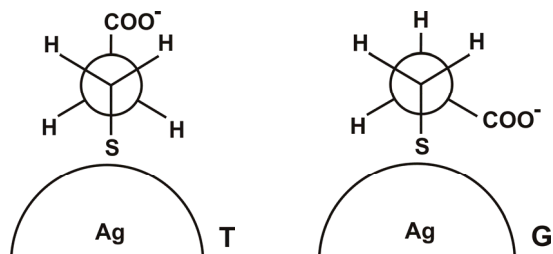
Obr. 6. SERS spektra imobilizované 3MPA při koncentraci A)  $1,46 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ; B)  $9,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ; C)  $1,42 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$

vaným nanočásticím, v jejichž spektrech jsou patrné pásy citrátu. V případě látek s jedinou možnou vazbou přes kyslík (AcOH a BZA) byly v SERS spektru pozorovány signály citrátu s malými změnami (obr. 4). Změny ve spektrech mohou být způsobeny řadou faktorů, např. možnou interakcí citrátu s karboxylovými kyselinami nebo dusíkatými látkami (MENH<sub>2</sub>, ET3EN, PYR), nebo částečnou agregací roztoku nanočástic vlivem změny iontové síly tohoto roztoku spolu se změnou pH.

Interakce látek vázajících se výhradně přes atom síry (C4SH a C12SH) byla potvrzena posunem valenční vibrace CS z  $652 \text{ cm}^{-1}$  v čisté látce (C4SH a C12SH) na  $699 \text{ cm}^{-1}$  (C4SH), resp.  $741 \text{ cm}^{-1}$  (C12SH). Signál u  $699 \text{ cm}^{-1}$  odpovídá konformaci *gauche* a signál u  $741 \text{ cm}^{-1}$  odpovídá konformaci *trans* (cit.<sup>1</sup>).

V případě látky LIPA byla provázena její vazba na povrch nanočástic absencí valenčního pásu SS ( $451 \text{ cm}^{-1}$ ) a pásu valenční vibrace cyklu ( $507 \text{ cm}^{-1}$ ). Toto naznačuje, že se látka vázala na stříbrný povrch přes atomy síry<sup>8</sup>.

Vazba látky 3MPA přes atom síry byla potvrzena absencí valenčně vibračního pásu CS ( $670 \text{ cm}^{-1}$ ), který se rozštěpil na dva nové pásy s vlnovými délkami  $734 \text{ cm}^{-1}$  a  $655 \text{ cm}^{-1}$ . Ty přísluší valenčním vibracím CS *trans* u  $734 \text{ cm}^{-1}$  a CS

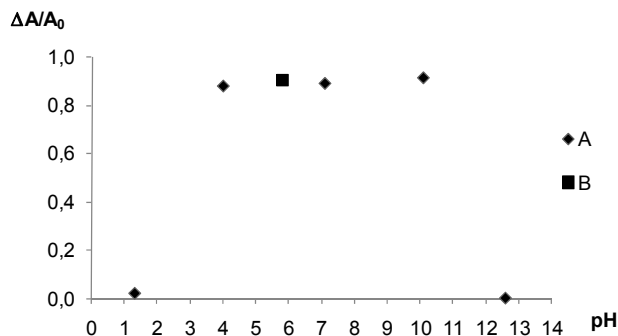


Obr. 5. Schematické znázornění konformace *trans* a *gauche* 3MPA imobilizované na povrchu nanočástic stříbra

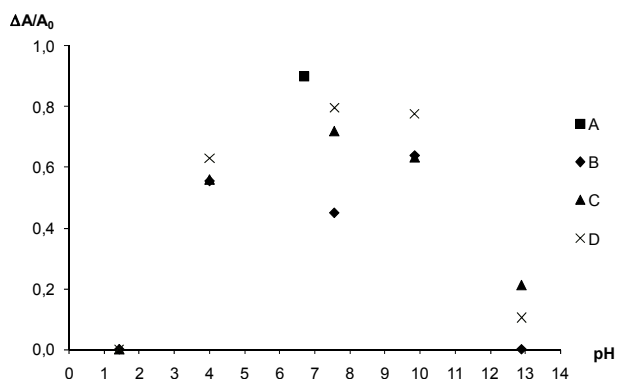
*gauche* u  $655 \text{ cm}^{-1}$  (cit.<sup>1</sup>) (obr. 5 a 6). Na obr. 6 je také zřetelný pás valenční vibrace C-COO<sup>-</sup> u  $930 \text{ cm}^{-1}$ , který byl přítomen při všech koncentracích. Absence pásu C-COOH u  $900 \text{ cm}^{-1}$  znamená, že veškerá imobilizovaná látka 3MPA byla přítomna v disociované formě, nezávisle na její koncentraci<sup>1</sup>.

Vliv pH na UV-Vis absorpční spektra nanočástic stříbra modifikovaných látkami AcOH a 3MPA

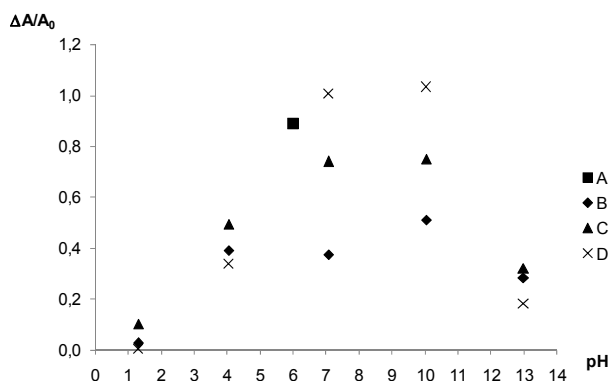
Stabilita citrátových nanočástic stříbra je znázorněna na obr. 7. Hodnota pH byla nastavována roztoky NaOH a HCl a změřena pH-metrem. Poté byla změřena UV-Vis absorpční spektra a SERS spektra. Normalizovaná absorbance (obr. 7) byla získána tak, že byl nejprve vypočten rozdíl absorbance roztoku nanočástic po úpravě pH v jejich absorpčním maximu a absorbance u paty tohoto pásu ( $\lambda_{\text{max}} \cong 320 \text{ nm}$ ). Výsledný rozdíl byl dále dělen hod-



Obr. 7. Závislost normalizované absorbance ( $\Delta A/A_0$ ) nemodifikovaných citrátových nanočástic. Citrátové nanočástice po úpravě pH pomocí roztoků HCl a NaOH (A). Vodný roztok nanočástic stříbra připravených redukcí AgNO<sub>3</sub> citrátem sodným (B)



Obr. 8. Závislost normalizované absorpce čistých nanočástic (A) a roztoku těchto nanočástic s přidávkou AcOH na hodnotě pH. Koncentrace byla (B)  $1,46 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ; (C)  $9,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ; (D)  $5,70 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ . Hodnota pH byla nastavena až po přidávku AcOH



Obr. 9. Závislost normalizované absorpce čistých nanočástic (A) a roztoku nanočástic s přidávkou 3MPA na hodnotě pH. Její koncentrace byla (B)  $1,46 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ; (C)  $9,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ; (D)  $5,70 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ . Hodnota pH byla nastavena až po přidávku 3MPA

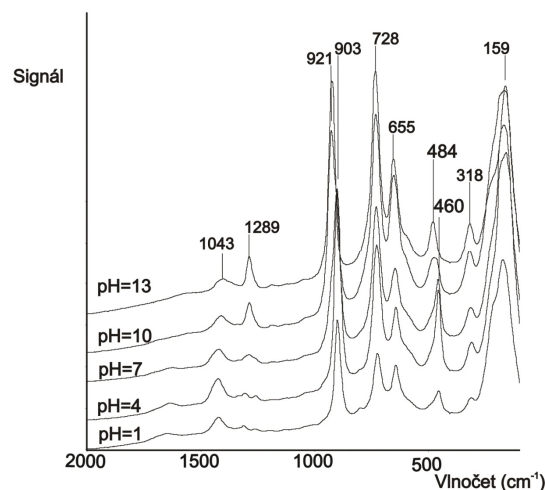
notou absorpce roztoku nanočástic v absorpčním maximu před změnou pH.

Z naměřené závislosti vyplývá, že citrátové nanočástice jsou stabilní v intervalu pH od 4 do 10. Při pH 1,3 a 12,6 docházelo k agregaci nanočástic. Agregace nanočástic je ovlivněna především změnou pH roztoku a částečně také změnou iontové síly tohoto roztoku.

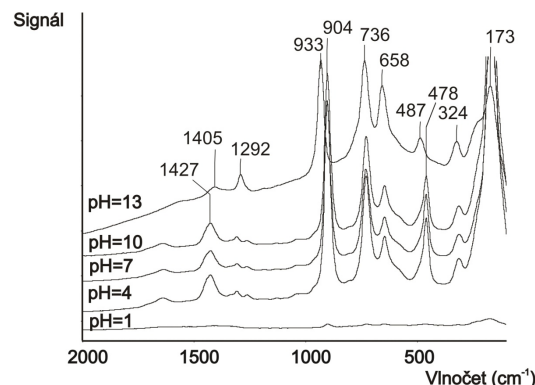
Interakce AcOH a 3MPA byly sledovány při třech různých koncentracích a při pěti různých hodnotách pH. Přidávky k roztoku nanočástic byly prováděny jednak před úpravou pH roztoku, kdy byla vybraná látka imobilizována na povrch a poté byl sledován vliv změny hodnoty pH na příslušnou interakci s povrchem (obr. 8 a 9) a dále pak po úpravě hodnoty pH, kdy byla rovněž sledována interakce karboxylových kyselin s nanočásticemi o předem připraveném pH, v tomto případě bylo zjištěno, že díky malé

pufrací kapacitě roztoku nanočástic dochází k posunu pH jednotlivých roztoků směrem k disociační konstantě jednotlivých kyselin ( $pK_a \approx 4,8$ ).

Na rozdíl od obr. 7 je patrné, že v případě látek AcOH nebo 3MPA dochází ke změně polohy  $\lambda_{max}$  jednotlivých spekter. Tento fakt je zřejmě zapříčiněn ovlivněním stabilizačního činidla na povrchu nanočástic. Vliv koncentrace přidávaných látek na změnu polohy  $\lambda_{max}$  se projevil nejvýrazněji v neutrální a zásadité oblasti. V případě AcOH docházelo při  $\text{pH} \approx 7$  k nejnižšímu poklesu při koncentraci látky  $5,70 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  při stejné koncentraci 3MPA byl při  $\text{pH} \approx 10$  pozorován nejvyšší vzrůst  $\lambda_{max}$ , což lze vysvětlit tak, že v případě 3MPA dochází k výměně molekul citrátu za molekuly 3MPA (cit.<sup>1</sup>), které přispívají ke stabilizaci vzniklého roztoku. Při  $\text{pH} \approx 13$  nedochází v případě přidávků AcOH a 3MPA během doby měření k úplné agregaci. Nejmenší pokles  $\lambda_{max}$  je v obou případech pozorován



Obr. 10. SERS spektra 3MPA o koncentraci  $1,46 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Hodnota pH byla nastavena po přidávkách 3MPA. Spektra byla vzájemně posunuta (pouze v ose y)



Obr. 11. SERS spektra 3MPA o koncentraci  $1,46 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Hodnota pH byla nastavena před přidávkou 3MPA. Spektra byla vzájemně posunuta (pouze v ose y)

při koncentraci látek  $9,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ . Lze se domnívat, že je to způsobeno účinnější stabilizací roztoku nanočástic.

#### Vliv pH na SERS spektra nanočástic stříbra modifikovaných AcOH a 3MPA

Vliv pH v rozsahu hodnot od 1 do 13 byl studován při koncentracích AcOH a 3MPA  $1,46 \cdot 10^{-3}$ ,  $9,10 \cdot 10^{-5}$  a  $5,70 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ . V případě AcOH nebyl pozorován žádný výrazný vliv pH jednotlivých roztoků na polohu pásů v SERS spektru, kolísala pouze jejich intenzita, tyto změny ale nebyly považovány za významné. V SERS spektrech byly patrné pouze pásy citrátu (obr. 3). Lze se domnívat, že tato interakce je zprostředkována citrátem, nebo že se jedná o dynamický systém, kdy dochází k výměně části citrátu vázaného na povrchu nanočástic s octovou kyselinou v roztoku a naopak.

Ukázka naměřených SERS spekter roztoku nanočástic modifikovaných 3MPA o koncentraci  $1,46 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  při hodnotách pH 1, 4, 7, 10 a 13 je na obr. 10. Hodnoty pH byly nastaveny po centrifugaci. Posun vlnočtu pásu z 903 na  $921 \text{ cm}^{-1}$  s rostoucí hodnotou pH odpovídá disociaci karboxylové skupiny za vzniku karboxylátu<sup>12</sup>. Podobný efekt lze sledovat u pásů v oblasti  $460\text{--}484 \text{ cm}^{-1}$  a 1040 až  $1290 \text{ cm}^{-1}$  (cit.<sup>12</sup>).

Změna poměru intenzit pásů u  $655$  a  $734 \text{ cm}^{-1}$  v závislosti na změně koncentrace 3MPA (obr. 6) odpovídá změně konformace této látky na povrchu nanočástic. Tato závislost změny poměru na koncentraci se projevila při pH 4 i při pH 10. Jak ukázala měření (obr. 11), konformace 3MPA na povrchu nanočástic byla nezávislá na hodnotě pH roztoku.

#### Závěr

V této práci byly ověřovány interakce vybraných skupin látek s roztokem stříbrných nanočástic stabilizovaných citrátem. Z naměřených spekter je patrné, že interakce závisí na dané funkční skupině. Byla zjištěna silná interakce citrátu s povrchem stříbrných nanočástic, v jejímž důsledku byly schopny z povrchu nanočástic plně vytěsnit citrát pouze látky vázající se přes atom síry (C4SH, C12SH, LIP, 3MPA). V těchto případech se pak jeví SERS spektroskopie jako ideální nástroj pro sledování vazby na stříbrný povrch nanočástic. Připravené nanočástice stříbra stabilizované citrátem byly stabilní v rozmezí pH od 4 do 10.

V případě látek MENH<sub>2</sub>, ET3EN, PYR, AcOH a BZA nebyla potvrzena jejich vazba na povrch nanočástic pomocí SERS. Vliv koncentrace a pH byl sledován pouze u AcOH a 3MPA.

V případě vazby 3MPA prokázala naměřená SERS spektra, že změna její konformace na povrchu závisí pouze na koncentraci 3MPA v roztoku nikoliv na hodnotě pH tohoto roztoku.

Experimenty s vlivem pH ukázaly, že pro zlepšení kvality SERS spekter 3MPA je vhodné po přečištění stří-

brných nanočástic centrifugací a po interakci s vybranou látkou nastavit pH roztoku na hodnotu kolem 10. Takto získaná spektra se vyznačovala lepším rozlišením jednotlivých pásů a vyšší intenzitou signálu. Totéž platilo i v případě připravených citrátových nanočástic stříbra, kdy SERS spektrum s nejvyšší intenzitou signálu bylo naměřeno po centrifugaci a úpravě pH. Lze se domnívat, že odstraněním přebytečné nenavázané látky z roztoku a volbou vhodného pH lze docílit lepší stabilizaci jednotlivých částic v roztoku, což se může příznivě projevit na kvalitě měřených SERS spekter.

*Tato práce byla podpořena granty KAN200200651, MŠMT 6046137307.*

#### LITERATURA

1. Carot M. L., Macagno V. A., Paredes-Olivera P., Partrito E. M.: *J. Phys. Chem., C* 111, 4294 (2007).
2. Imahori H., Fujimoto A., Kang S., Hotta H., Yoshida K., Umeyama T., Matano Y., Isoda S.: *Tetrahedron* 62, 1955 (2006).
3. Castro J. L., López-Ramírez M. R., Arenas J. F., Oter J. C.: *J. Raman Spectrosc.* 35, 997 (2004).
4. Wang L. R., Fang Y.: *Spectrochimica Acta, Part A* 63, 614 (2006).
5. Castro J. L., Oter J. C., Marcos J. I.: *J. Raman Spectrosc.* 28, 765 (1997).
6. Aiken J. D., Finke R. G.: *J. Mol. Catal., A: Chem.* 145, 1 (1999).
7. Lee P. C., Meisel D.: *J. Phys. Chem.* 86, 3391 (1982).
8. Moskovits M.: *M. Rev. Mod. Phys.* 1985, 57.
9. Gaussian 03, www.gaussian.com, staženo 10.7.2009.
10. Bell S. E. J., Sirimuthu N. M. S.: *J. Phys. Chem.* 109, 7405 (2005).
11. Templeton A. C., Pietron J. J., Murray R. W., Mulvaney P.: *J. Phys. Chem., B* 104, 564 (2000).
12. Kudelski A.: *J. Raman Spectrosc.* 34, 853 (2003).

**P. Žvátora, P. Řezanka, K. Záruba, and V. Král**  
(*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Binding of Selected Compounds to Silver Nanoparticles**

Better detection limits for some analytes can be obtained by using an appropriate detection method combined with surface immobilization of the receptor. To immobilize analytically important receptors on the nanoparticle surface is often impossible because the receptors do not contain suitable functional groups. In this case various multifunctional spacers can be used in which one group is used for the nanoparticle surface binding and another for immobilization of a receptor. The article deals with modification of silver nanoparticles with various compounds containing different functional groups.



## RECENZE

Patric Coffey:

### **Cathedrals of Science. The Personalities and Rivalries That Made Modern Chemistry**

Oxford University Press, 2008.  
379 stran, pevná vazba, 20 £.  
ISBN 978-0-19-532134-0

V kterémkoliv z dobrých knihkupectví si můžeme vybrat z řady pěkných publikací věnovaných fyzice, astronomii, biologii, matematice a příběhům s myšlenkami těchto oborů spjatými. Chemie jako by byla velkých příběhů prosta. Přitom opak je pravdou, historie chemie je plna dramatických momentů lidských i myšlenkových, nemluvě o jejím praktickém významu. Troufnu si tvrdit, že třeba Haberova-Boschova výroba amoniaku z dusíku změnila svět více než objev jaderného štěpení.

Knihá Patricka Coffeyho věnovaná historii fyzikální chemie mne proto potěšila. Autor si omezil časový záběr na dobu od vzniku fyzikální chemie na konci 19. století do poloviny století dvacátého, velmi selektivně také volil probírané osobnosti. Hlavními hrdiny jsou Gilbert N. Lewis a Irving Langmuir, ale dlouho zde defilují také van't Hoff, Ostwald, Nernst, Arrhenius, Haber, Pauling, Seaborg či Urey. Tato jména máme svázána s některou z učebnicových pouček, které nám často připadají samozřejmé. Je přitom užitečné si uvědomit, že třeba Arrheniova disociační teorie vznikala v době, kdy atom byl mnohými považován za pouhou chiméru. Z mého pohledu je ještě zajímavější pohled na dílo, které již odvál čas (kupř. Nernstova lampa), ale hlavně na slepé uličky, do kterých se tito fyzikální chemikové dostali. Chybné myšlenky totiž bohužel velmi rychle zapadnou, i když jsou pěkné. V Coffeyho práci tak můžeme sledovat neúspěšné pokusy Arrhenia prosadit se v imunochémii, Lewisovu neúspěšnou snahu o vysvětlení podstaty záření a Langmuirovu exkurzi do meteorologie.

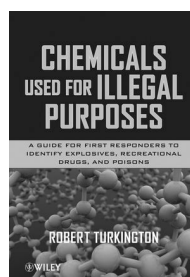
Knihá není pouhým kompilátem, obsahuje řadu původních zjištění, vše je pečlivě dokumentováno poznámkovým aparátem. Ačkoliv tedy nejde o dílo výhradně popularizační, je knihá sepsána čtivě, se smyslem pro dramatickou stavbu. Gilberta Lewise tak nalezneme již v prvním odstavci mrtvého ve své laboratoři naplněné kyanovodíkem. Zdali byl vrahem zahradník se dozvíme až o 300 stran později. Mezitím se výše zmínění fyzikální chemici nesčetněkrát poškorpi, vzájemně proti sobě intrikují a občas řeší svou nelehkou partnerskou situaci. Dlužno dodat, že tyto aspekty jsou v Coffeyho práci podány otevřeně, přesto však vkusně.

Autor každé práce o historii vědy musí uvážit, do jaké míry se věnovat vědě a do jaké vědcům. Coffey píše pro vzdělaného laika, od kterého na počátku nepožaduje ze znalostí chemie mnoho. Poctivě se snaží vysvětlovat, byť

se zákonitě dostává do situací, kdy laik nejspíše nepochopí a odborník nesouhlasí. Pokud by ale čtenář měl touhu dozvědět se o fyzikální chemii v historické perspektivě více, může sáhnout třeba po Laidlerově "The World of Physical Chemistry", ve které je rovnováha chemie  $\rightleftharpoons$  chemik posunuta na levou stranu.

Coffeyho knihá mohu doporučit jako kratochvilnou četbu jak pro chemiky, tak pro studenty a zejména pak pro učitele chemie.

*Petr Slaviček*



### Turkington Robert: **Chemicals Used for Illegal Purposes**

1. vydání, John Wiley & Sons 2010.  
456 stran, pevná vazba, cena pro ČR  
€83,30.  
ISBN: 978-0-470-18780-7

Specialista v oboru, tvůrce Identifikačního Systému HazCat<sup>®</sup>, který je používán minimálně v pěti zemích a v Antarktidě pro identifikaci chemikálií, které někdo někde zanechal a jiný našel. V současné době učí předměty jako: „Observational qualitative analysis, Recognizing chemical weapons manufacturing, a Atmospheric monitoring“ jak pro vládní instituce USA, tak pro EPA a US Army. Pan Turkington pracoval jako Senior Industrial Hygienist v rámci Emergency Risk Assessment Unit, Carcinogen Control Unit a Employee Right to Know Unit ve státě Kalifornie a v rámci University of California výše uvedené předměty. Pracoval též jako „Chief industrial hygienist“ u National Steel and Shipbuilding Company, která byla svého času největší loděnicí na západním pobřeží Kalifornie.

Knihá, kterou napsal na základě svých zkušeností, má pomáhat profesionálům, kteří zacházejí s nebezpečným materiálem (v angličtině to má hezký výraz z Newspeak: hazmat) určit, zda chemikálie a zařízení nalezené na podezřelém místě mohou být použity k výrobě nelegální drogy, výbušniny, pyrotechniky, či nejrůznějších bojových látek a jedů. Shrnuje charakteristické profily (fingerprint) chemických látek a zařízení s tím, že u chemikálií uvádí jejich vzhled, zápach, upozornění na správné zacházení s nimi a způsob identifikace. U zařízení nabízí znázornění typických přístrojů a součástí vybavení, která pomohou identifikovat nelegální laboratoře. Ojedinelá příručka pro kriminalisty, policisty, hasiče, pyrotechniky, drogové specialisty a další pracovníky, kteří potřebují identifikovat podezřelý materiál a reagovat na nález adekvátně a dostatečně rychle. V samostatných kapitolách uvádí nejprve abecední seznam



všeho, s čím se specialista na této scéně může setkat a pak se věnuje nezákonným drogám ovlivňujícím psychu, včetně „rekreačních“ drog. Další kapitoly jsou věnovány pyrotechnice, chemickým zbraním i s ohledem na „další aktivity spojené s prací s hazardními chemikáliemi“ jako například problematice „špinavé bomby“, amatérskému těžení zlata a podobně, ale i domácím koníčkům, které mohou vést k určitému hazardu. Kapitola věnovaná postupům při zacházení s provozy, laboratořemi a zařízeními s neznámým účelem včetně popisu postupu, když „něco páchne“. Jako doplněk jsou uvedeny armádní kódy (US) chemických zbraní, testy na potvrzení hrubého odhadu charakteru nalezené látky. Významnou a užitečnou (anglickou) pomůckou je poměrně rozsáhlý glosář termínů, bibliografie, rejstřík registračních čísel CAS a klasický rejstřík hesel. Mně jako chemikovi v knize chybí strukturní vzorce u chemikálií, o kterých se píše.

Mimořádně cenná pomůcka pro specialisty, která by ale neměla chybět na žádném chemickém pracovišti.

*Pavel Drašar*

Petr Klán, Jakob Wirz:

### **Photochemistry of Organic Compounds.**

#### **From concepts to practice**

John Wiley & Sons, 563 stran, cena 138 € (pevná vazba)

resp. 48 € (paperback).

ISBN: 978-1-4051-9088-6 resp. 978-1-4051-6173-2

Brian Wardle:

### **Principles and Applications of Photochemistry**

John Wiley a synové, 250 stran, pevná vazba, 92 € (pevná vazba) resp. 37,40 € (paperback).

ISBN: 978-0-470-01493-6 resp. 978-0-470-01494-3

Významnou část informací o okolním světě získáváme pomocí světla. V případě chemie je tato závislost na světle patrná velmi zřetelně. Pomocí elektromagnetického záření molekuly „osaháváme“, světlo může navíc molekuly měnit. Barevnost látek fascinovala přírodovědce odjakživa a právě v této oblasti vznikla fotochemie, tj. chemie světla. Stalo se tak v 19. století, které není pouze stoletím páry, nýbrž také stoletím syntetických barviv. Porozumění vztahu mezi světlem a molekulami je dnes čirou nezbytností od biochemie (Proč vidíme? Jaký je mechanismus radiačního poškození nukleových kyselin?) přes analytickou chemii (fluorescence) až moderním technologiím (displeje, solární články, čištění vod).

Typickému studentu se poučení o chemii světla dostává útržkovitě a jaksí na okraj. V organické chemii se dozví něco o pericyklických reakcích, v chemii analytické o fluorescenci, ve fyzikální chemii zjistí, co je to kvantový výtěžek, a v chemii životního prostředí pochopí, jak se tvoří ozón ve stratosféře. Sjednocující bakalářská přednáška vě-

novaná fotochemii z tohoto pohledu může být užitečná.

Wardlova kniha „Principles and Applications of Photochemistry“ je zaměřena právě na bakalářského studenta, kterému stručně a přehledně předkládá základní informace, které by neměly chybět alespoň v podvědomí vzdělaného chemika. Autor většinu knihy věnuje vysvětlení obecných fotofyzikálních konceptů, tj. vysvětluje procesy v Jablonského diagramu, k tomu pak složitější jevy jako mezimolekulový přenos energie či elektronu. Obecný výklad je vždy dokumentován konkrétními příklady. Organická fotochemie je probrána dočista skromně, s omezením na fotochemii dvojně vazby a karbonylové skupiny. Poslední dvě kapitoly věnuje autor moderním oblastem fotochemie: polovodičům v kontextu využití sluneční energie a supramolekulární fotochemii (zde komentuje širokou škálu fotochemických struktur, od fotosyntézy k molekulovým strojům).

Kniha „Principles and Applications of Photochemistry“ je zpracováním autorových přednášek a, ač v pevné vazbě, svou povahou představuje spíše skripta či zápisky z přednášek. I pro účely bakalářské přednášky by knize slušely odkazy na alespoň základní rozšiřující literaturu. Tiživějším nedostatkem je nepřítomnost příkladů k procvičení. Přes tyto nedostatky však Wardleova kniha zůstává užitečným prvním přehledem.

Druhá recenzovaná publikace oslovuje pokročilejšího čtenáře. Kniha profesorů Klána a Wirze vyšla v řadě „Postgraduate Chemistry Series“ a kromě pokročilých studentů se nepochybně stane často používanou referenční příručkou pro aktivní badatele. Ač obsahem mohutná, zůstává tato kniha dobře srozumitelná a přístupná i „nefotochemikovi“. V autorské dvojici je spojen pohled fyzikálního chemika s pohledem chemika organického. Pro organické chemiky je foton především atraktivní reaktant, kterého se však trochu ostýchají. V úvodu knihy proto autoři přesvědčivě vysvětlují, proč by syntetičtí chemikové měli fotochemii mít rádi. Zhruba polovina knihy je věnována fotofyzice, obecným fotochemickým konceptům a instrumentální stránce fotochemie. Jako teoretického chemika mne také potěšila důkladně zpracovaná kapitola věnovaná kvantově-chemickým metodám. Druhá polovina knihy je věnována systematickému přehledu fotochemie organických sloučenin. Základním textem proplouvají šedivě podbarvené boxy „Special Topics“ s různými zajímavostmi ve vztahu k probíranému tématu (jako je fotochemie piva či fotochemická léčba psoriázy) a také boxy „Case Studies“. Kniha je doplněna více než půl druhým tisícem literárních odkazů a lze v ní nalézt i řadu příkladů k řešení.

Photochemistry of Organic Compounds je kniha užitečná a pěkná, navíc prodávaná za cenu zcela přijatelnou. České písemnictví publikacemi o fotochemii nepřekypuje. Jsem proto rád a naplňuje mne jakýmsi obrozeneckým uspokojením, že toto poctivé dílo je produktem také české (resp. moravské) vědy.

*Petr Slaviček*

Jaroslav Malina a kolektiv:  
**Antropologický slovník aneb co by mohl  
 o člověku vědět každý člověk**

Akademické nakladatelství CERM, Brno 2009.

Ilustrace Vladimír Renčín.

(Kniha obsahuje pouze ukázky hesel; kompletní slovník s 20 000 hesly je na příloženém CD.) Celý slovník v elektronické podobě je zdarma zpřístupněn na adrese: <http://is.muni.cz/do/1431/UAntrBiol/el/antropos/index.html>  
 ISBN 978-80-7204-560-0.

Česká odborná i laická veřejnost dostala velmi užitečný a potřebný vánoční dárek. Tím dárkem je obsáhlý a důkladný Antropologický slovník vydaný péčí vedoucího kolektivu prof. Jaroslava Maliny, antropologa z Přírodovědecké fakulty MU v Brně, a neuvěřitelně početného kolektivu autorů, specialistů na různé oblasti.

Jedním z kladů slovníku je, že je, dle mého soudu, jedním z prvních věcných dokumentů, který u nás plní podmínky podpory vzdělanosti prostřednictvím bezplatných informačních zdrojů na internetu podle tak zvané Berlínské deklarace z roku 2003.

Slovník je vydáván ve zkrácené verzi s vybranými hesly knižně. Perlou jsou vtipné a text kongeniálně rozšiřující kresby renomovaného kreslíře Vladimíra Renčina. Součástí slovníku je CD, na kterém je všech 20 tisíc hesel. Slovník je navíc zdarma dostupný v elektronické verzi na výše uvedené adrese. Takto zakotvená publikace má výhodu plné citovanosti zde získaných dat.

Vlastní kniha slouží jako vstup do slovníku, přináší předmluvu se základními informacemi o koncepci díla a vybraná hesla. Následuje bibliografie a cizojazyčné resumé.

Považuji slovník za univerzální dílo, obecně i konkrétně pokrývají veškerou lidskou činnost. V čem může být Slovník užitečný pro chemiky, biochemiky, molekulární biologie a jinými obory zkoumajícími molekulární podstatu života?

V první řadě je to všeobecné rozšíření znalostí o vědních oborech, jen zdánlivě nepříbuzných.

Citace z úvodu Slovníku:

Moderní antropologie (z řečtiny: *anthrōpos*, „člověk“, *logos*, „věda“ = „věda o člověku“) je interdisciplinární vědecký obor hledající odpovědi na základní otázky lidského rodu: „Odkud jsme? Jací jsme? Kam jdeme?“ Vychází z poznání, že lidé a lidská společenství, jejich vznik, vývoj a proměny jsou určovány navzájem se ovlivňujícími danostmi biologickými, medicínskými, psychologickými, sociálními, kulturními atd. Nezbytností v této vědecké disciplíně je proto celostní výzkum. Antropologie studuje biologickou variabilitu člověka, podobnosti a rozdíly ve vztahu k ostatním biologickým druhům (zejména našim nejbližším příbuzným – primátům) a lokální sociokulturní varianty univerzálních struktur lidského myšlení a chování, jejich rozdílnosti a podobnosti v celém kontinuu vývoje i možného budoucího směřování.

Zmíněné celostní rozpětí antropologie odráží obsah *Antropologického slovníku*.

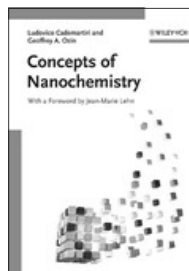
V druhé řadě je to hloubka šíře a výběr hesel. Pro dokumentaci šíře Slovníku jsem vybral několik hesel. Abdomen (anatomie), aberace, chromozomové (molekulární biologie), biochemie, biofyzika, Delfy (historie a místopis), demokracie (politika), denaturace DNA (molekulární biologie), heslo kultura má více než 40 podhesel, metody experimentu, noc (Bartolomějská, Filipojakubská atd.), Nostradamus, nukleosom, sekularismus, sex a sexualita, vědy, Velká francouzská revoluce a řada hesel z literatury a umění, včetně stručných životopisů umělců.

Antropologický slovník jsem seznal jako nesmírně užitečnou, poučnou a univerzální pomůcku pro každého člověka.

Musím a rád, než smeknout před editorem prof. J. Malinou a všemi autory hesel. Hesla jsou zpracována nesmírně pečlivě, stručně a věcně.

Můžu Slovník doporučit všem. Rozhodně si ho osvojit a upotřebíte při práci, učitelé při výuce a všichni jako zdroj poučení a dalšího vzdělání.

Pavel Peč



Ludovico Cademartiri  
 a Geoffrey A. Ozin:  
**Concepts of Nanochemistry**

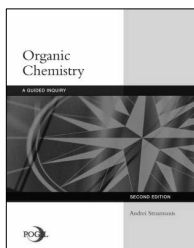
Wiley-VCH, Weinheim, 2009  
 262 stran, paperback, € 39  
 ISBN: 978-3-527-32597-9

Z hlediska atraktivity vědních oborů lze rozlišit určité časové úseky, kdy lidské společenství (zejména politici a média, někdy ale i badatelé samotní) počne významně preferovat určité vědní odvětví nad jinými v souvislosti s očekávaným významným přínosem (ať již skutečným či fiktivním). Tak bychom mohli mluvit o obdobích charakterizovaných předponami jako poly-, eko-, bio- nebo třeba nyní často používanou předponou nano-. Recenzovaná kniha si klade za cíl seznámit odbornou veřejnost s oborem nanochemie, ležícím na rozhraní řady vědních disciplín. Ačkoliv autoři uznávají, že rozdělovat vědní snažení v oblasti nanosvětla na nanofyziku, nanobiologii, nanoinženýrství atd. je poněkud scestné, neboť nano-věda je jednoznačně interdisciplinární, považují jistý stupeň kategorizace za užitečný a předkládají tak čtenáři úvod do tohoto nanosvětla viděný očima chemika a chemických přístupů. Sami pak definují nanochemii jako odvětví chemie, které se zabývá syntézou a samoorganizací stavebních jednotek v kombinaci s vlastnostmi danými jejich povrchem, velikostí, tvarem a defekty. Nanochemie dále vyhledává potenciální využití svých výsledků v chemii, fyzice, materiálových vědách a inženýrství a biologických a medicínských aplikacích.

V knize lze rozlišit tři tematické celky. První takový celek tvoří úvod do koncepce nanochemie, kde je vysvětlen význam některých parametrů (jako např. povrch, velikost, tvar, schopnost samoorganizace) na chování objektů v nano-měřítku. V dalších šesti kapitolách je na konkrétních příkladech (např. zlato, polydimethylsiloxan, oxid železitý, uhlík) ilustrován vliv zmíněných parametrů na často překvapivé chování těchto nanomateriálů. V třetí části knihy jsou popsány reálné „historické případy“ nanochemického výzkumu od syntézy k charakterizaci produktu a jeho konečné aplikaci.

Knihy se velmi dobře čte, má přehlednou grafickou úpravu a mnoho názorných vyobrazení. Termíny, o kterých se autoři domnívají, že nemusejí být čtenáři známy, jsou ihned vysvětleny formou poznámek po straně. Recenzovaný text lze chápat jako učebnici určenou pro úvodní kurs předmětu a s výhodou ji mohou využít jak učitelé, kteří chtějí ilustrovat různé nanochemické koncepce a postupy, tak i studenti, kteří potřebují získat představu o nanochemii z jediného studijního zdroje. Koncepci učebnice podtrhuje i sada kontrolních otázek na konci kapitol věnovaných konkrétním materiálům, jejichž nadpis by bylo možné volně přeložit jako „nanopotrava pro mozek“.

*Pavel Chuchvalec*



Straumanis Andrei R.:  
**Organic Chemistry Plus  
Chemistry Solutions Manual**

2. vydání, Houghton MifflinHarcourt Publishing Co., 2009, 580 stran, brožovaná, cena \$57.71, GBP 27,99.  
ISBN 978-0-618-97412-2

Knížka představuje nový trend ve výuce chemie, který předpokládá, že student při výuce myslí. Je pojat jako

doplňk k tradičním (a často mnohem tlustším) učebnicím, který nabádá k aktivnímu, analytickému a společnému učení v učebnách i mimo ně. Jako takový doplňk, který je formulován jako studentova cvičebnice, přináší některé nové metody výuky chemie, které jsou spíše blíže myšlení badatele než klasického učitele. Nabádá spíše k přemýšlení, než k učení se telefonnímu seznamu zpaměti, jako tomu bylo za časů „zelených příšer“. Cvičebnice analyzuje problémy, vytváří logické závěry založené na pozorování. Při diskusi se znalejšími věci pak studenti získávají spíše pochopení, porozumění a souvislosti než by se učili zpaměti (jakkoliv nepochybuji, že i to je do určité míry potřeba). Zlepšování logických a empirických dovedností dovede studenta k lepšímu porozumění chemii, ale nejen jí. Kapitoly o chemii jsou prostrídány názvoslovnými peripetemi, spektroskopii a zakončeny přehledem probíraných „syntetických transformací“, rejstříkem a tabulkou hodnot  $pK_a$ . Kapitola obvykle začíná výkladem, následují „kritické dotazy“, pak několik užitečných vědomostí k zapamatování, cvičením, pohledem na souvislosti a běžnými nedorozuměními a příklady chybných úvah a závěrů. Knížce bych vytknul pouze nejednotnost obrázků a strukturních vzorců a naprosté nepochopení (nebo neznalost) pravidel IUPAC pro kreslení stereochemických struktur.

Knihy a její autor se odkazují na koncept POGIL (Process-oriented guided-inquiry learning); viz <http://www.pcrest.com/PC/pub/POGIL.htm>, který má údajně zaručit, že studenti na hodinách nespí.

Autor, Andrei Straumanis je „Assistant Professor“ na College of Charleston. Studoval na Oberlin College a Stanford University. Je spoluzakladatelem National Science Foundation and Department of Education-FIPSE sponzorovaného projektu POGIL ([www.pogil.org](http://www.pogil.org)). Učil na Carleton College a University of Washington.

Knížku doporučuji jako velmi užitečnou pomůcku pro studium organické chemie od studia bakalářského výše.

*Pavel Drašar*

OBSAH		CONTENTS	
<b>ÚVODNÍK</b>	137	<b>EDITORIAL</b>	137
<b>REFERÁTY</b>		<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Nanokompozity polyamidů s vrstevnatými silikáty</b>	138	<b>Polyamide – Layered Silicate Nanocomposites</b>	138
R. Puffr a J. Brožek		R. Puffr and J. Brožek	
<b>Termodynamické vlastnosti směsných oxidů v systému CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	147	<b>Thermodynamic Properties of Mixed Oxides in the CaO-SrO-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> System</b>	147
J. Leitner, M. Hampl, D. Sedmidubský, K. Růžička a P. Svoboda		J. Leitner, M. Hampl, D. Sedmidubský, K. Růžička, and P. Svoboda	
<b>CENA MERCK</b>		<b>PRIZE MERCK</b>	
<b>Konformační studie poly-<math>\gamma</math>-benzyl-L-glutamátu metodou vibračního cirkulárního dichroismu</b>	161	<b>Conformational Study of Poly(<math>\gamma</math>-benzyl-L-glutamate) by Vibrational Circular Dichroism</b>	161
P. Novotná M. Urbanová		P. Novotná and M. Urbanová	
<b>Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic</b>	166	<b>Application of Various SPME Methods in Analysis of Herbal Essential Oils</b>	166
V. Mlejsová, P. Pavlíková, P. Dobiáš, M. Adam a K. Ventura		V. Mlejsová, P. Pavlíková, P. Dobiáš, M. Adam, and K. Ventura	
<b>Frakcionace stopových prvků v listech vrby (<i>Salix spp.</i>)</b>	172	<b>Concentration of Trace Metals in Willow (<i>Salix spp.</i>) Leaves</b>	172
K. Mališová, O. Mestek, J. Komínková, J. Šantrůček, J. Száková a P. Tlustoš		K. Mališová, O. Mestek, J. Komínková, J. Šantrůček, J. Száková, and P. Tlustoš	
<b>Elektrochemická detekce mRNA izolované z rostlinných pletiv za využití paramagnetických mikročastic</b>	177	<b>Electrochemical Detection of mRNA Isolated from Plant Tissues Using Paramagnetic Microparticles</b>	177
D. Húska, V. Adam, L. Trnková a R. Kizek		D. Húska, V. Adam, L. Trnková, and R. Kizek	
<b>Voltametrické stanovení 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu na borem dopované diamantové filmové elektrodě</b>	186	<b>Voltammetric Determination of 1-Nitropyrene and 1-Aminopyrene at a Boron-Doped Diamond Film Electrode</b>	186
O. Yosypchuk, K. Pecková, J. Barek		O. Yosypchuk, K. Pecková, and J. Barek	
<b>Stanovení aminobifenylů v pitné a v říční vodě HPLC s elektrochemickou detekcí pomocí borem dopované diamantové filmové elektrody</b>	191	<b>HPLC Determination of Aminobiphenyls in Drinking and River Water Using Electrochemical Detection with Boron-Doped Diamond Film Electrode</b>	191
L. Maixnerová, K. Pecková, J. Barek a H. Klímová		L. Maixnerová, K. Pecková, J. Barek, and H. Klímová	
<b>Použití automatizované elektroforézy na čipu pro studium laktoferrinu a matrixových metaloproteinás</b>	197	<b>Utilizing Automated Chip Electrophoresis for Study of Lactoferrin and Matrix Metalloproteinases</b>	197
O. Zítka, S. Křížková, V. Adam, A. Horna, J. Kukačka, R. Průša, V. Žížková a R. Kizek		O. Zítka, S. Křížková, V. Adam, A. Horna, J. Kukačka, R. Průša, V. Žížková, and R. Kizek	
<b>Sledování způsobu vazby modelových látek na nanočástice stříbra</b>	202	<b>Binding of Selected Compounds to Silver Nanoparticles</b>	202
P. Žvátora, P. Řezanka, K. Záruba a V. Král		P. Žvátora, P. Řezanka, K. Záruba, and V. Král	
<b>RECENZE</b>	208	<b>BOOK REVIEWS</b>	208

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 104 (2010), čís./no. 3 • LISTRY CHEMICKÉ, roč./vol. 134, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 120 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/ CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, M. Koman, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2010 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plné předplatné 2010 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBÓN & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2010 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: P. Holý • Dáno do tisku 25.2.2010.