

A SZERKEZETI ÜVEG TÖBBSZINTŰ VIZSGÁLATA – A MEZOSTRUKTÚRA FELTÉRKÉPEZÉSE MULTI-SCALE ANALYSIS OF STRUCTURAL GLASS, IMAGING OF THE MESOSTRUCTURE

MOLNÁR GERGELY¹, MOLNÁR LÁSZLÓ MILÁN², BOJTÁR IMRE³

Kulcsszavak: többszintű elemzés, kalcium-nátrium-szilikát üveg, AFM, mikro-CT, zárványok

Keywords: multiscale analysis, soda-lime-silica glass, AFM, micro-CT, inhomogeneities

Összefoglalás

Jelen cikkben egy olyan kutatómunkáról számolunk be, amelynek célja a szerkezeti üvegek mezo-szerkezetének feltérképezése. A téma egy átfogó mechanikai elemzést készít elő, melynek célja a szerkezeti üvegek mikroszintű viselkedésének megértése.

A feladat rövid ismertetése után egy korábban elvégzett laboratóriumi kísérlet [1] eredményeit magyarázva mutatjuk be az üveg mezo-szerkezetében található hibákat.

A szerkezeti elemként használt üveglemezben három jelentős feszültségkoncentrációs hely létezik. A **felületen** nagy mennyiségű mikrokarc található, amelyek hatása azonban kisebb az üveg élmegmunkálásából adódó hibákhoz képest. Az üveglemezek vágásából és csiszolásából eredő egyenetlenségek jelentősen gyengítik a szerkezeti elem effektív szilárdságát, így az **élt** tekintettük második vizsgálandó régióknak. A harmadik hibacsoportot a gyártásból eredő **zárványok** alkotják, melyek ritkán fordulnak elő, de nagy feszültség-csúcsot okoznak.

A cikkben bemutatásra kerülnek a felhasznált technikák. Az üveg felületét és élt atomerő mikroszkóppal (AFM), az üvegben lévő zárványokat μ CT-vel vizsgáltuk. A feltérképezés után a felvételek segítségével végelelemes modelleket készítettünk.

Az eredmények bemutatása és egy rövid összefoglalás zárja a cikkünket.

Abstract

Present study deals with the mesostructure analysis of the structural glass. The subject is about to prepare a comprehensive mechanical analysis, aimed on the understanding of the multiscale mechanical behaviour of soda-lime-silicate glass used as an architectural element.

After a brief description of the μ and mesostructure of glass we will explain our goals in this analysis. We began with a macroscopic experiment [1], the results of this work led us to a conclusion, that the glasses effective tensile strength had 11 % relative standard deviation, and it had a typical fracture picture. We would like to explain these results with a mesoscopic approach.

We have divided the glass plate – from a mesoscopic aspect – into three major regions. The first region is the **surface**, which is the largest area of a plate. The effect of the surface imperfections is negligible due to a grinded **edge finishing**, so we considered the second region as the edge. The third region contains the **inhomogeneities** in the glass material itself. Generally there are only a few inhomogeneities in glass, but they cause a great stress peak in the material. To describe the mesostructure we have done atomic force microscopy (AFM) and μ computed tomography (μ CT) scans. We used the first equipment to image the surface and the edge of the glass, and the μ CT was used to collect geometrical information about the voids and inclusions which were left after the manufacturing process. Finally the results and a brief summary are going to closes the thesis.

1. Ph. D. hallgató, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Tartószerkezetek Mechanikája Tanszék, 1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3. K mf. 35. Tel.: 463-1345; e-mail: gmolnar@mail.bme.hu

2. egyetemi adjunktus, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Elektronikai Technológia Tanszék, 1111 Budapest, Goldmann György. tér 3 Tel.: 463-1111; e-mail: molnar@ett.bme.hu

3. egyetemi tanár, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Tartószerkezetek Mechanikája Tanszék, 1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3. K mf. 35. Tel.: 463-1160; e-mail: ibojtat@mail.bme.hu

1. Ph.D. student, Budapest University of Technology and Economics, Department of Structural Mechanics, H-1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3. K mf. 45. Phone: (36-1) 463-1345; e-mail: gmolnar@mail.bme.hu

2. Assistant professor, Budapest University of Technology and Economics, Department of Electronics Technology, H-1111 Budapest, Goldmann György tér. 3., V2, 2nd floor. Phone: (36-1) 463-2740; e-mail: molnar@ett.bme.hu

3. Professor, Budapest University of Technology and Economics, Department of Structural Mechanics, H-1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3. K mf. 45. Phone: (36-1) 463 1160, e-mail: ibojtat@mail.bme.hu

BEVEZETÉS

Az üveg – transzparenciájának köszönhetően – napjaink egyik legnépszerűbb építőanyaga. Az anyagnak magának elképesztő szilárdsága van, azonban az építőipari tervezési szabványok jelentős hányada komoly megkötésekkel él az effektív szilárdság megadását illetően [2]. Az **1. ábrán** az üveg effektív szilárdságát tüntettük fel a hatékony repedéshossz függvényében. Jól látszik, hogy ha egy edzett üvegtáblát választunk, akkor annak makroszkopikus szilárdsága nagyságrendekkel alulmarad az üvegszálakéhoz képest. A jelenség magyarázatát az anyag amorf struktúrájában kell keresnünk. A molekulaszervezetnek köszönhetően az üveg rideg anyagként viselkedik, így egy apró hiba komoly feszültségcsúcshoz vezet.

A törési folyamat megértéséhez elengedhetetlen, hogy megismerjük az anyag mezostruktúráját, így pontos információt szerezzünk a felületi hibákról és a térfogatban elhelyezkedő zárványokról.

A vizsgálat során AFM (atomerő mikroszkóp) és μ CT (mikro-komputertomográfia) segítségével építettünk vége-selelemes modellt ANSYS 13.0 rendszerben.

Az egyértelműség kedvéért rögzítjük, hogy a továbbiakban a szóda-lime-szilikát anyagú változatot fogjuk üvegnek nevezni⁴.

MAKROSZKOPIKUS KÍSÉRLET

Az EN 1288:3-2000 [4] szabványnak megfelelő korábbi kísérletünkben szerkezeti szinten vizsgáltunk; négyponos hajlításhoz vetettünk alá laminált szerkezeti üvegtáblákat. A kísérlet során mértük a lehajlást, valamint nyúlásmérő bélyegek segítségével az alakváltozásokat az alsó és felső üvegtábla külső felületén.

Az üveg effektív húzószilárdságára 160 MPa körüli értékeket mértünk, az eredmények relatív szórása 10.66% volt. (**1. táblázat**)

Kevés kivételtől eltekintve az első repedés a tábla élének igen szűk környezetében keletkezett. A további vizsgálatokhoz ez adta a kiindulási alapot, ezt a jelenséget szeretnénk mezoszintű elemzéssel megmagyarázni. Jelen cikkünkben szeretnénk bemutatni az üveg mezostruktúrájának leírására használt módszereinket, és néhány előzetes eredményt.

A vizsgálatokhoz használt mintadarabokat két társaságtól kaptuk. A zárványokat a Guardian Magyarország Kft.-nek, a táblák széléből vett mintákat az OROSházaGLAS Kft.-nek köszönhetjük. Felületi mintákat mindkét cégtől vizsgáltunk.

4. A magyar üveg szó az alán eredetű „jéveg” és „ög” szó összeolvadásával keletkezett, melyek jelentése: jég. Erre utal az „üveghelyen túl” kifejezésünk.

INTRODUCTION

Glass is one of the most popular building materials nowadays. The material itself has a very high strength, but most of the design standards make very serious restrictions about the effective tensile strength of the glass [2]. On **Figure 1** you can see the glasses effective tensile strength is the function of the effective crack length. That means if we look at a tempered structural glass plate, the effective tensile strength will be much lower than a glass fibers one. The explanation of these phenomena is in the amorphous structure of the material. Thanks to the atomic structure, the material is completely brittle, a small flaw or inclusion cases a great stress peak in the materials structure.

It is essential to describe the mesostructure of the glass, to know the exact effect of the flaws and inclusions. That is the reason of the multiscale analysis. We built finite element models in ANSYS 13.0, using the data which was gathered with AFM (Atomic Force Microscopy), and μ CT (micro Computed Tomography).

During the article we will call the soda-line-silica as glass⁴.

MACROSCALE EXPERIMENT

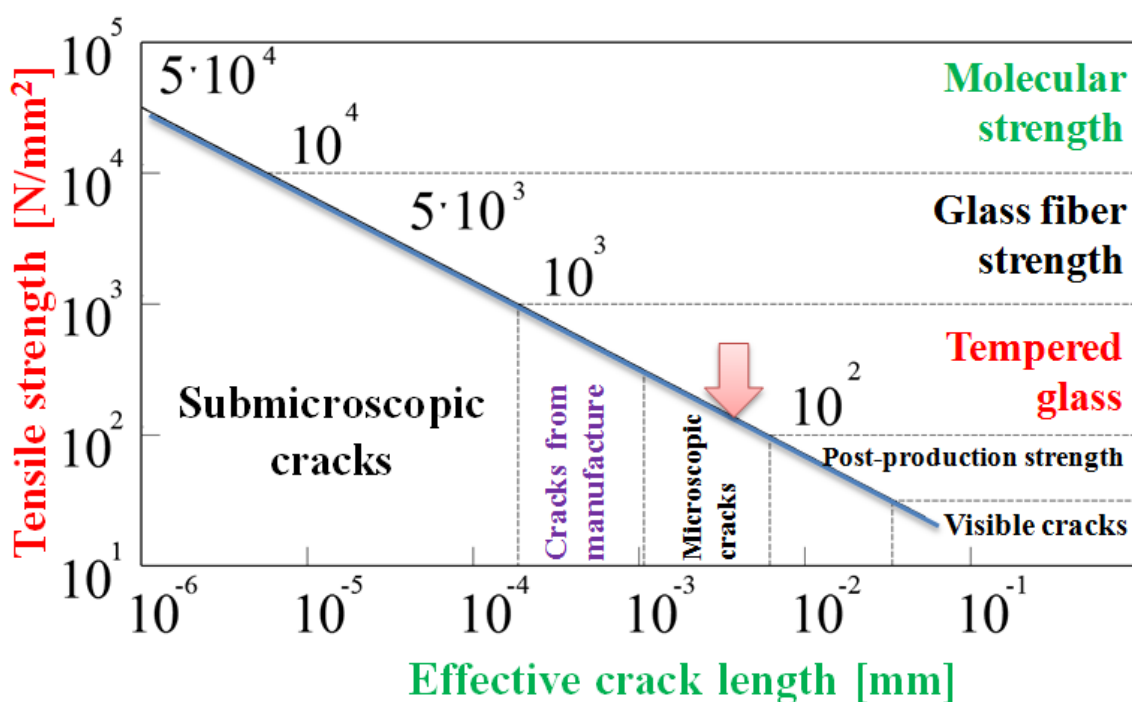
In a former experiment [1], we did a large scale, macroscopic investigation according to the standard EN 1288:3-2000 [4]. It is basically a four point bending test on laminated structural glass plates. During the experiment we measured the deflections and the strains in the middle region. There were strain gauges on the upper and on the lower glass plates.

We can see that the effective tensile strength was approximately 160 MPa, according to the measurement. The strength data had a 10.66 % standard deviation. (**Table 1**)

In almost every case the first fracture manifested very close to the edge. We would like to explain the results with the mesoscale investigation. In this article we will show the methods we used to describe the mesostructure of the glass and some preliminary results.

We received the specimens from two companies. The inclusions were provided by the Guardian Hungary Co. Ltd., the edge pieces were provided by OROSházaGLAS Ltd. We have received surface specimens from both companies to.

4. The English word glass originates from the Latin word gleasum, which means amber in English



1. ábra Effektív húzószilárdság a hatékony repedéshossz függvényében [3]

Figure 1 Effective tensile strength in the function of the effective crack length [3]

1. táblázat A mért alakváltozásokból számított effektív húzószilárdság

Table 1 Effective tensile strength calculated from the measured strains

Layer structure	Measured effective tensile strength
[mm]	[N/mm ²]
6 - 0.76 - 6	168.59
6 - 1.52 - 6	180.23
10 - 0.76 - 10	165.55
10 - 1.52 - 10	134.00
10-0.38-10-0.38-10	152.00
Average	160.07
Standard deviation	17.70
Relative standard deviation	10,66 %

MULTISCALE MEGKÖZELÍTÉS

Mit is nevezünk több szintű vizsgálatnak? A 2. ábrán az üveg négy különböző szintű megközelítése látható. Az első (nano)szinten a molekuláris struktúra kötési energiáit tudjuk meghatározni. Ezt a „molekuláris dinamikai modellezés” segítségével oldhatjuk meg. A módszert használhatjuk dinamikus mikrorepedés terjedés vizsgálatára amorf szilícium-oxidban, ahogy ezt Rountree et. al. tette [5]

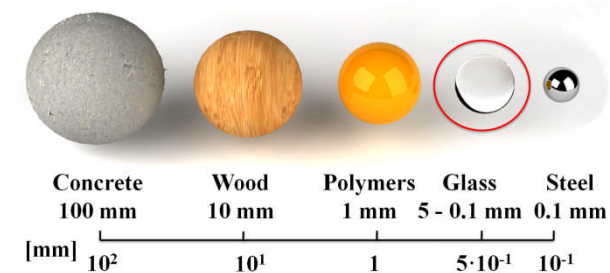
Mérnökként minket sokkal jobban érdekel a makroszint, aminek az eredményei a hétköznapi tervezési gyakorlatban is jól alkalmazhatók. A mikro és makroszint közti kapcsolatot egy harmadik típusú, ún. mezoszintű analízissel teremthetjük meg.

A mezoszintű vizsgálathoz először meg kell határoznunk az üveg legkisebb jellemző térfogatelemének a méretét (RVE). Az RVE az a legkisebb térfogat, ami tartalmazza az anyag összes releváns mechanikai tulajdonságát, amit vizsgálni szeretnénk. Vizsgálataink azt mutatták, hogy az üveg RVE-je a mezoszintű vizsgálathoz 0,1-5 mm között van (3. ábra). Az anyagban talált inhomogenitásoknak mindig sokkal kisebbnek kell lenniük, mint az RVE, aminek viszont sokkal kisebbnek kell lennie a makroszintű szerkezeti méreteknél.

Vegyünk példaként egy üvegtáblát, amit a vizsgálatokhoz célszerű különböző régiókra osztanunk. Az első ilyen régió célszerűen az üvegtábla felülete – AFM kép a 4. ábrán –, itt jól látható, hogy a felület tele van mikroszkopikus karcokkal és egyéb sérülésekkel. Következő régiónak a tábla élét választottuk. Az egyes táblák élmegmunkálása sokféle lehet, a vizsgálatainkat a polírozott és számolt élekre korlátoztuk, nem foglalkoztunk savmárt és homokfújt felületekkel. A harmadik régiót alkotó zárványok vizsgálata a legösszetettebb.

MÉRÉSI TECHNIKÁK

Az üveg mezostruktúrájának leírásához két vizsgálati technikát alkalmaztunk. A felületről és az élekről AFM-mel, a zárványokról μ CT-vel készítettünk felvételeket.



3. ábra Az üveg RVE-jének elhelyezése
Figure 3 Positioning the glasses RVE

MULTISCALE CONCEPT

What is multiscale analysis anyway? On Figure 2 you can see four levels of the material glass. The first level is a nanoscopic problem here we have to calculate the bounding energies of the molecular structure. This analysis can be done by using molecular dynamic simulations. We could use the same method to investigate a dynamic microcrack evolution in amorphous silica, done by Rountree et. al. [5].

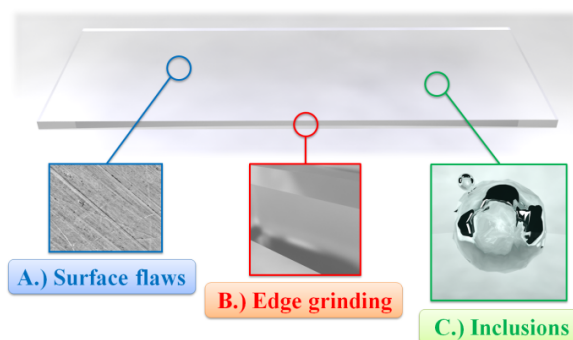
But we always want to reach a macroscopic level, which can be used by practicing engineers. To connect the micro and the macro level, we have to do another type of analysis. This is the mesoscopic investigation.

Before we begin we must define the RVE for the glass. The RVE is a Representative Volume Element which contains all the relevant mechanical properties of the material, which we would like to analyse. According to our investigation, for a mesoscopic analysis we could put the glasses RVE between 0.1-5 mm range (Figure 3). All the inhomogeneities must be much smaller than the RVE, but the RVE must be also smaller than a macroscopic structural element.

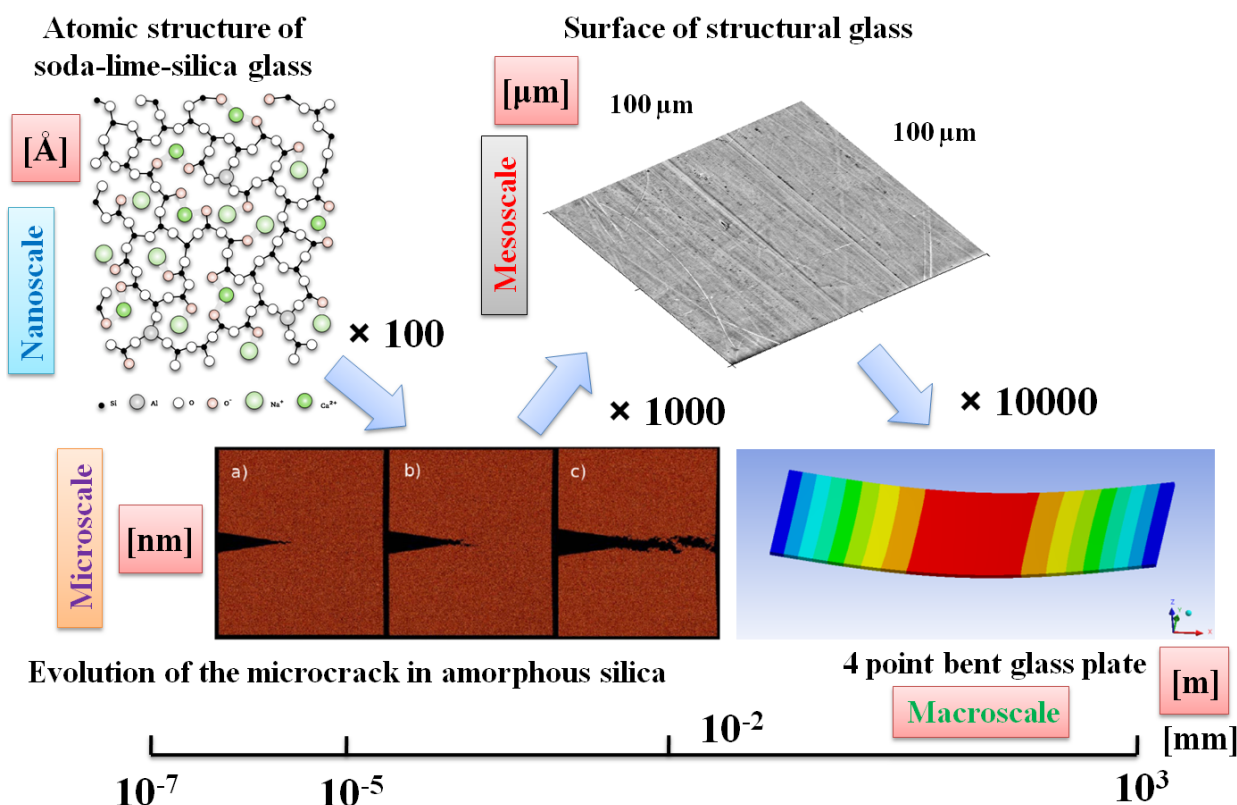
Let's consider a glass plate. First we have to divide the plates into regions. The first region is the surface (AFM image). You can see on Figure 4 that the surface is full with microscopic flaws and scratches. The second region is the edge. The edge can be processed in many ways. My investigation is only extended to grinded and polished edges. We didn't consider acid etched or sand blasted glass surfaces. The third region is the most difficult part, the inclusions.

MEASURING TECHNIQUES

To describe the mesostructure of the material, we have used two techniques. To map the topology of the surface and the edge we have used AFM (Atomic Force Microscopy). To measure the inclusions we have used μ CT.



4. ábra Az üveg mezoszintű régiói
Figure 4 Glass plate mesoscopic regions



2. ábra A több szintű megközelítés sematikus ábrája
Figure 2 Schematic figure of the multiscale approach

AFM (ATOM ERŐ MIKROSKÓP)

A felület vizsgálatát SEM-mel (pásztázó elektron mikroszkóppal) kezdtük. Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy az él annyira egyenetlen, hogy nincs szükség további előkészítésre az AFM-es (Atom Erő Mikroszkóp) mérésekhez. Bár az üveg felülete szinte teljesen simának tűnt, de a [6]-ban ajánlott módszerrel még tisztítottuk a vizsgált próbatesteket, hogy láthatóvá tegyük a mikroszkópikus karcokat. Megjegyezzük, hogy ezt a finom módszert bioszenzorok felületének tisztítására is használják. [7]

A mintadarabokat 5 percre 25%-os ammónia (NH₃OH), 30%-os hidrogén-peroxid (H₂O₂), és víz 1:1:5 tömegarányú 80 °C-os keverékébe merítettük, így eltávolítottuk a szerves és könnyűfém eredetű szennyeződések.

A következő fürdő szintén 5 perces volt, 37,5%-os sósav (HCl), 30%-os hidrogén-peroxid (H₂O₂) és víz 1:1:5 tömegarányú, 80 °C-es keverékébe mártottuk a mintákat.

AFM (ATOMIC FORCE MICROSCOPY)

Before we started the surface and the edge examination, we made SEM (Scanning Electro Microscopy) images from the specimens. We have decided, that the edge is so uneven, that it does not need any preparation before the AFM test. But the glass surface was very smooth, so we have decided to clear the surface with the procedure based on the recommendation of [6] to make visible the microflaws. The procedure is used to clear biosensor surfaces [7] as well.

The surface specimens were immersed into a 1:1:5 (volume) mixture of 25% ammonia (NH₃OH), 30 % hydrogen peroxide (H₂O₂) and water. The mixture was heated to 80 °C, and the specimens was in the liquid for 5 minutes. The first step removed all organic compounds, and some of the light metals.

The second step was to treat the surface with the 1:1:5 volume mixture of 37.5 % hydrochloride (HCl), 30 % hydrogen peroxide (H₂O₂) and water. The second mixture was also heated to 80 °C. The specimens were in the mixture for 5 minutes.

A fürdők után az üveg felületét kétszer leöblítettük hidrogén peroxiddal, metilalkohollal, diklórometánnal és dietil éterrel. Az esetleges dietil éter maradványokat nitrogén gázzal távolítottuk el az AFM mérések előtt. [6] szerint a fent részletezett tisztítási eljárás ilyen rövid idő alatt nem változtatja meg az üveg felületét.

A kontakt atomerő mikroszkóp működése egy kantilevernek (konzolnak) is nevezett nagyon érzékeny rugón alapszik, ami egy hegyes formában végződő tű. Ezt a kis hegyet nyomjuk a vizsgált minta felületére egy jól meghatározott laterális erővel. Ezután a mintát egy precíz piezoelektromos szkennelrel x-y irányban mozgatjuk. A kép a kantilever függőleges alakváltozásából épül fel, amit lézeres reflexióméréssel határozunk meg. A lézernyaláb a kantileverről visszaverődve jut egy 4 szegmenses fotodetektorba (lásd 5. ábra).

Praktikus okokból kifolyólag a z irányú (magassági) adatot nem közvetlenül a fotodetektor feszültségéből határozzuk meg, hanem egy PID visszacsatolt hurokból, ami a fotodetektor és a piezoelektromos szkennel harmadik, z irányú tengelyét kapcsolja össze. Ha a lézer azt jelzi, hogy a lehajlás megváltozott a referencia fotofeszültséghez képest, ami azt mutatja hogy a hegy és a kantilever fel vagy lefelé mozog, a piezoszkennel az ellentétes irányba mozdul el, és egy negatív visszacsatolású hurkot képez. A z irányú információt a piezoszkennel z irányú vezérlőfeszültségéből kapjuk. Az AFM mérésekhez Veeco Innova universal SPM (Scanning Probe Microscopy) eszközt használtunk.

A kontakt AFM mérésekhez rendkívül nagy érzékenységű szilícium-nitrid mérőfejeket alkalmaztunk 0,06 N/m-es átlagos rugóállandóval.

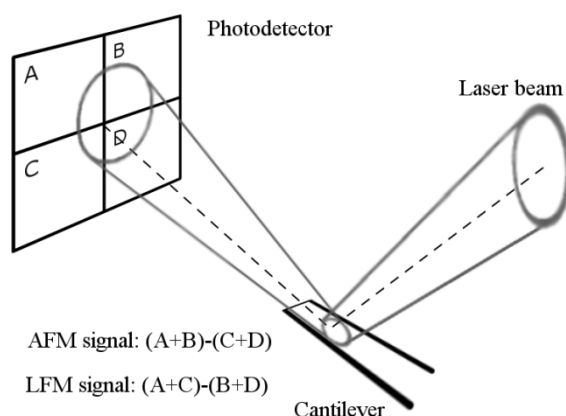
After the chemical bath, the glass surfaces were rinsed twice with hydrogen peroxide, methanol, dichloromethane and diethyl ether. All the residual diethyl ether was removed with nitrogen gas before the AFM imaging.

According to [6] the cleaning procedure does not etched the surface in this short period of time.

Contact atomic force microscopy is based on a very sensitive spring (called cantilever), which ends in a sharp tip. This tip is pushed down to the surface of the sample with a well-defined lateral force. Then, the sample is moved by a precise piezoelectric scanner in the x and y lateral directions. The image builds up from vertical deflection of the cantilever, which is measured by laser reflection. The image builds up from vertical deflection of the cantilever, which is measured by laser reflection. The laser beam is reflected on the cantilever, and gets into a four-segment photodetector (see Figure 5).

For practical considerations, the z (height) data do not come from the photo-voltage itself, but from a PID feedback loop. This loop connects the signal of the photodetector, and the third, vertical axis of the piezoelectric scanner. If the laser indicates that the deflection changed compared to a reference photo-voltage (called set-point), showing that the tip, and the cantilever moves up or down, the piezoscaner will move in the opposite direction, creating a negative feedback loop. The z information originated from the z driving signal of the piezo. We used Veeco Innova universal SPM (Scanning Probe Microscopy) instrument for AFM investigations.

For contact mode AFM, very high sensitivity silicon-nitride probes were used with average spring constant of 0,06 N/m.



5. ábra Az AFM optikai egységének sematikus vázlata [8]; Veeco dilnnova multi-purpose SPM
Figure 5 Schematic of laser reflection in AFM optical unit [8]; Veeco dilnnova multi-purpose SPM

MIKRO-CT

Az inhomogenitások vizsgálatához μ CT-t használtunk. A mikro komputertomográfia széleskörűen elterjedt és használt háromdimenziós képalkotási eljárás. A készülék 2D röntgen képeket készít, amiből egy célszoftver segítségével felépíthetjük a vizsgált tárgy 3D képét.

A képeket egy vagy több detektor rögzíti. Miközben a röntgenforrás mozog a vizsgált tárgy körül, a detektorok 5 fokként képeket készítenek. Miután a szükséges képeket rögzítettük, egy számítógép rekonstruálja az egyes szeletek képeit, amikből elkészíthető a 3D-s test. A nyers adatok egy analóg digitális konverzió után a memóriába kerülnek, ahol egy digitális mátrixot alkotnak, ahol a mátrix minden eleme egy voxel röntgen sugárgyengítési képességét reprezentálja [9]. Az anyagok röntgen elnyelő képességét Hounsfield Unitban (HU) fejezhetjük ki. Ez egy szabványos, széles körben elfogadott egység, ami a vízhez és a levegőhöz képest adja meg a sugárgyengítési képességét az anyagoknak. A röntgenabszorpciós képesség anyagi jellemző, ami az összetevők atomi rendszámától, sűrűségétől, és a sugárzás frekvenciájától függ. A levegő elnyelő képessége definíció szerint -1000 HU, a vízé 0 HU. Egy μ_x lineáris csillapítási együtthatójú anyag HU értékét a következőképpen határozhatjuk meg:

$$HU = \frac{\mu_x - \mu_{H_2O}}{\mu_{H_2O} - \mu_{air}} \times 1000,$$

ahol μ_{water} és μ_{air} a víz és a levegő lineáris csillapítási tényezője. Így 1 HU változás 0.1 %-os eltérést jelent a víz együtthatójától, mivel a levegőé szinte 0. Ez a definíció azokra a CT szkennerekre használható, amiket vízzel kalibráltak.

Az általunk használt μ CT eszköz egy kúpnyalábú komputertomográf (CBCT) amit gyakran használnak gyakran fogászati vizsgálatokhoz is. Egy CBCT felvétel során a szkennerek a próbatest feje körül körbefordulva kb. 600 felvételt készítenek.

A μ CT nagyfelbontású képet készít, az általunk végzett vizsgálat során 60 kV gyorsítófeszültség mellett 6 μ m voxel méretet értünk el.

A felesleges torzítások elkerülése érdekében a mintadarabokat oszlop alakúra formáltuk, hogy a sugárnak a lehető legkevesebb üvegen kelljen áthaladnia. Feltételeztük, hogy a μ CT vel készített képek pontos reprezentációi a vizsgált tárgyaknak.

MICRO-CT

To measure the inhomogeneities I have used μ CT. Micro Computed Tomography (μ CT or μ CT) is basically a commonly used 3D medical imaging technique. It makes 2D X-ray images then with a special software it builds a 3D reconstruction of the specimen.

The images are made by one or more detectors. While the X-ray source is moved around the specimen the detector makes images in 5 degree steps. After the recording the Computed reconstructs the segments of the object, which can be used to build a 3D volume. After the analog-to-digital conversion in the memory the raw data becomes a digital matrix, where each element of the matrix represents the X-ray attenuation ability of a voxel [9]. A special measure, the Hounsfield Unit (HU) represents the X-ray absorption capability of a material, which is a standardised and accepted unit to measure a materials X-ray attenuation compared to the water and the air. The absorption coefficient is a material property, it depends on the atomic numbers of the components, the density, and the frequency of the X-ray. The attenuation value for the air is -1000 HU by definition, for water it is 0 HU. For a material X with linear attenuation coefficient μ_x , the corresponding HU value is therefore given by:

$$HU = \frac{\mu_x - \mu_{H_2O}}{\mu_{H_2O} - \mu_{air}} \times 1000,$$

where μ_{water} and μ_{air} are the linear attenuation coefficients of water and air, respectively. Thus, a change of one Hounsfield unit (HU) represents a change of 0.1% of the attenuation coefficient of water since the attenuation coefficient of air is nearly zero. It is the definition for CT scanners that are calibrated with reference to water.

The applied μ CT is a cone beam computed tomography (CBCT). CBCT is commonly used in dentistry. During a CBCT scan, the scanner rotates around the patient's head, obtaining up to nearly 600 distinct images. CBCT uses conical beam to make a series of 2D X-ray images.

The μ CT generates a very high resolution image. We used 60 kV accelerating energy, and reached 6 μ m size voxels.

In order to avoid unnecessary distortion, we prepared the specimen in a column shape, because this way the radiation has to pass the least amount of glass. We have assumed that the images made by μ CT are the exact representation of the specimens.

EREDMÉNYEK

A következőkben a mikroszkópos eredmények után a segítségükkel készített végeselemes modellek kerülnek bemutatásra.

A μ CT vizsgálatok arra utaltak, hogy az üvegben lévő zárványok alakját egy szferoiddal pontosan le tudjuk írni, így a zárványok vizsgálatára épített végeselemes geometria felépítése nem igényelt jelentős előkészületet, mivel azonban az AFM által gyűjtött magassági adatok egy mátrixban voltak eltárolva, a végeselemes geometria felépítéséhez saját, Visual Basic-ben készített szoftvert kellett használnunk.

Mindegyik modellnél előírt elmozdulásokkal definiáltunk a peremfeltételeket. Minden esetben készítettünk egy hibáktól mentes, tökéletes geometriájú modellt is. Ezek után a valóságos geometriával futtatott alakváltozás csúcspontokat hasonlítottuk össze a referencia-modell értékeivel, így kalkulálva az alakváltozás-növekmény értékét.

FELÜLETI KARCOK VIZSGÁLATA

A rögtön a gyártószalagról lekerülő próbatest (Guardian Magyarország Kft.) felülete pár apró nanométer mély egyenetlenségtől eltekintve szinte tökéletes volt. A második oszlopban lévő eredmények egy a feldolgozóüzemből (OROSHÁZA GLAS Kft.) származó próbadarabról származnak. Jól látható, hogy a karcok mélysége és mennyisége nő, azonban nem a karcok, hanem apró mélyedések okozzák a maximális alakváltozás-koncentrációkat. A harmadik oszlopban egy három éves, homlokzati falként használt üvegdarab eredményei láthatók. Szembetűnő, hogy a karcok mennyisége és hatása is csökken, ezzel párhuzamosan viszont apró mélyedések jelennek meg a numerikus szimuláció eredményein.

A legfiatalabb próbadarab felülete +7,8 % alakváltozás-koncentrációt okozott, azonban az idő és a használat során a felület egyre érdekesebb lesz, ezt mutatja a második oszlopban található +36,59 % és a +70,11% alakváltozás-koncentráció. (**2. táblázat**)

A próbadarabot és a szerkezettel kapcsolatos információt Dr. Horváth László egyetemi docens-től kaptam (BME Hidak és Szerkezetek Tanszék).

RESULTS

In this paragraph we will show the microscopic results, and some further preparation to make the microscope data into a finite element geometry.

The inclusions had a prolate spheroid shape and its position was parallel with the glass surface so we were able to construct the geometry in ANSYS 13.0 Workbench simply. With the AFM data we were not so lucky. The AFM data is a large matrix, each element contains the data of a specified points height. We wrote conversion software in Visual Basic to convert the AFM data to ANSYS geometry. During the numerical analysis we used prescribed displacements as boundary conditions.

In each case we built a reference model, which was perfect – it had no strain peak. After the numerical calculation we have compared the strain peaks between the perfect reference volume and the real model. Some results are presented below.

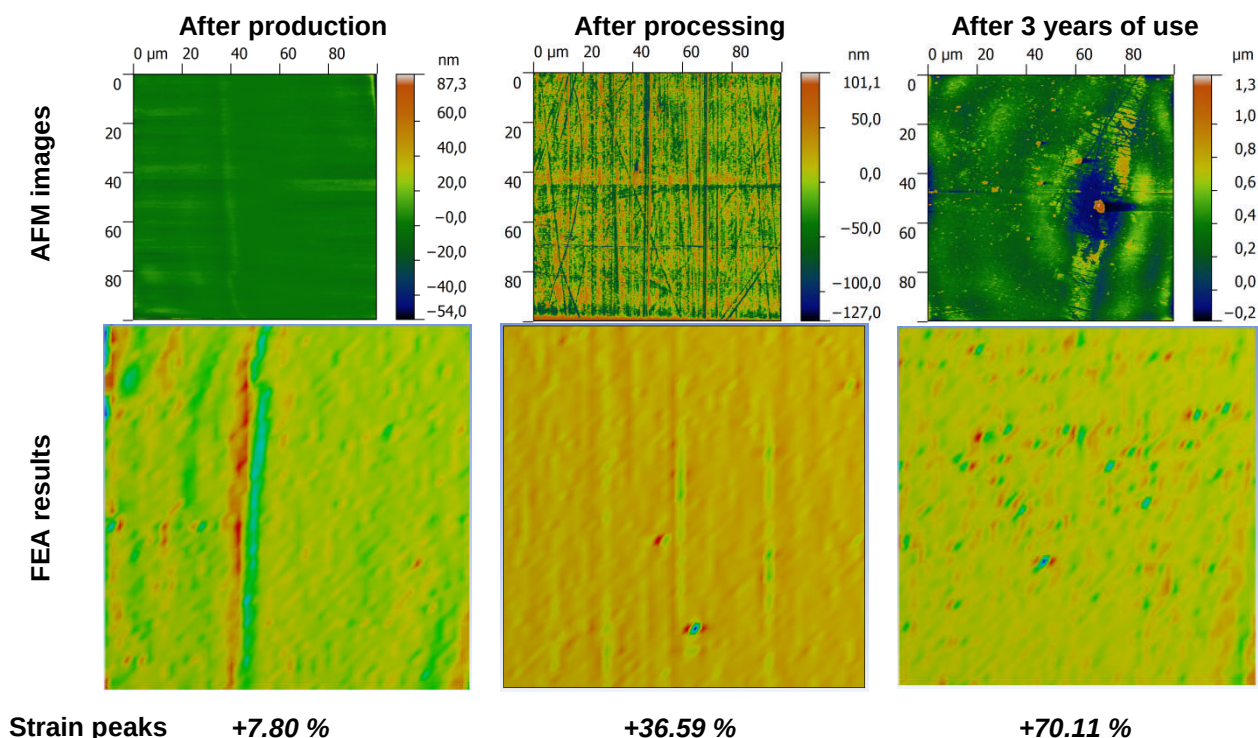
SURFACE FLAW ANALYSIS

On the glass specimen directly after the production (Guardian Hungary Co. Ltd.) only a few very shallow scratch could be recognised, but they are almost a few nanometres deep. In the second column the specimen was taken after the processing factory (OROSHÁZA GLAS Ltd.). The surface of the specimen is full with lots of nanoflaws. In the third column, a glass surface can be seen after using three years as a facade. The nanoscratches vanish, but small pits appear. On the images taken from the numerical calculations you can see these, small pits generates the major strain peaks.

On the youngest specimen, there is almost no strain rising (+7.8 %), but if we consider the second or the third the +36.59 % or the +70.11 % rising could be relevant. (**Table 2**).

We have received the specimen and the information about the specimen from Associate Professor László Horváth (Department of Structural Engineering, Budapest University of Technology and Economy)

2. táblázat Felületi eredmények
Table 2 Results on the surface



ÉLMEGMUNKÁLÁS

A számolt és polírozott él között szembetűnő a különbség már az elektronmikroszkópos képek alapján is (**3. táblázat**, első sora). A különbséget a szimuláció számszerűen is kimutatta. A tesztek alapján a referenciaelemhez képesti a számolt él okozta alakváltozás-növekmény +350 %, az eredmények relatív szórása majdnem minden esetben körülbelül 10 % volt, mely majdnem megegyezik a makroszkopikus kísérletben tapasztalt értékkel (**1. táblázat**).

A **3. táblázat** 3. és 4. sorában látható, hogy +50 % alakváltozás-növekmény tapasztalható a polírozott él eredeti és letört felülete között, ezen felül jól látható, hogy a számolt felület polírozásával gyakorlatilag duplájára növelhetjük az üveg effektív szilárdságát.

ZÁRVÁNYOK OKOZTA ALAKVÁLTOZÁS-NÖVEKMÉNYEK

Az üvegben lévő zárványok feltérképezésére Skyscan 1172 típusú μ CT-t használtunk. A vizsgálat során 6 különböző méretű és alakú légbuborékot és egy merev zárványt vizsgáltunk. A próbateteket az orosházi Guardian Magyarország Kft.-től kaptuk.

EDGE GRINDING

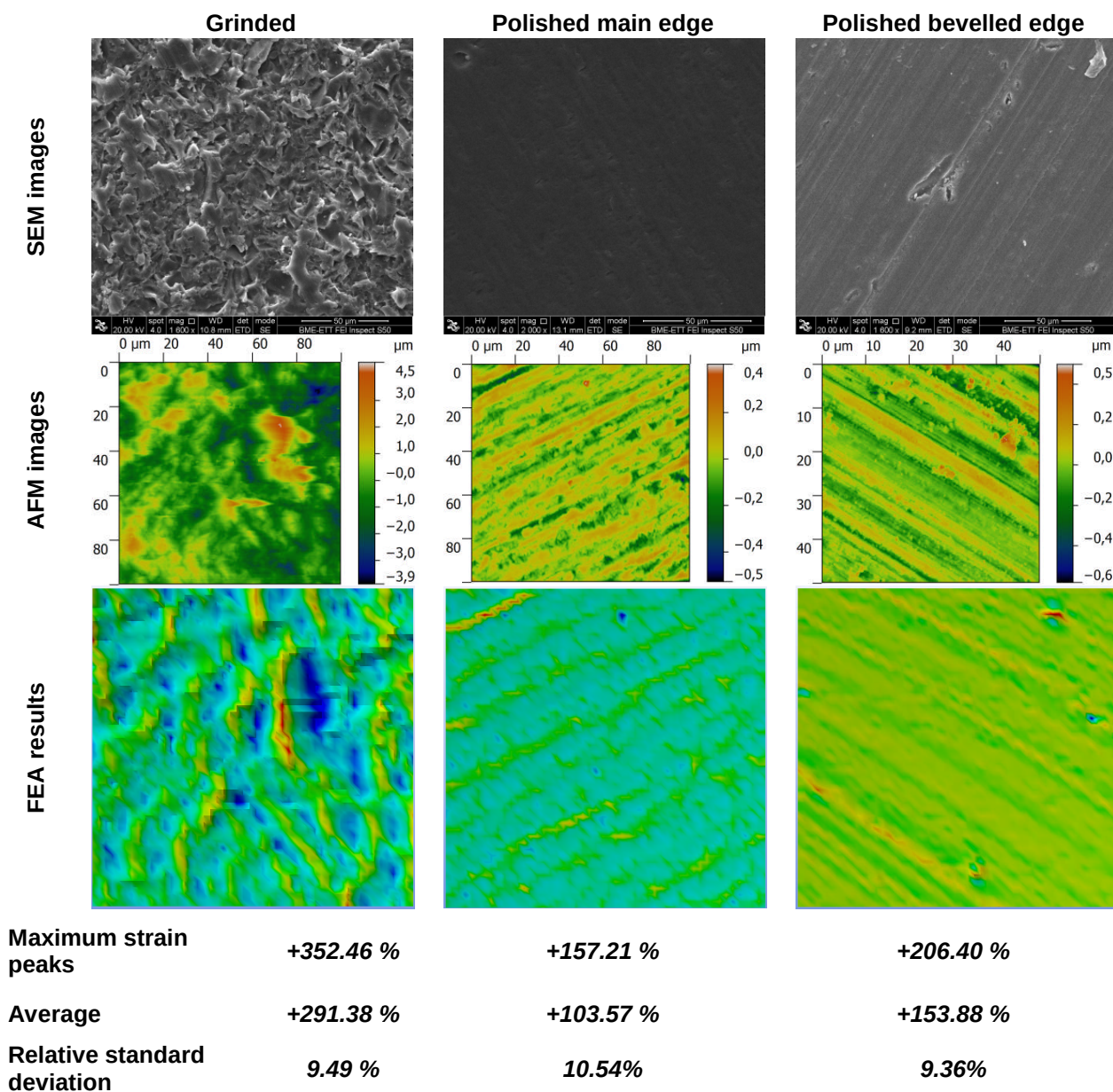
The grinded edge had a rougher texture than the polished one (SEM images in **Table 3**, row 1). The strain peaks on the edge is more conspicuous than on the surface. Numerical test showed that on the grinded edge the maximum strain peak was approximately +350 % larger compared to the reference volume. The relative standard deviation was approximately 10 % in all cases. At the main experiment we got almost the same value (**Table 1**).

We can see in **Table 3**, row 3 and 4 that polished edge had +50 % difference between the main and the bevelled edge. Also we can see that according to the numerical test, we can double the effective tensile strength by polishing the edges.

INCLUSION CAUSED STRAIN PEAKS

We used Skyscan 1172 μ CT to describe the geometry of the inhomogeneities in the glass. Mainly we made images from six bubbles and one stone – received from Guardian Hungary Co. Ltd.

3. táblázat Az élmegmunkálással kapcsolatos eredmények
Table 3 Results on the edge



A próbatestek oszlopszerű kialakításával elértük, hogy a röntgensugár a lehető legkevesebb üvegen hatoljon át, így a zárványok alakját jól meg tudtuk határozni.

A légzárványok alakjának meghatározása viszonylag könnyen ment (**6. ábra**), mivel az üveg anyagához képest a levegőnek a sugárgyengítési együtthatója nulla. Mivel a merev – meg nem olvadt alanyagból készült – zárványok sűrűsége közel azonos az üvegével, így a megjelenítéshez Mimics 14.1 (Materialise) szoftvert kellett használnunk, hogy el tudjuk különíteni a hasznos adatokat. (**7. ábra**)

The specimens were prepared efficiently for the test.

The bubbles were easy to recognise (**Figure 6**) because they had no attenuation value. However the stones are unmolten material compounds, so they had similar density as the glass. To visualise the CT images we used Mimics 14.1 (Materialise) (**Figure 7**).

A felületi vizsgálatokhoz hasonlóan a zárványok esetén is előírt elmozdulásokat alkalmaztunk. Megvizsgáltuk az RVE-t a zárványra merőleges – X irányú – és a zárvánnyal párhuzamos – Y irányú – húzásra, valamint kombinálva a kettőt, kétirányú húzó igénybevételre is. A **4. táblázatban** láthatók a numerikus vizsgálatok eredményei. Jól láthatók az értékeken, hogy egy fél milliméter nagyságú buborék jelentős alakváltozás-koncentráció helye egy lehetséges repedés kiindulópontja lehet.

Megjegyezzük, hogy az üvegtáblára gyakorolt makroszkopikus hatás megállapításához szükségünk van a zárványok statisztikai eloszlására, mint magassági, mint alaprajzi értelemben.

Homogenizációs eljárások segítségével meg tudunk állapítani egy effektív szilárdságot módosító tényezőt, mely figyelembe veszi az üvegtábla méretét és az igénybevételek keltette feszültségeloszlást.

A szerkezeti üveglemezek jelentős hányada hőedzésen esik át, így bonyolult feszültségmező keletkezik a tökéletesnek feltételezett belső térforogásban.

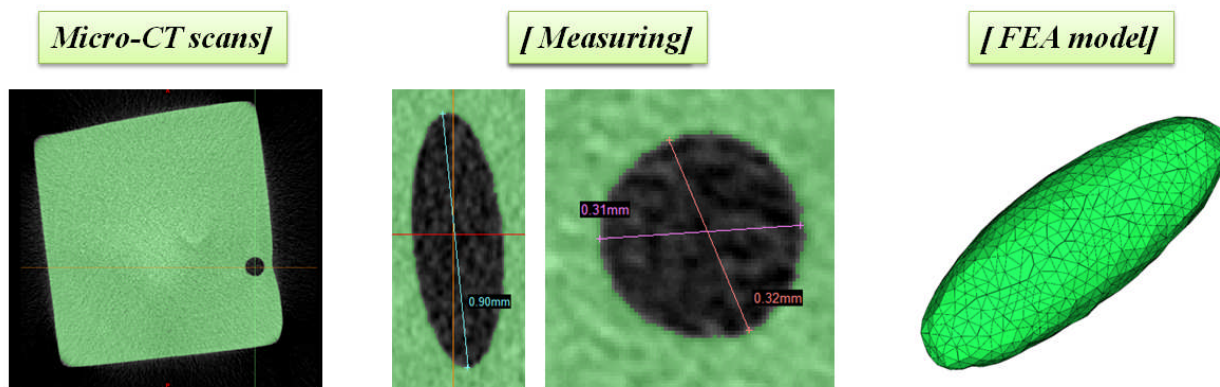
A vizsgálat rámutathat a feldolgozás során tönkrement üvegtáblák töréseinek okára, így fejlesztve az edzés paraméter beállítását.

I used the same prescribed displacements on the RVE with the inclusions – perpendicular tension (X direction) to bubble, parallel tension (Y direction) to the bubble and tension in both directions. **Table 4** shows the results of a void placed in the glass. On the figures in Table 4 you can see, that a few millimetre size bubble could generate a great strain peak in the glass, so more work is needed in this case.

Therefore we need the statistical distribution of the inhomogeneities. We need information about the position, and the quantity of the inclusions. With statistical information of the distribution and the geometry we could perform defect analysis using homogenisation schemes.

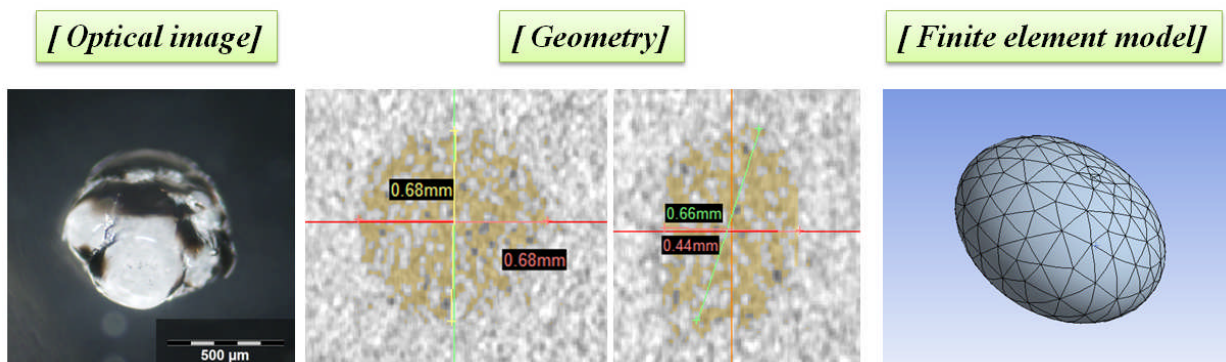
With the analysis we are able to determine the mechanical effect of the inclusions in structural glass. We will be able to describe a size effect coefficient which refers to the defects not on the surface but in the glass inner structure. It is relevant because structural glass is used in tempered form, so a special tension stress distribution appears inside the glasses volume.

With the calculated data we can prevent premature failure and the production process could be improved.



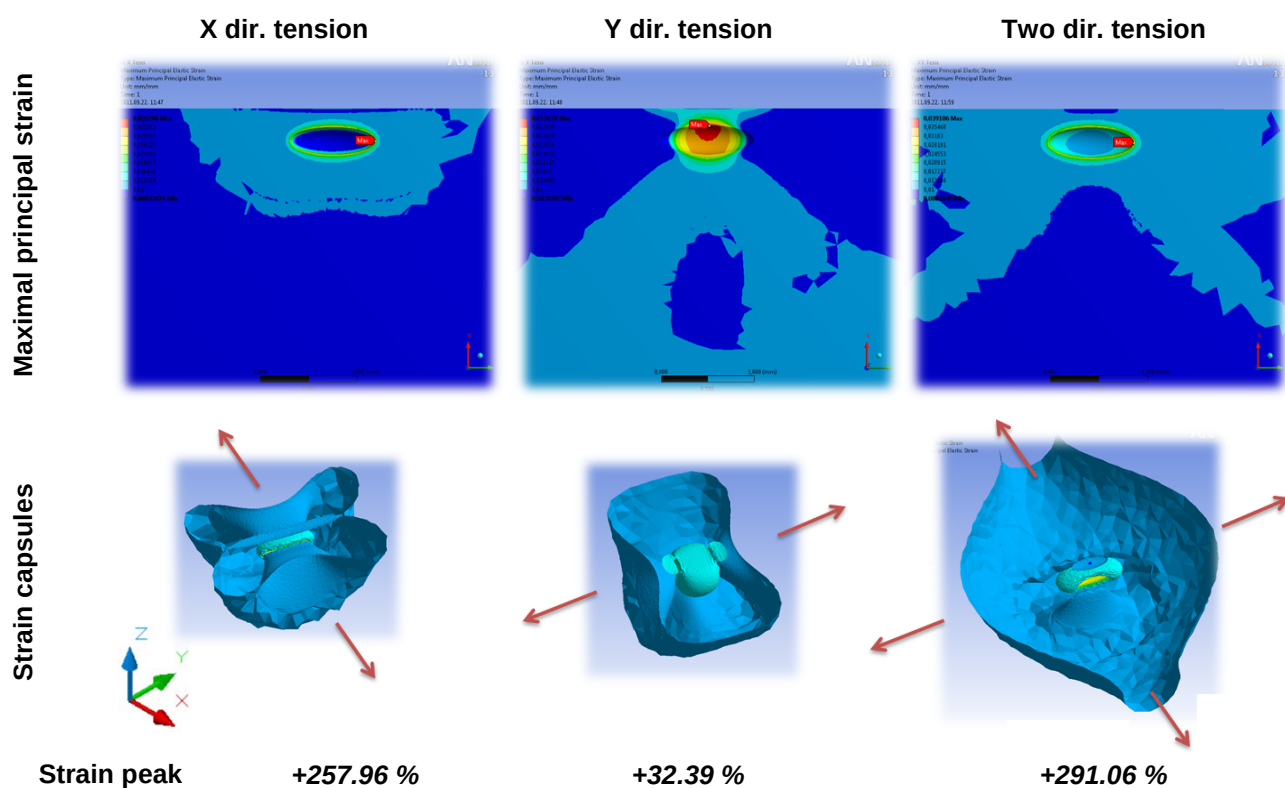
6. ábra A légzárványok végelelemes geometriájának építése μ CT segítségével

Figure 6 Building FEM geometry of a bubble using μ CT



7. ábra A merev zárványok végeselemes geometriájának építése μ CT segítségével
Figure 7 FEM geometry of a batch using μ CT

4. táblázat Zárványokkal kapcsolatos eredmények
Table 4 Results on the inclusions



ÖSSZEFOGLALÁS

A szerkezeti üvegek mezoszerkezetén végzett mikroszkopikus vizsgálatok megfelelő módon előkészítettek egy átfogó mechanikai elemzést, melynek célja lehet egy esetleges szabványmódosítás is.

A vizsgálatok során arra az eredményre jutunk, hogy a gyártás során az üvegtáblába kerülő légzárványoknak különböző méretű és arányú orsószféroid alakjuk van. A μ CT vizsgálatok alapján a táblában található fel nem olvadt alapanyag-szemcséket szintén forgási ellipszoid alakú lencseszféroiddal közelíthetjük. Az ellipszoid geo-

SUMMARY

The microscopic investigation on the mesostructure of structural glass prepared a mechanical examination, which could lead to standard modification.

During the examination we found that the bubble inhomogeneities have a prolate spheroid shape, with different size, and ratio. The batch had an oblate spheroid form. With the geometrical information we could find analytical solutions on ellipsoidal shape inclusions. With the help of the solutions we can make homogenisation techniques to determine the effect of the inclusions in glass.

metriai méreteinek birtokában, mint numerikus, mint analitikus módszerek segítségével meg tudjuk határozni a pontos feszültségmezőt, a zárvány feszültségkoncentrációját. Ezzel a módszerrel ki tudjuk számolni a zárványok hatását az üvegtábla effektív szilárdságára.

Fontos eredmény, hogy az élmegmunkálás van még mindig a legjelentősebb hatással a táblák effektív szilárdságára. Az építőiparban használt számolt és feszültségkoncentrációit további megmunkálással (polírozással) csökkenteni tudjuk.

A numerikus vizsgálatok alapján arra tudunk következtetni, hogy az üveg felületének érdessége, így a feszültségcsúcsok nagysága is növekszik a használat során.

További feladataink közé tartozik, hogy folytassuk a zárványok mechanikai hatásának kiszámítását, és egy a méretre jellemző tényezővel módosítsuk az üvegtábla effektív szilárdságát, ajánlasként a szabvány módosítására.

Végeredményképpen kijelenthetjük, hogy az üveg mezostruktúrája jelentős hatással van a szerkezetek effektív, makroszkopikus szilárdságára, így a több szintű méretezési elvek figyelembevételével optimálissá tehető a mindennapi tervezés.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Guardian Magyarország Kft.-nek, a táblák szélből vett mintákat az OROSházaGLAS Kft.-nek köszönhetjük, melyekért nagyon hálásak vagyunk.

A munka szakmai tartalma kapcsolódik a "Minőségorientált, összehangolt oktatási és K+F+I stratégia, valamint működési modell kidolgozása a Műgyetemen" c. projekt szakmai célkitűzéseinek megvalósításához. A projekt megvalósítását az Új Széchenyi Terv TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002 programja támogatja

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Molnár, G., The Mechanical Behaviour of Laterally Loaded Laminated Structural Glass, 11th Hungarian Conference on Theoretical and Applied Mechanics. Miskolc, Hungary, 29/08/2011-31/08/2011.
- [2] M. Haldimann, A. Luible, M. Overend, Structural Use of Glass, Structural Engineering Document 10 IABSE, AIPC, IVBH pp. 85-106. 2008.
- [3] Wörner, J.-D., Schneider, J., Fink, A.: Glasbau. Grundlagen, Berechnungen, Konstruktion. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 66. (2001).
- [4] EN 1288-3:2000: "Glass in Building – Determination of the bending strength of glass – Part 3: Test with specimen supported at two points (four-point bending)", CEN, Brussels; pp. 8-11, (2000).
- [5] Rountree C.L., Prades, S., Bonamya, D., Bouchaud, E., Kalia, R., Guillot, C., A unified study of crack propagation in amorphous silica: Using experiments and simulations, Journal of Alloys and Compounds 434–435 (2007).
- [6] Kern, W., Puotinen, D.A. Cleaning solutions based on hydrogen peroxide for use in silicon semiconductor technology. RCA Review, June, pp. 187-206, (1970).

Actually the edge finishing has the major effect on the effective strength of the glass, but further procedures (polishing) could repair the imperfections of the surface.

According to the experimental and numerical simulations we can assume that the surface roughness rises during usage.

The next step is to continue the numerical simulations of inhomogeneities, and try to calculate a size effect coefficient.

As a conclusion we could say that the mesostructure of the glass has a significant effect on the effective strength of the material, so it should be taken into account in order to optimize the daily design practice.

ACKNOWLEDGEMENT

The inclusions were provided by the Guardian Hungary Co. Ltd., the edge pieces were provided by OROSházaGLAS Ltd. I am very grateful for the help

This work is connected to the scientific program of the "Development of quality-oriented and harmonized R+D+I strategy and functional model at BME" project. This project is supported by the New Hungary Development Plan (Project ID: TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002).

- [7] Henke, L., Nagy, N., Krull, U.J., An AFM determination of the effects on surface roughness caused by cleaning of fused silica and glass substrates in the process of optical biosensor preparation, Biosensors and Bioelectronics 17, pp. 547-555, (2002). (doi:10.1016/S0956-5663(02)00012-X)
- [8] Molnár, L.M.; Mojzes, I.; Nanotechnológia (in Hungarian), Műegyetem Kiadó, 2007. Chapter 5, p. 75.
- [9] Hounsfield G. N.: Computerized transverse axial scanning (tomography): Part 1. Description of system, British Journal of Radiology, 46, pp. 1016-1022 (1973). (doi: 10.1259/0007-1285-46-552-1016)

RONCSOLÁSMENTES VIZSGÁLATTECHNIKA

NDT TECHNICS

FÉMLEMEZEK VASTAGSÁGÁNAK MÉRÉSE RÖNTGENSUGÁRZÁS SEGÍTSÉGÉVEL THICKNESS MEASURING OF METAL SHEETS WITH X-RAY METHODDS

BOROMISZA LÁSZLÓ

Kulcsszavak: vastagság mérés, röntgen, abszorpció,
Keywords: thickness measurement, x-ray, absorption

ÖSSZEFOGLALÁS

Az acéliparban a késztermék előállításához sokféle fizikai jellemző pontos mérése szükséges. Az előállított termék, az acéllemez egyik fontos paramétere a vastagsága. A gyártási folyamatok nem teszik lehetővé a fizikai érintésen, vagy optikai elven alapuló mérőberendezések használatát, ezért elterjedten alkalmaznak radioaktív sugárzással működő vastagságmérő berendezéseket. Ezek az eszközök gyakran a gyártósor szabályozási rendszerének érzékelő elemei, így pontosságuk alapvetően befolyásolja a késztermék minőségi paramétereit.

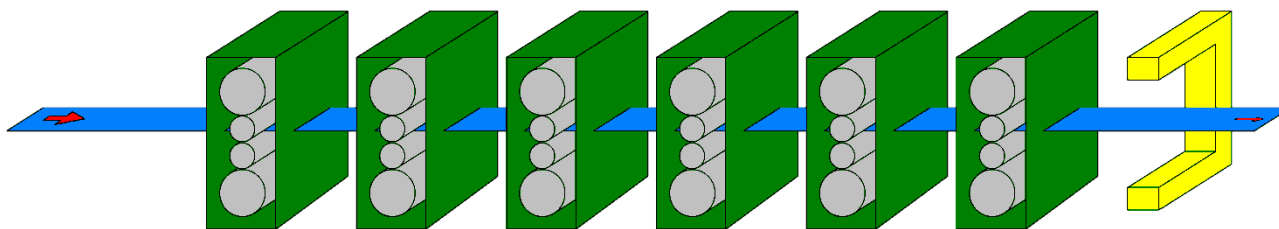
SUMMARY

There are many types of physical properties in the steel industry which need to be measured accurately. One of the finished product's important parameters is its thickness. Because using gauges whose operating principle is based on physical touch or optics is not allowed in the production process, the usage of measuring devices based on the x-ray absorption is usual. These thickness gauges are often the sensors of the production line's closed loop controlling system, so their accuracy is essentially determines the quality properties of the finished product.

BEVEZETÉS

A mérés technika területén rengeteg különféle technika, mérési módszer fordul elő. Különböző megoldások, megvalósítások jellemzik az egyes fizikai jellemzők mérésére szolgáló berendezéseket. Általános alapelv, hogy az adott fizikai jellemző mérését mindig a legegyszerűbb és a kívánalmaknak megfelelően a legpontosabb módon végezzük. Vannak azonban esetek, amikor a körülmények nem engedik meg akármilyen mérési elv alkalmazását, például ha a technológiai környezet túl agresszív (erősen korrozív), ha túl magas hőmérsékletű, ha a technológiai anyagáramlás sebessége túl nagy, vagy ha nem megengedett a fizikai érintkezés. Ezekben az esetekben célszerű az úgynevezett érintésmentes mérési elveket alkalmazni. Ilyenek többek között az optikai elvű mérések, és az ionizáló sugárzáson alapuló mérések.

Jelen írásban az ionizáló sugárzás felhasználásán alapuló mérések egy szegmensével foglalkozok, az ún. transzmissziós elvű anyagvastagság-méréssel. Ilyen típusú mérések főképp a fémiparban használatosak hosszú fémszalagok, fémlemezek vastagságának mérésére, ugyanis fémlemezek (acél, alumínium...) előállítása során az egyik elsődleges kimeneti paraméter azok vastagsága. Egy jellemző példa az acéllemezeket előállító hengersor. Az 1. ábra egy 6 hengerállványból álló hengersort mutat.



1. ábra. Hengersor vázlat

A hengersor bemenetére egy kb. 100 mm vastag acélbuga kerül, amit a 6 hengerállvány fokozatosan nyom össze úgy, hogy a 6. állvány után

kilépő lemez a kívánt vastagságú legyen. A kilépő lemez vastagságát egy, az ábrán sárga színnel jelölt berendezés méri meg.

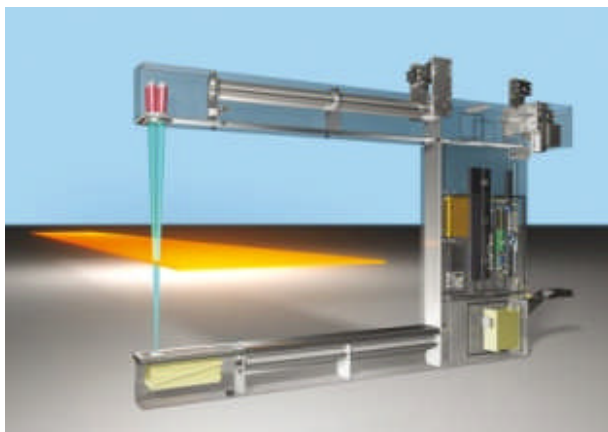
ISD Dunafer Zrt.

TRANSZMISSZIÓS MÉRÉSI ELV

Transzmissziós mérés alapelve, hogy adott sugárzást bocsátunk keresztül a mérendő anyagon, majd megmérjük az áthaladt (a csökkentett) sugárzás intenzitását.

Az ionizáló sugárzással működő anyagvastagság mérésnek esetén nagyenergiájú elektromágneses sugárzás halad keresztül a mérendő anyagon. Az ionizáló sugárzás lehet gamma-sugárzás vagy röntgen sugárzás.

A mérési elrendezés: egy C (esetleg O) formájú mérőkeret, aminek két ellentétes végén helyezkedik el a sugárforrás és a detektor.



2. ábra. Mérés C-kerettel [1]

A 2. ábrán a C-keret alján található a sugárforrás, ami egy keskeny sugárnyalábot bocsát ki magából, egyenesen a C-keret felső részén lévő detektor felé. A sugárforrás és a detektor között található a mérőres. A mérendő anyag áthalad a mérőresen, és közben elnyeli a forrás által kibocsátott sugárzásintenzitás egy részét. Minél vastagabb a mérendő anyag annál nagyobb hányadát nyeli el a sugárnyalábnak, tehát annál kisebb a detektor által mért sugárzás szintje. A sugárzás-mérő detektor kimenetén megjelenő jel (általában feszültségjel) egyenes arányban áll a detektort ért sugárzás intenzitásával. Általános irányelvként és sugárvédelmi szempontból is a mérőresnek a lehető legkisebbnek kell lennie. Ezzel ellentétesen technológiai szempontból azonban a mérőrest a lehető legnagyobbra kell választani, hogy a mérőberendezés könnyen, rugalmasan legyen illeszthető a folyamatba, és elegendő teret adjon a mérendő anyag esetleges rezgéseinek, elhajlásainak anélkül, hogy ez a mérőberendezést veszélyeztetné.

IPARBAN MŰKÖDŐ IONIZÁLÓ SUGÁRZÁST KIBOCSÁTÓ FORRÁSOK

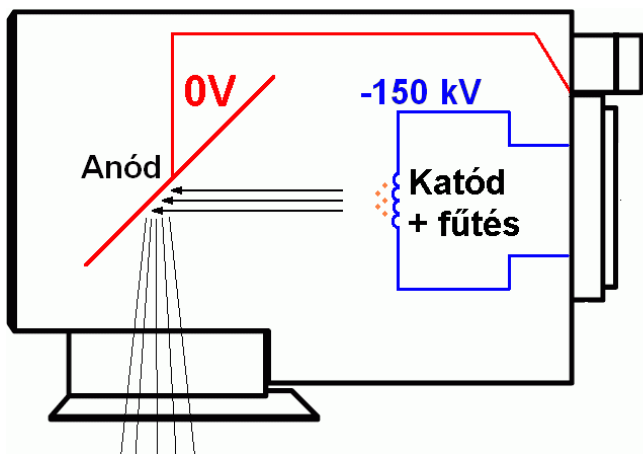
Az ipari gyakorlatban, fémek vastagságmérésére kétféle sugárforrás használatos. Radioaktív

izotópot tartalmazó zárt acélkapszula vagy röntgen berendezés. Radioaktív izotóp esetén kizárólag zárt sugárforrás használatos, így sugárszennyezés, kontamináció nem lehetséges. A zárt kapszulából kizárólag a méréstechnikai szempontból hasznos γ -sugárzás léphet ki. Acél lemezek vastagságának méréséhez ^{241}Am vagy ^{137}Cs izotóp források alkalmasak. Mindkettő jól meghatározott gamma energián sugároz, az amerícium 59,5 keV, a cézium 662 keV energián. Amerícium források könnyebben és olcsóbban előállíthatóak, ráadásul a cézium elég reaktív elem, kezelése nehézkes. Gyakorlati szempontból lényeges különbség van a két sugárforrás használhatósága között. Mivel a cézium forrás által kibocsátott gamma sugárzás energiája egy nagyságrenddel nagyobb, mint az ameríciumé, ezért annak nagyobb az áthatoló képessége. Méréstechnikai szempontból a maximálisan mérhető lemez vastagságot az határozza meg, hogy a mérendő lemez milyen mértékben csökkenti a rajta áthatoló sugárzás intenzitását. Értelemszerűen a sugárzásmérő detektor által mért legnagyobb jelszint lemez nélküli mérésakor keletkezik, a legkisebb pedig a legvastagabb lemez mérésekor. Régebben a kettő közötti legnagyobb arány 1:40-1:50 arányban volt maximálva, így amerícium forrással 0-4 mm tartományban lehetett az acél lemezek vastagságát mérni, ennél vastagabb lemezeknél cézium sugárforrás használata volt szükséges. A technológia fejlődésével az előbb említett arány 1:200-ra módosult, így amerícium esetén akár 6 mm-es lemezek vastagsága is mérhetővé vált.

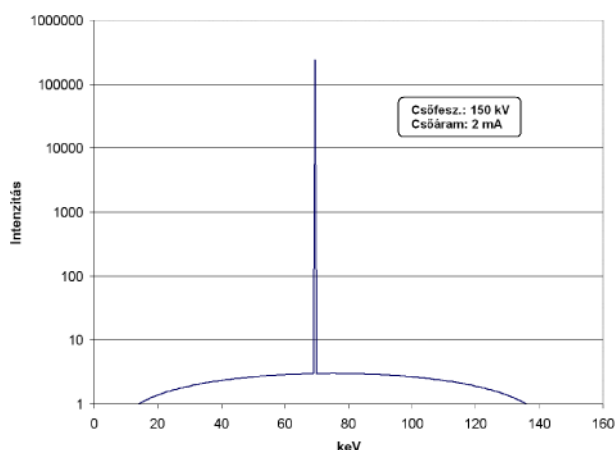
Röntgen mérőberendezés esetén az ionizáló sugárzást röntgencső állítja elő nagyfeszültségű tápellátás segítségével. A röntgencső katódja az előállított nagyfeszültség negatív pólusára kapcsolódik, ugyanakkor a katódot egy másik elektronikus egység fűti. A fűtés hatására a katód anyagát alkotó atomok elektronjai gerjesztett állapotba kerülnek, ezek az elektronok a nagyfeszültségű előfeszítés hatására elszakadnak az atomjuktól és az anód target-be csapódnak. A becsapódás során gerjesztődik a fékezési illetve a karakterisztikus röntgensugárzás.

A katódra kapcsolt nagyfeszültség értéke a csőfeszültség, az anód és a katód között folyó áram pedig a csőáram. A csőfeszültség és a csőáram változtatásával szabályozható a kibocsátott röntgen sugárzás intenzitása, az anód anyaga pedig a kibocsátott sugárzás energiáját határozza meg. Az ipari méréstechnikai alkalmazásoknál általában wolfram targetet alkalmaznak. A röntgencső által kibocsátott sugárzás két összetevőből áll: fékezési sugárzásból (ennek energiaspektruma folytonos) és karakterisztikus röntgen-sugárzásból (vonalas spektrum). A kettő aránya függ az alkalmazott

csőfeszültségtől, az anód anyagától és a csőáramtól [2]. Egy wolfram anódos röntgensövet, 150 kV-os csőfeszültséggel és 2 mA-es csőárammal működtetve az a 4. ábra szerinti energiaspektrumú sugárzást bocsát ki. Látható, hogy lényegében a kibocsátott röntgen-sugárzás energiája megfelel a karakterisztikus röntgensugárzás energiájának, ami wolfram esetén 69,5 keV.



3. ábra. Röntgenső vázlatos működése



4. ábra. Röntgenső által kibocsátott sugárzás energiaspektruma ([2] 1.27 és 1.32 képletének felhasználásával)

Vastagságmérő berendezést röntgenes sugárforrással működtetve a méréstartomány akár 20 mm is lehet gyengén ötvözött acéllemezek esetén.

RADIOAKTÍV IZOTÓPPAL ÉS RÖNTGENNEL MŰKÖDŐ SUGÁRFORRÁSOK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Annak eldöntéséhez, hogy egy mérő berendezés esetén melyik típusú sugárforrás használata a célszerűbb, mérlegelni kell mindkét megoldás előnyeit és hátrányait. Zárt radioaktív izotópos sugárforrás alkalmazásának előnye, hogy nem igényel semmiféle külső energiaforrást a működéséhez, rendkívül masszív kialakítású tokozatban helyezkedik el, így erős külső behatás (mechanikai

sérülés, tüzeset) sem károsítja. Hátránya, hogy kezeléséhez (előállítás, tárolás, szállítás, zártágvizsgálat, eltemetés, környezetvédelem) különleges eljárások és képesítések szükségesek. Az izotóp lecsengéséből fakadóan idővel csökken a kibocsátott sugárzás intenzitása (ezzel együtt a sugárzásmérő detektor kimeneti jele), amit a mérőrendszernek külön kompenzálnia kell, ráadásul a csökkenő jelszinttel együtt növekszik a mérési bizonytalanság.

Röntgenes berendezés óriási előnye, hogy csak akkor bocsát ki ionizáló sugárzást, ha villamos tápellátást kap (ez munkavédelmi, sugárvédelmi és környezetvédelmi szempontból is hasznos). A kibocsátott sugárzás intenzitása a csőfeszültségtől és a csőáramtól függ, így ezek nagyfokú stabilitásának biztosításával a kibocsátott sugárzás intenzitásának ingadozása is alacsony értéken tartható. Hátrányként említhető, hogy a nagyfeszültség előállítása bonyolult és drága áramköröket igényel, és bár a katód fűtése a működéshez szükséges, de a keletkezett hőmennyiség káros, így vízhűtéssel kell ellátni a röntgensövet. A röntgensugárzás előállításának hatásfoka elég alacsony (~1% körüli), így a kellő sugárzás intenzitás eléréséhez jelentős villamos energiát kell befektetni. Mechanikai behatásoktól óvni kell a röntgensövet és rendszeres időközönként cserére is szorulnak előregedés miatt.

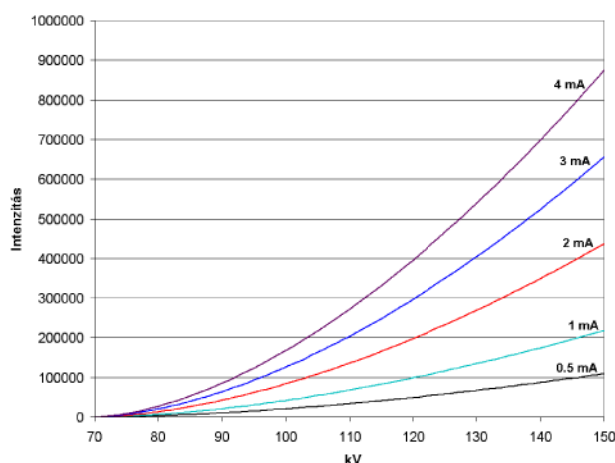
Méréstechnikai szempontból van még egy igen lényeges különbség a radioaktív izotópos és a röntgenes vastagságmérés között: a mérés bizonytalansága. Egy adott aktivitású radioaktív izotóp a tér minden irányába sugároz. Nem lehet megmondani, hogy melyik atom mikor fog elbomlani és azt sem, hogy a bomlás során kibocsátott gamma-foton milyen irányba fog terjedni. A sugárforrást ezért (is) ólom burkolattal látják el, ami csak egy irányba engedi ki a keletkező sugárzást. A keletkező sugárzás nagy része így elnyelődik a burkolatban és csak csekély hányada jut el a sugárzásmérő detektorba. Ahhoz, hogy minél nagyobb intenzitású sugárzás érje a detektort (minél kisebb legyen a mért sugárzás bizonytalansága) nagy aktivitású izotópot kellene alkalmazni, ehhez azonban nagyméretű ólom burkolat szükséges. Egy ponton túl már nem gazdaságos és nem is indokolt a méretek növelése. Az ipari gyakorlatban 37 GBq aktivitású ^{241}Am izotóppal 50-60 ms mérési idő alatt lehet 1% alatti mérési pontosságot elérni.

Röntgenes berendezés esetén a kibocsátott sugárzás intenzitása a röntgenső paramétereinek változtatásával jól kézben tartható, ráadásul a sugárnyaláb is irányított. Ezen okokból kifolyólag a sugárzásmérő detektort sokkal nagyobb intenzitá-

sú sugárzás érheti, amivel csökken a mérési bizonytalanság, illetve csökken a mérési idő. Röntgenes vastagságmérő berendezéssel ms-os mérési idővel lehet elérni az 1 % alatti pontosságot.

RÖNTGEN FORRÁSSAL MŰKÖDŐ IPARI VASTAGSÁGMÉRŐ BERENDEZÉSEK ELŐNYEI

Mivel a röntgenső feszültsége és csőárama elektronikusan szabályozható így könnyen meghatározható olyan sugárzás intenzitás, ami a technológia igényeit (mérési sebesség, mérési pontosság...) kielégíti. Az 5. ábrán a röntgenső által kibocsátott sugárzás intenzitása látható különböző csőfeszültségek és csőáramok esetén.



5. ábra. Röntgenső által kibocsátott sugárzás intenzitása a csőfeszültség és a csőáram függvényében ([2] 1.32 képletének felhasználásával)

Pontosan szabályozott feszültség és áram értékek esetén olyan stabil és nagy intenzitású sugárzás állítható elő, amelyet radioaktív izotóppal nem lehetne elérni.

Külön kiemelandó, hogy a kibocsátott sugárzás energiája (69,5 keV) éppen „ideális” gyengén ötvözött acélok vastagságának méréséhez. A nem túl magas foton-energia miatt jól mérhetők a „vékonyabb” lemezek (6-8 mm-es tartományig), ugyanakkor a nagy intenzitás lehetővé teszi a „vastagabb” (~16 mm) tartományban történő méréseket is.

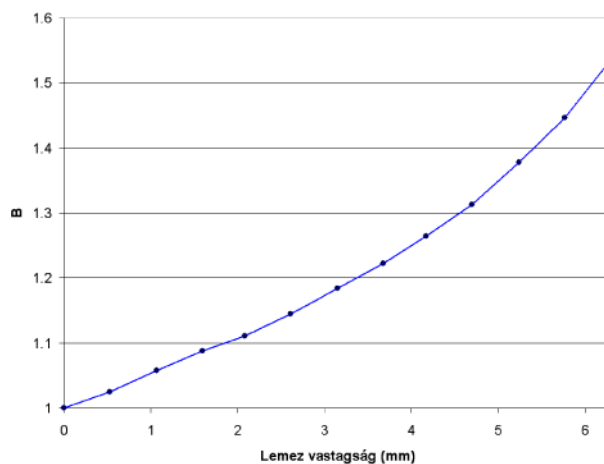
ANYAGVASTAGSÁG MÉRÉS ELVI BEMUTATÁSA

A mért vastagság meghatározásának képlete: $I = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot x}$, ahol I a lemezen áthaladt (gyengített) sugárnyaláb intenzitása, I_0 a lemez nélkül mérhető sugárzás intenzitása, μ az elnyelési állandó, x pedig az anyagvastagság. A gyakorlati életben a fenti abszorpciós képlet kis módosításra szorul. A

kis módosítás, az ún. Build-up faktor használatát jelenti, amivel korrigálhatók a mérési elrendezésből és szóródásokból adódó pontatlanságok [3]. A képlet így $I = B \cdot I_0 \cdot e^{-\mu \cdot x}$ -re módosul.

A vastagságmérő berendezés úgy lett kialakítva, hogy a sugázmérő detektor kimenetén nem a sugárzás intenzitása jelenik meg, hanem egy azzal arányos feszültség. A Build-up faktoral kiegészített elméleti képletben az intenzitás értékek helyére a detektor által mért feszültségek helyettesítendőek. A lemezen áthaladt (gyengített) sugárzás intenzitása (I) két összetevőből áll: a mindig jelenlévő háttér sugárzás hatására létrejövő detektor kimeneti feszültség (U_0) és U_m a mért lemezen áthaladt sugárzás hatására a detektor kimenetén létrejövő feszültségérték különbsége ($I = U_m - U_0$). Ugyanígy $I_0 = U_f - U_0$, ahol U_f a teljes sugárzáshoz (lemez nélküli esethez) tartozó detektor kimeneti feszültség. Az abszorpciós képlet így $U_m - U_0 = B \cdot (U_f - U_0) \cdot e^{-\mu \cdot x}$ alakú lesz.

Konkrét mérőberendezés esetén a Build-up faktor értéke a mért lemez vastagságával együtt változik, nem lineáris módon. A pontos méréshez több ponton kell B értékét meghatározni (több pontos kalibrálás). A pontosítás ismert vastagságú és anyagminőségű „etalon” lemezek használatával történik. Mindegyik etalon lemezre meg lehet határozni a megfelelő B értéket (az 6. ábra pontjai). Bármely B érték kiszámítható lineáris interpoláció segítségével, a pontosításkor felvett Build-up faktorok felhasználásával.



6. ábra. Build-up faktor a vastagság függvényében

ANYAGTÍPUSOK SZERINTI KORREKCIÓ SZÜKSÉGESSÉGE

A röntgen-sugárzással történő pontos anyagvastagság méréshez ismerni kell a mérendő anyag kémiai összetételét. Ennek oka: ha két egyforma vastagságú lemez közül az egyik tiszta vas, a másik pedig tiszta króm, akkor króm lemez mérése esetén (annak kisebb elnyelési állandója miatt)

kisebb lesz a mért vastagság. A berendezés pontosításakor (a Build-up faktorok felvételekor) ismert a használt etalon lemezek vastagsága és kémiai összetétele. A gyártásban lévő lemezek kémiai összetétele azonban eltér az etalon lemezekétől, így szükséges egy korrekció alkalmazása. Előfordulhat, hogy a gyártott lemez vastagsága megegyezik az egyik etalon lemez vastagságával, azonban az eltérő kémiai összetétel miatt mégsem a jó vastagság érték lesz megjelenítve. Minden anyagra és adott foton-energiára meghatározható az elnyelési állandó értéke [4]. Ha egy lemez több kémiai összetevőt tartalmaz, akkor az eredő az elnyelési állandó az egyedi összetevők elnyelési állandója és azok összetételi arányának szorzat-összegeként áll elő [5], tehát

$$\mu_{\text{eredő}} = \frac{C\% \cdot \mu_C(69,5\text{keV}) + \text{Si}\% \cdot \mu_{\text{Si}}(69,5\text{keV}) + \dots}{100}$$

ahol C% a lemez széntartalma százalékban kifejezve, $\mu_C(69,5\text{keV})$ a szén elnyelési állandója 69,5 keV fotonenergián, $\mu_{\text{eredő}}$ pedig a lemez eredő elnyelési állandója. Az etalon lemezek kémiai összetétele alapján ki lehet számolni μ_{etalon} értékét (az etalon lemezek elnyelési állandóját 69,5 keV energiára), és hasonló módon a gyártott lemez kémiai összetétele alapján $\mu_{\text{gyártási}}$ értékét is. A pontos méréshez szükséges korrekciós faktor (K) az etalon lemez elnyelési állandójának és a gyártott lemez elnyelési állandójának hányadosaként áll elő

$$\left(K = \frac{\mu_{\text{etalon}}}{\mu_{\text{gyártási}}} \right).$$

A gyártott lemezek mérésekor a vastagság kiszámításának képlete így

$$x = \frac{-\ln\left(\frac{U_m - U_0}{B \cdot (U_f - U_0)}\right)}{\mu \cdot K}$$

alakú lesz.

Az acéliparban a gyártott lemezek általában szabvány szerinti anyagminőségűek. A szabvány előírja, hogy adott típusú acél összetételében egy adott kémiai elem milyen arányban lehet jelen (pl.: széntartalom 0,2 – 0,4 %, szilíciumtartalom 0,1 – 0,35 % közötti...). Egy adott anyagtípushoz, annak átlagos kémiai összetétele alapján meg lehet határozni a hozzá tartozó korrekciós faktort. Bár az egyes kémiai elemek aránya változó lehet ugyanazon anyagtípusnál, az átlagos összetételtől való eltérés nem jelent túl nagy hibát.

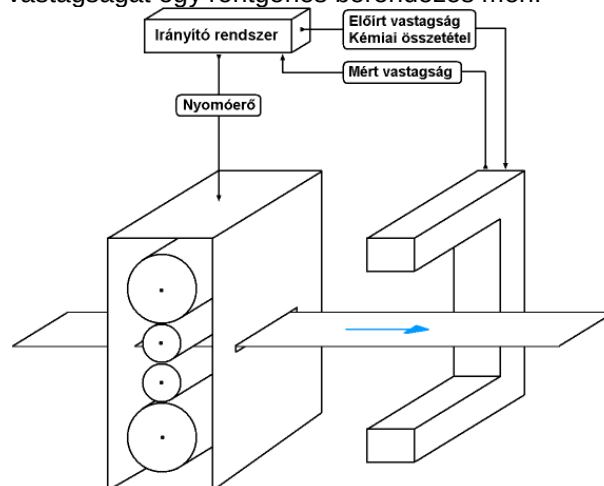
A gyakorlati életben a különböző acélminőségek miatt keletkező mérési pontatlanság korrigálá-

sát a vastagságmérő berendezés automatikusan kezeli. A vastagságmérő berendezés mindig egy úgynevezett fölérendelt rendszerhez kapcsolódik, az aktuálisan mért lemez minőségkódját onnan kapja. Adott acélminőséghez adott korrekciós faktor tartozik (ezeket a vastagságmérő berendezés egy táblázatban tárolja, az anyagminőség – korrekciós faktor táblázatban). Ez a rendszer kétségtelenül működőképes, azonban vannak hátrányai. A korrekciós faktorokat a vastagságmérő berendezés gyártója határozza meg. „Új” anyagminőségek esetén (amiket az anyagminőség – korrekciós faktor táblázat nem tartalmaz) a berendezés a korrekciós faktort 1-nek veszi, ami bizonyos esetekben nagy eltérést is jelenthet a valós, kívánt korrekciós faktorhoz képest.

További nehézséget jelent, hogy vannak olyan esetek, amikor az acél szabvány szerinti kémiai összetétele a hengerlési célvastagság függvényében változik. Például egy S355MC minőségkódú acélnál 4 vastagságtartományban gyártható a lemez: 1,8 – 3 mm, 3 – 8 mm, 8 – 12 mm, 12 – 18 mm. Minden vastagságtartományban más és más a kémiai összetétel, így egy adott lemez pontos méréséhez nem elegendő annak minőségkódja.

Minden hengerlésre kerülő acél buga kémiai összetétele és minden egyéb fontos paramétere ismert, így kiszámítható a hozzá tartozó pontos korrekciós faktor értéke is on-line módon, ezáltal anyagminőségtől és anyagvastagságtól függetlenül a lehető legpontosabb mért érték állhat elő.

A 7. ábrán egy vázlatosan ábrázolt gyártósor részlete látható. A hengerállványból kilépő acéllemez vastagságát a hengerek összenyomásával lehet változtatni. A hengerállványt elhagyó lemez vastagságát egy röntgenes berendezés méri.



7. ábra. Hengerállvány vastagságmérővel

A hengerállvány irányító rendszere (a fölérendelt rendszer) a vastagságmérő által mért értékek alapján úgy állítja be a hengerállvány paramétereit,

hogy a kilépő lemez vastagsága kívánt értékű legyen, tehát a röntgenes berendezés egy zárthurkú szabályzási rendszer érzékelő eleme. Ha a vastagságmérő csak az anyagminőség alapján határozza meg az adott lemezhez szükséges korrekciós faktort, akkor a fentebb említett pontatlanságok miatt előfordulhat, hogy a ténylegesen kihengerelt acéllemez vastagsága eltér a kívánt értéktől. Mivel az acéllemez tömege nem változik a hengerlés során, így ha a hengerelt lemez vastagabb az előírtnál, akkor a hengerelt lemez teljes hossza rövidebb lesz. Például, ha a hengersorba belépő lemez 100 mm vastag és 20 m hosszú, a hengersorból kilépő lemez pedig 10 mm vastag, akkor a hossza 200 m lesz (a hengerlés során, technológiai okokból a lemez szélessége nem változik), viszont ha (egy szélsőséges példával élve) a kilépő lemez 11 mm vastag, akkor a hossza már csak 181,2 m lesz. Ha az acéllemezt a későbbi feldolgozása során fix méretű táblákká darabolják, akkor a rövidebb lemez hossz miatt kevesebb tábla készül, végeredményben veszteség keletkezik. A probléma lényege, hogy nem megfelelő korrekciós faktor alkalmazásával a vastagságmérő 10 mm értéket mutat, miközben a valóságos lemezvastagság (pl. mikrométerrel mérve) 11 mm. A hengerállvány irányító rendszere végig a jónak vélt (10 mm-es) érték szerint állítja be a hengerekre ható nyomóerőt, és látszólag teljesen jól működik minden, a végeredmény mégis egy jóval rövidebb lemez hossz (a valóságos 11 mm-es lemezvastagság miatt).

A hengerlésre kerülő acéllemez tényleges kémiailag összetételével meghatározott korrekciós faktorok használatával ezek a problémák kiküszöbölhetők, így optimalizálva a technológiai folyamatokat és a késztermék jellemzőit.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] <http://www.ims-gmbh.de>
- [2] E. P. Bertin: Principles and Practice of X-Ray Spectrometric Analysis, Second edition, Plenum Press, 1975
- [3] Bódizs Dénes: Atommmagsugárzások mérés technikái, Typotex Kiadó, 2006
- [4] <http://www.nist.gov/pml/data/xraycoef/index.cfm>
- [5] R. P. C. Schram: Application of X-ray imaging for desinty analysis
(<ftp://ftp.nrg.eu/pub/www/nrg/nrglib/2004/44395i11-%20X%20ray%20attenuation.pdf>)

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

TESTING METHODS

A FIZIKAI-KÉMIAI MÓDSZEREK SZEREPE A LIPOSZÓMA ALAPÚ KIS INTERFERÁLÓ RNS (siRNS) SZÁLLÍTÓRENDSZEREK JELLEMZÉSÉBEN

ROLE OF PHYSICOCHEMICAL METHODS FOR CHARACTERIZATION OF siRNA LIPID-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS

EMMER JÁNOS¹, LOVRITY ZITA², KISS-TÓTH ÉVA¹, KOSKA PÉTER¹, SZALAI ADRIENN¹, FODOR BERTALAN¹

Kulcsszavak: karakterizálás, siRNS, liposzóma, lipoplex, áttekintés.

Keywords: characterization, siRNA, liposome, lipoplex, review.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az siRNS *in vivo* célba juttatása legeredményesebben lipid alapú szállítórendszerekkel valósítható meg. Mivel az siRNS alapú terápiát egyre újabb területeken használják, ehhez újfajta lipideket szintetizálnak, hogy optimalizálják a biológiai hatást. Ennek velejárója a fizikai-kémiai módszerek fejlesztése, hogy tökéletesen megérthessük ezeknek az összetett rendszereknek a felépítését és stabilitását. A fizikai-kémiai karakterizálás teremti meg az alapot egy hatékony analitikai ellenőrzési terv kialakításához az siRNS szállítórendszerek előállításánál. Az összefoglalónk célja egy rövid áttekintés a liposzóma alapú kis interferáló RNS (siRNS) szállítórendszerek jellemzésére alkalmas vizsgálati módszerekről.

Abstract

siRNA delivery *in vivo* has been most successfully achieved using lipid-based drug delivery systems. As newer targets for siRNA are identified and novel lipids are synthesized to optimize their *in vivo* efficiency, concomitant development of physicochemical methodologies that can improve understanding of the assembly and stability of these complex systems is critical. Physicochemical characterization thus forms the basis of developing an effective analytical control strategy for siRNA delivery systems. In this short review, physicochemical techniques used to characterize liposome-based siRNA delivery systems are discussed.

BEVEZETÉS

A kis interferáló RNS-ek új távlatokat nyithatnak a génterápiában. Az RNS interferencia (RNSi) egy szekvencia-specifikus géncsökkentési folyamat, mely duplaszálú (sense- és antisense szálak) RNS molekulák közreműködésével megy végbe. A folyamat következtében rövid- vagy hosszú távú génexpressziós csökkentés következhet be DNS,

RNS illetve fehérje szintjén. Az interferencia közvetítésében a kis RNS molekulák három csoportja vesz részt: kis interferáló RNS (siRNS), mikro RNS (miRNS), kis hajtű RNS (shRNS). Szerkezeti jellegzetességük, hogy körülbelül 21-26 nukleotidból állnak.

Az siRNS-ek egyetlen mRNS-re specifikusak és tökéletesen komplementerek a célszekvenciával. Az siRNS-ek működésére, az RNS-célszekvenciával való kötődést követően, a hívívó RNS enzimatisz degradációja a jellemző (RNS-interferencia). A mellékhatások csökkentése érdekében célszerű az interferenciát kiváltó RNS-molekulákat csak azokba a sejtekbe bejuttatni, ahol a célzott géncsökkentést elő akarjuk idézni.

A csupasz siRNS-ek spontán felvétele kis hatásfokú, mivel a véráramban lebomlanak a nukleázok bontó hatása miatt, és a vese kiválasztja ezeket a kis tömegű, polianionos szerkezetű molekulákat. Felezési idejük a véráramban kisebb, mint egy óra. A hatásfokot csökkenti, hogy negatív felszíni töltésük miatt nehezen jutnak át a célsejt membránján. A hatásfok növelése a mechanikai bejuttatás és a kémiai módosítás mellett a különböző szállítórendszerek alkalmazása [1]. A szállítórendszerek lehetnek vírus- és nem-virális vektorok. Vírus vektorokkal hatékony a bejuttatás, hátránya viszont a vírus fehérjék miatti immunválasz kialakulása. A nem-virális vektor lehet biodegradálható (pl. lipoplex, liposzóma) és nem biodegradálható (pl. polimer, nanokapszula, dendrimer). A liposzómák számos előnnyel rendelkeznek: változatos formában és összetételben könnyen előállíthatók, alkalmazásuk biztonságos és alkalmasak nukleinsav hordozók kialakítására.

Jelen munkánkban rövid áttekintést adunk a liposzóma alapú kis interferáló RNS (siRNS) szállítórendszerek jellemzésére alkalmas vizsgálati módszerekről.

LIPOSZÓMÁLIS SZÁLLÍTÓRENDSZEREK JELLEMZÉSE

Lipidek alkalmazása genetikai anyagok szállítására már régóta ismert [2]. A liposzómák foszfolipid kettősmembránnal burkolt üreges

1. Miskolci Egyetem, Egészségügyi Kar,
Nanobiotechnológiai és Regeneratív Medicina Tanszék
2. Miskolci Egyetem, Műszaki Anyagtudományi Kar,
Tüzeléstan és Hőenergia Intézet Tanszék

gömbök, amelyek magukba zárják a zsír- vagy vízdoldható anyagokat. A szállításra használt liposzómák kettősrétege általában több összetevőből áll, tipikusan lipidekből, koleszterinből és polietilén-glikol (PEG)-lipidekből. A képződött liposzómák termodinamikailag stabilak, ezért alkalmasak gyógyszerek és genetikai anyagok szállítására [3]. Ezzel ellentétben a lipoplexek, amelyek spontán képződnek kationos lipidek és negatív töltésű nukleinsavak kölcsönhatásaként, heterogénebb szerkezettel rendelkeznek és instabilak. A lipoplexek két fő jellemzője a lipid összetétel és a töltésarány a lipid és a nukleinsav között. A lipoplexek oldatban lassan aggregálódnak, ezért közvetlenül felhasználás előtt kell őket készíteni [4].

Az siRNS-ek, mivel jól oldódnak vízben, alkalmasak arra, hogy a liposzómák belső vizes közegében, nagy koncentrációban bezárásra kerüljenek. A liposzómába zárt siRNS stabil, mert az RNS molekula elektromos töltése és mérete meggátolja a passzív diffúziót a liposzóma kettősrétegén át [5].

Gomez-Hens és Fernandez-Romero [6] a liposzómák jellemző tulajdonságait három csoportba sorolta:

- Morfológiai jellemzők: méret, alak, fizikai stabilitás, méreteloszlás vagy polidiszperzitás, felületi elektromos töltés.
- Szerkezeti jellemzők: Lipid-összetétel, belső szerkezet, átalakulási hőmérséklet, permeabilitás és fluiditás.
- Funkcionális jellemzők: Bezárás határfoka, kémiai stabilitás, reakcióképesség.

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A liposzómák tulajdonságait alapvetően a lipid összetétel határozza meg. Meyer és munkatársai a lipidek közvetlen mérésére fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszert dolgoztak ki UV detektálással, 205 nm hullámhosszon [7]. Nagyon fontos, hogy az előállított kis interferáló RNS (siRNA)-liposzóma szállítórendszerek jellemzésére megfelelő analitikai módszereket alkalmazzunk. A módszerek akkor megfelelőek, ha reprodukálhatók, pontosak és gyorsak. A kritikus méretek azok, amelyek meghatározzák a készítmény méretét, monodiszperzitását, az siRNA bezárás határfokát és a részecskék felületi töltését. Mivel a felsorolt tulajdonságok mindegyike befolyásolhatja a farmakológiai hatást, és mindegyik változhat az időben, ezért fontos minden paraméter folyamatos ellenőrzésére, a megfelelő vizsgálati módszer alkalmazása. Kapoor és munkatársai [8] összefoglalták a lipid alapú siRNA szállítórendszerek fő jellemzőit

és a leggyakrabban alkalmazott vizsgálati módszereket.

RÉSZECSKEMÉRET MEGHATÁROZÁSA

A liposzómális készítmények részecskeméretének meghatározására általában kétféle módszert használnak. Az egyik a közvetlen megjelenítés pásztázó (SEM) vagy transzmissziós (TEM) elektronmikroszkóppal, a másik közvetett módszer dinamikus fényszórással (DLS) vagy foton korrelációs spektroszkópiával (PCS) [5,8]. Nagyon fontos megadni, hogy milyen módszerrel mértük a részecskeméretet, mert a különböző módszerek eltérő értékeket adhatnak.

Elektronmikroszkópos vizsgálatnál kétdimenziós képet kapunk. Az ideális liposzóma gömb alakú, ezért az átlagos átmérő a képiértékelés módjától is függ. Az elektronmikroszkópos méret-meghatározás nem alkalmas folyamatok követésére és minőségellenőrzésre, mert a minta-előkészítés hosszadalmas, a vizsgált részecskék száma kicsi, ami magában hordozza a nem reprezentatív minta veszélyét, ezáltal növeli a hibalehetőséget.

A dinamikus fényszórás méréshez a liposzómákat folyadékban kell szuszpendálni. A szórt fény intenzitásának időbeni fluktuációját elemzik, ami abból adódik, hogy a fényt szóró részecskék Brown-mozgást végeznek, ezért a szóró centrum helyzete és orientációja folytonosan változik. Minél kisebb a részecske, annál gyorsabb a mozgása. Az így meghatározott méret az ún. hidrodinamikai átmérő, ami nem azonos a geometriai mérettel.

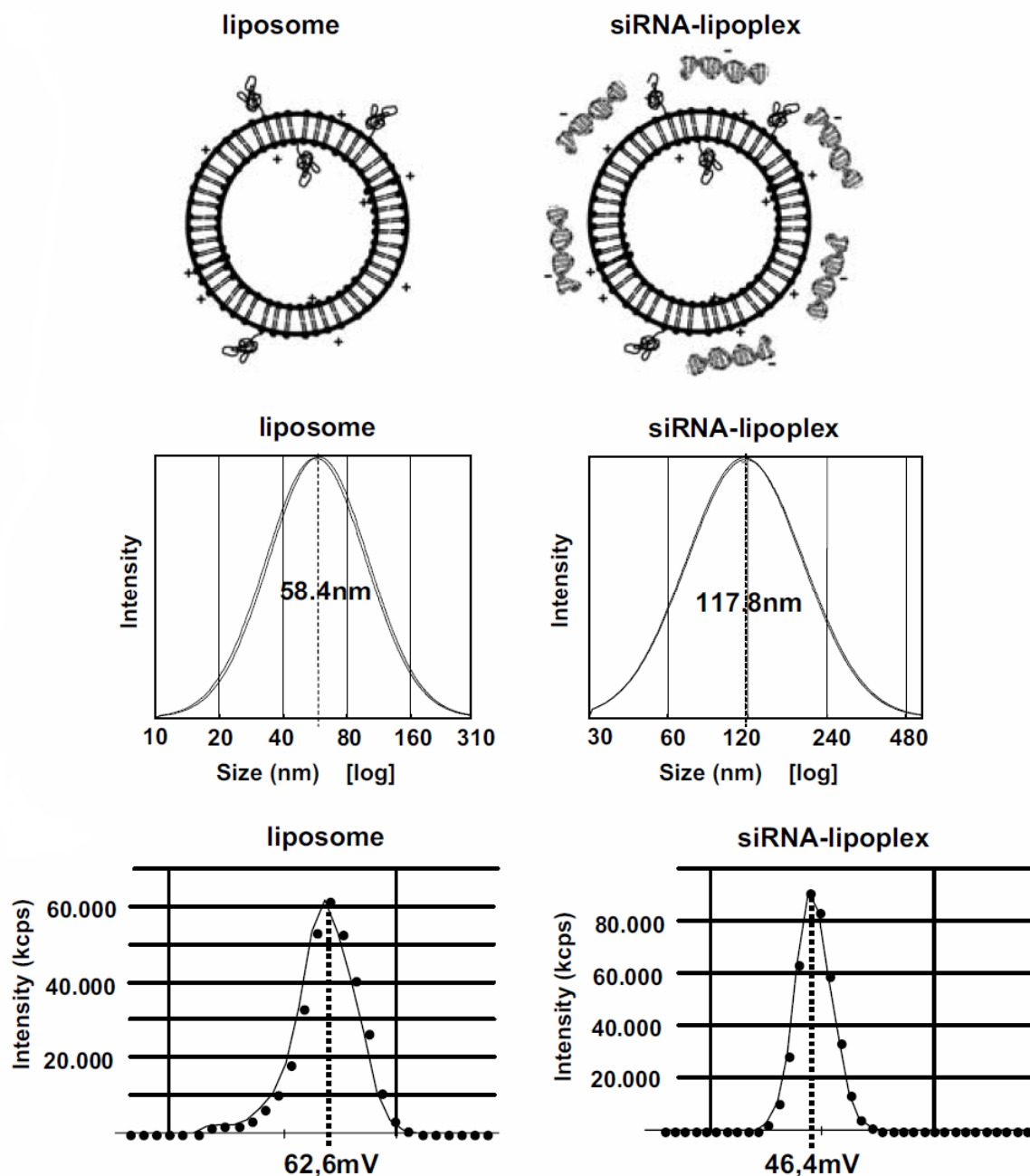
Santel és munkatársai [9] kvázi rugalmas fényszórással (QELS) mérték liposzómák és siRNS lipoplex szállítórendszerek méreteloszlását.

ZÉTA POTENCIÁL MÉRÉSE

A zéta-potenciál a liposzómák felületi töltésének mértéke. Ez két okból is érdekes. Egyrészt a töltés hatással van a részecske stabilitására, másrészt a liposzóma farmakológiai viselkedésére. Vizes oldatban az elektromos töltéssel rendelkező diszpergált részecskéket egy ellentétes töltésű diffúz ionréteg veszi körül, amelynek egy része erősen kötött (ún. Stern réteg), majd könnyebben megbontható réteg következik. A két réteget elválasztó határvonalon mérhető potenciál az ún. zéta-potenciál. Ha a zéta-potenciál értéke nulla, akkor a rendszerek stabilitása lecsökken, a részecskék könnyen összetapadhatnak, koagulumok, aggregátumok alakulhatnak ki. Ha a zéta-potenciál értéke pozitív vagy negatív irányban messzebb van az izoelektromos ponttól, tapasztalatok alapján az érték nagyobb, mint + 30

mV vagy kisebb, mint - 30 mV, a kolloid rendszer stabil, a részecskék taszítják egymást, összetapadásuk valószínűsége lecsökken. A zéta-potenciál értékét befolyásolja a pH, a közeg vezetőképessége, az oldott ionok minősége és mennyisége.

Több szerző leírta [8, 9, 13, 15] liposzómák és siRNA lipoplex szállítórendszerek felületi töltésének meghatározását zéta-potenciál méréssel.



1. ábra Pozitív töltésű liposzómák és az siRNA-lipoplexek sematikus rajza, méreteloszlása (DLS módszerrel mérve) és Zéta-potenciálja, Santel és munkatársai [9] szerint

BEZÁRÁSI HATÉKONYSÁG MEGHATÁROZÁSA

A bezárási hatékonyság (EE: Encapsulation efficiency) megadja, hogy mennyi siRNA tölthető

be a liposzómális hordozóba. Az EE a következő képletek valamelyikével számolható [8]:

$$EE\% = \frac{\text{Bezárt siRNS koncentráció}}{\text{Kiindulási siRNS koncentráció}} \times 100$$

$$EE\% = 100 - \left(\frac{\text{Szabad siRNS koncentráció}}{\text{Kiindulási siRNS koncentráció}} \times 100 \right)$$

A bezárt siRNA koncentráció méréséhez a liposzómák kettős rétegét megbontják valamilyen nem ionos tenziddel, általában TritonX-100-al. Az siRNS koncentráció mérésére többek között az ultraibolya-látható (UV-Vis) spektroszkópiát használják, mérik az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon vagy a fluoreszcenciát (RiboGreen-nel jelölt siRNS) 490 nm/520 nm hullámhosszon. Hirsch és munkatársai [5] HPLC módszerrel mérték az siRNS koncentrációt UV és fluoreszcens detektálással, az siRNS-t tetrametilrodaminnal és fluoreszceinnel jelölték. Egy másik technika a centrifugálással végzett ultraszűrés. Ezzel a módszerrel a lipoplexekeket egy 30-100 kDa pórusméretű membránon szűrik át, így a szabad siRNS átmegy, a bezárt siRNS-t pedig visszatartja a membrán. A szabad siRNS koncentrációját abszorbancia vagy fluoreszcencia méréssel határozzák meg. A kromatográfiai vizsgálati módszerek közül a kapilláris gél elektroforézis (CGE), az anioncserélő nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (AX-HPLC) és a fordított fázisú, ionpár kromatográfia (RPIP-HPLC) alkalmas az siRNS készítmények analízisére [10]. Az RPIP-HPLC módszer jó felbontást ad a nukleinsavakra és kompatibilis a tömegspektrometriás (MS) detektálással. Murugaiah és munkatársai RPIP-HPLC módszert dolgoztak ki a bezárt siRNS koncentráció mérésére [11]. 60-65°C hőmérsékleten a lipid kettősréteg felbomlik és az siRNS duplex denaturálódik sense- és antisense szálakra. Li és munkatársai hasonló méréseket végeztek ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (UHPLC) 80 °C-on [12].

MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

Morfológiai vizsgálatok a részecskeméret meghatározásánál leírt elektronmikroszkópos módszerekkel is elvégezhetők. Kapoor és munkatársai [8] krio transzmissziós elektronmikroszkópiával (cryo-TEM) vizsgálták, hogy a kationos liposzómákból és siRNS-ből képződött lipoplexe-

szervezetét hogyan befolyásolja a kationos lipidszerkezet és a töltésarány.

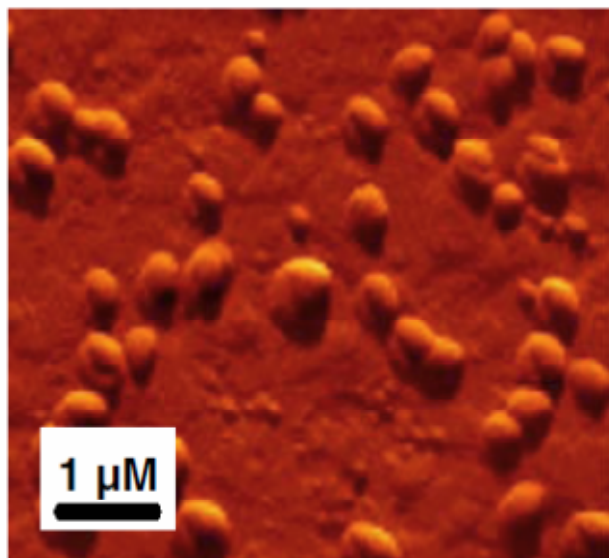
Az atomerő mikroszkópia (AFM) jól alkalmazható liposzómák morfológiai vizsgálatára, mert nem igényel minta-előkészítést és nincs szükség különleges atmoszférára. A technika lényege, hogy egy vékony, könnyen hajló konzolra szerelt, kis görbületi sugarú tűvel letapogatják a mintát. Amikor a tű hegye, amely egyetlen atomból áll, közel kerül a minta felszínéhez, megváltozik annak helyzete a fellépő erőhatások miatt. Az elhajlás detektálását lézerrel és fotodiódákkal végzik és egy visszacsatoló mechanizmus ennek megfelelően igazítja a tű minta feletti magasságát. A finom mozgásokat piezo-kristályok segítségével lehet előállítani. A végeredmény egy nagyfelbontású, háromdimenziós profil a vizsgált felszínről [13]. Schäfer és munkatársai [14] siRNS-t szállító liposzómák, poliplexek és lipopoliplexek méretét és szerkezetét vizsgálták AFM módszerrel. Garbuzenko és munkatársai [15] hagyományos-, PEGilált- és kationos liposzómák, valamint kationos liposzóma siRNS komplexek alakját vizsgálták AFM technikával. A felvételek a 2. ábrán láthatók.

STABILITÁSI VIZSGÁLATOK

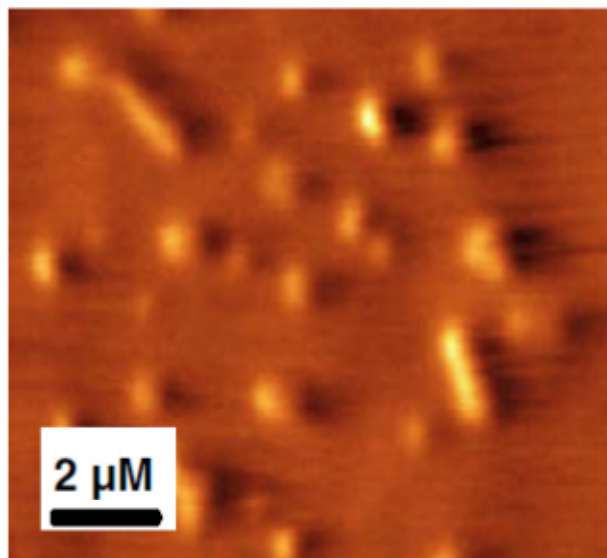
A liposzómális siRNS készítmények fizikai és kémiai hatásra destabilizálódhatnak. A fizikai destabilizációt jelzi a liposzómák méretének szignifikáns növekedése és aggregátumok képződése. A kémiai destabilizáció jele a bezárt siRNS szivárgása vagy a liposzóma teljes felbomlása, emellett bekövetkezhet a lipidek és a nukleinsavak degradációja is [8]. A lipid degradációt a hidrolízis és/vagy az oxidáció okozza. Savas vagy bázikus közegben a nukleinsavak hidrolízist szenvedhetnek.

A fizikai stabilitást a részecskeméret és a zéta-potenciál rendszeres mérésével lehet ellenőrizni az előzőekben leírt módszerekkel. A 3. ábrán egy általunk vizsgált liposzóma készítmény méreteloszlása látható, 90 napos tárolást követően. A felvételen látható, hogy az eredeti részecskék (46,7±2,9 nm) mellett megjelennek az aggregátumok (331,3±79,6 nm) is.

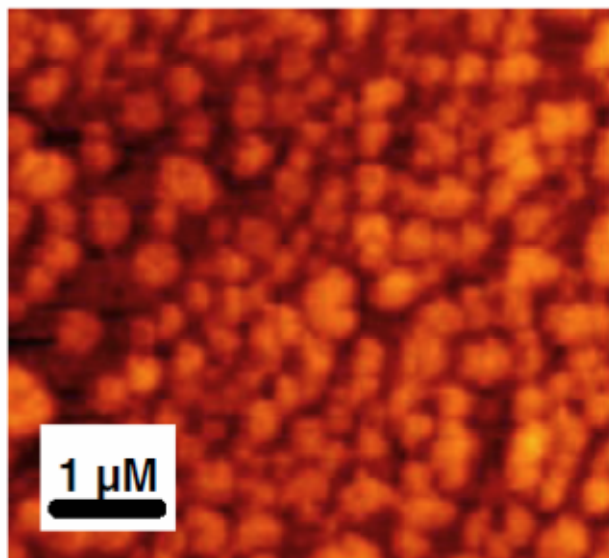
**Neutral
Conventional Liposomes**



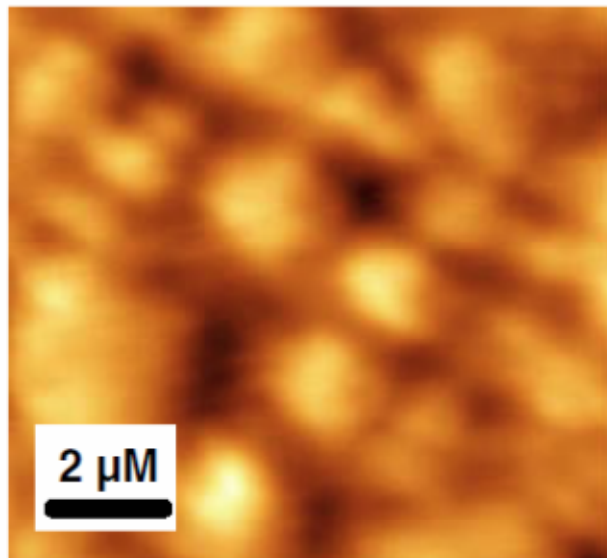
**Neutral
PEGylated Liposomes**



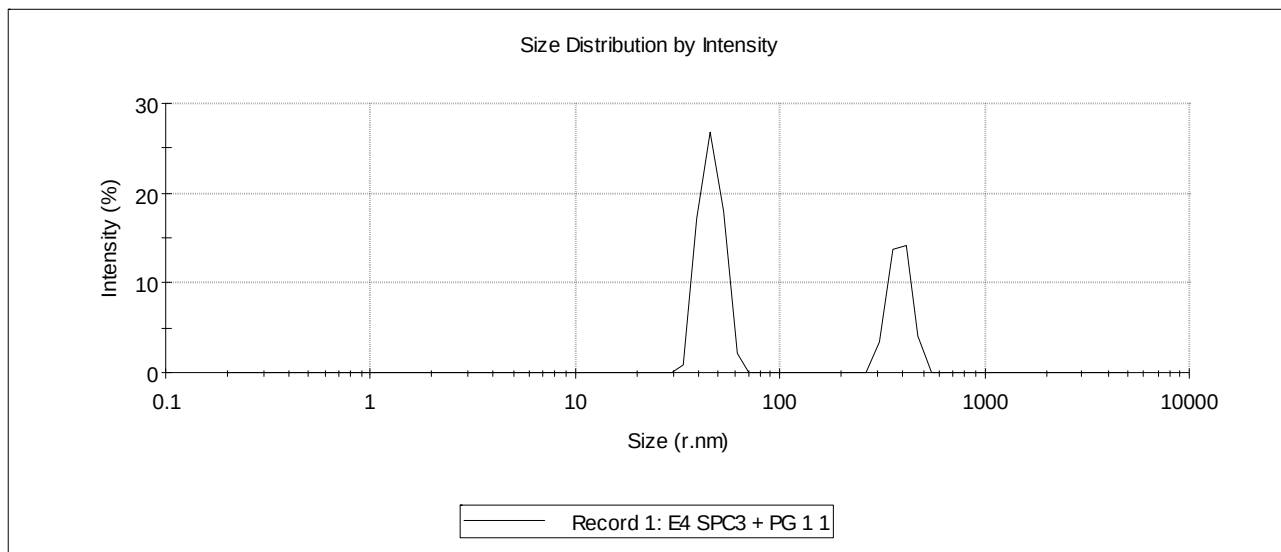
Cationic Liposomes



**Cationic
Liposomes with siRNA**



2. ábra Atomerő mikroszkóppal (AFM) készült képek hagyományos-, PEGilált- és kationos liposzómák, valamint kationos liposzóma siRNS komplexek alakjáról, Garbuzenko és munkatársai [15] szerint



3. ábra Liposzóma méreteloszlása DLS módszerrel mérve, Malvern Zetasizer Nano-ZS készüléken

Az extrém körülmények között, savas és bázikus közegben, vizsgált lipid degradáció hidrolízis- és oxidációs termékeinek mérésére a normál vagy fordított fázisú HPLC alkalmas, UV vagy porlasztósos fényszórás (ELS) detektálással. Zhong és munkatársai a liposzómák lipid degradációs profiljának tanulmányozására RP-HPLC-t használtak [16]. Murugaiah és munkatársai fordított fázisú, ionpár kromatográfiás (IPRP-HPLC) módszerrel követték a degradációt savas-, bázikus- és oxidatív körülmények között, valamint emelt hőmérsékleten (75 °C), a degradációs termékeket és a szennyező anyagokat pedig tömegspektrometriás (MS) detektorral azonosították [11].

KÖVETKEZTETÉSEK

A liposzómális szállítórendszerek hatékonyságának ellenőrzésére alkalmas karakterizálási módszerek fejlesztése párhuzamosan folyik a szállítórendszerek fejlesztésével, ezért szükséges a szakirodalom folyamatos figyelése. A módszerek akkor megfelelőek, ha reprodukálhatóak, pontosak és gyorsak.

Ha a liposzóma alapú kis interferáló RNS (siRNS) szállítórendszerek előállítását jól ellenőrzött körülmények között történik, és ha azok fizikai-kémiai jellemzőit optimalizálni tudjuk az alkalmazás sajátos igényeinek megfelelően, akkor megteremtjük egy biológiailag hatásos készítmény gyártásának lehetőségét.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A bemutatott tanulmány a TÁMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 jelű projekt részeként az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

IRODALMAK

- [1] Ramon, A.-L., Bertrand, J.-R., Malvy, C.: Delivery of small interfering RNA. A review and an example of application to a junction oncogene. *Tumori*, 2008, 94, 254-263.
- [2] Ledley F. D.: Non-viral gene therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1994, 5, 626-636.
- [3] Wu, S. Y., McMillan, N. A. J.: Lipidic Systems for In Vivo siRNA Delivery. *The AAPS Journal*, 2009, 11, 4, 639-652.
- [4] Gondi, C. S., Rao, J. S.: Concepts in in vivo siRNA Delivery for Cancer Therapy. *J. Cell. Physiol.*, 2009, 220(2), 285-291.
- [5] Hirsch, M., Ziroli, V., Helm, M. et al: Preparation of small amounts of sterile siRNA-liposomes with high entrapping efficiency by dual asymmetric centrifugation (DAC). *Journal of Controlled Release*, 2009, 135, 80-88.
- [6] Gomez-Hens, A., Fernandez-Romero, J. M.: The role of liposomes in analytical processes. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24, 1, 9-19.
- [7] Meyer, O., Roch, O., Elmlinger, D. et al: Direct lipid quantitation of cationic liposomes by reversed-phase HPLC in lipoplex preparation process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, 50, 353-356.
- [8] Kapoor, M., Burgess, D. J., Patil, S. D.: Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, ARTICLE IN PRESS
- [9] Santel, A., Aleku, M., Keil, O. és et al: A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endo-

- thelium. Gene Therapy, 2006, 13, 1222-1234.
- [10] McCarthy S. M., Gilar, M., Gebler J.: Reversed-phase ion-pair liquid chromatography analysis and purification of small interfering RNA. Analytical Biochemistry, 2009, 390, 181-188.
- [11] Murugaiah, V., Zedalis, W., Lavine, G. et al: Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of two liposome-formulated short interfering RNA duplexes. Analytical Biochemistry, 2010, 401, 61-67.
- [12] Li, Z., Schariter, J. A., Zhang, J. et al: Application of Ultra-high Performance Liquid Chromatography for Chemical Characterization of Liposome-based Therapeutic Small-interfering RNA. American Pharmaceutical Review, 2010, September/October, 101-110.
- [13] Edwards, K. A., Baeumner A. J.: Analysis of liposomes. Talanta, 2006, 68, 1432-1441.
- [14] Schäfer, J., Höbel, S., Bakowsky, U. et al: Liposome-polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery. Biomaterials, 2010, 31, 6892-6900.
- [15] Garbuzenko, O. B., Saad, M., Betigeri, S. et al: Intratracheal Versus Intravenous Liposomal Delivery of siRNA, Antisense Oligonucleotides and Anticancer Drug. Pharmaceutical Research, 2009, 26, 2, 382-394.
- [16] Zhong, Z., Ji, Q., Zhang, J. A.: Analysis of cationic liposomes by reversed-phase HPLC with evaporative light-scattering detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 51, 947-951.

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

TESTING METHODS

STABIL IZOTÓPPAL JELÖLT REAGENSEK ALKALMAZÁSA A KVANTITATÍV PROTEOMIKÁBAN APPLYING STABLE ISOTOPE LABELLING REAGENTS IN THE QUANTITATIVE PROTEOMIC

LOVRITY ZITA, EMMER JÁNOS, JUHÁSZNÉ SZALAI ADRIENN, KOSKA PÉTER, FODOR BERTALAN

Kulcsszavak: kvantitatív proteomika, tömegspektrometria, stabil izotóppal jelölt reagens

Keywords: quantitative proteomics, mass spectrometry, stable isotope labelled reagents

ÖSSZEFOGLALÁS

Az utóbbi néhány évtizedben megvalósult technikai újításoknak köszönhetően a proteomikai kutatások az egyedi proteinkarakterizálástól eljutottak a komplex biológia mechanizmusok kiterjedt kvalitatív és kvantitatív leírásáig. A proteinek mennyiségi meghatározásának egyik lehetséges módszere azok stabil izotópokkal történő jelölése. Több ilyen eljárást alkalmaznak a proteomikai kutatásokban. Ebben az összefoglalóban a legelterjedtebben alkalmazott jelölési módszereket mutatjuk be: sejtkultúrák stabil izotópot tartalmazó aminosavakkal történő jelölése (SILAC); izotóppal kódolt affinitás alapján történő jelölés (ICAT), enzimkatalizált ^{18}O -t tartalmazó reagenssel való jelölés és azonos tömegű oldalláncokat tartalmazó reagens alkalmazása relatív és abszolút mennyiségi meghatározásra (iTRAQ).

Abstract

Over the last few decades due to the technological innovations proteomic research have led from the single protein characterization methods to the qualitative and quantitative analysis of the complex biological (biochemical) mechanisms. Stable isotope labelling of proteins is one of the possible processes for quantitative determination of proteins. Several methods are used in proteomics research. In this review we will demonstrate the most widely used labelling methods: stable isotope labelling by amino acid (SILAC), isotope coded affinity tag (ICAT), enzyme-catalyzed ^{18}O isotope labelling and isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ).

BEVEZETÉS

Biológiai folyamatokban rendkívül fontos szerepet játszik a sejten belül lévő proteinek dinamikus változása. Komplex biológiai minták kvalitatív és kvantitatív analizésére elsődlegesen alkalmazott módszer a tömegspektrometria (MS Mass Spectrometry). Az utóbbi néhány évtizedben a tömegspektrometriában alkalmazott technika óriási fejlődésen ment keresztül. Megjelentek a piacon a

hibrid vagy más néven tandem készülékek (LC/MS/MS Liquid Chromatography/Mass Spectrometry), melyek segítségével aminosav szekvencia és poszt-transzlációs módosítások is meghatározhatók.

A proteinek mennyiségi meghatározása nem egyszerű feladat, mert nehéz használni a mérések során belső sztenderdeket a minta-előkészítés következtében fellépő protein visszanyerések különbözősége miatt. Két alternatív módszert alkalmaznak a kvantitatív proteomikában: a jelölés nélküli reagens és a stabil izotóppal jelölt reagens segítségével történő mennyiségi meghatározás.

Az izotópot nem tartalmazó eljárás a vizsgált proteinek megbízhatóan összehasonlítható analizésén alapszik, ami így nagymértékben függ az LC/MS/MS mérések ismételhetőségétől [1,2].

Napjainkban a kvantitatív proteomika elsődleges módszere a stabil izotóppal jelölt reagens alkalmazása tömegspektrometriás analizissal. Többféle módszer terjedt el a gyakorlatban, attól függően, hogy milyen típusú proteineket vizsgálnak. Ezen mérési módszerek azt használják ki, hogy a nagyfelbontású tömegspektrométerek segítségével ugyanazon protein izotóppal jelölt és nem jelölt változata megkülönböztethető. A mennyiségi analizés során egy adott tömegspektrumban a két típusú proteinhez (jelölt és nem jelölt) tartozó csúcsintenzitások relatív arányát határozzák meg. Léteznek abszolút mennyiségi meghatározási módszerek is, amelyek szintetikus peptid belső sztenderdként való alkalmazására épülnek [3,4].

Stabil izotópként ^{13}C -t, ^{15}N -t, ^{18}O -t stb. használnak. A stabil izotópot és izotópot nem tartalmazó vegyületek analitikai módszerekkel nem választhatók szét, de a tömegspektrumban könnyen megkülönböztethetők és mennyiségileg meghatározhatók. A deutérium azonban kivétel, mivel kromatográfián fordított fázisú oszlopon elválik a jelölt és nem jelölt peptid [5].

A relatív mennyiségi meghatározási módszerek két nagy csoportra oszthatók: az *in vivo* és az *in vitro* jelölés. Az *in vivo* jelölések során a sejtkultúrák tenyésztése egy speciális közegben, stabil izotópot tartalmazó aminosavak hozzáadásával

Lovrity Zita dr., Emmer János dr., Juhász Szalai Adrienn, Koska Péter, Fodor Bertalan dr.: Miskolci Egyetem, Egészségügyi Kar, Nanobiotechnológiai és Regeneratív Medicina Tanszék

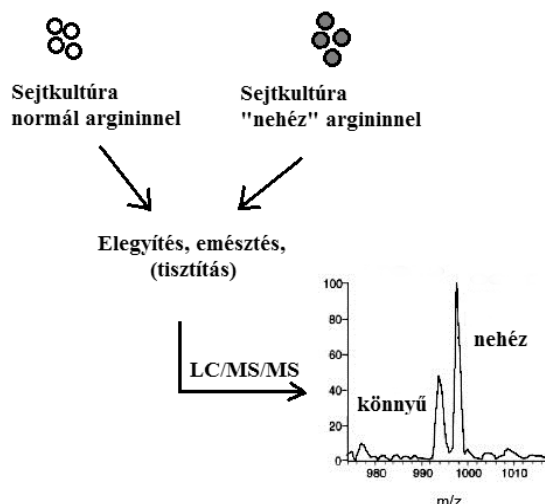
történik. Az első ilyen jellegű kísérletekben baktériumokat tenyésztettek ^{14}N és ^{15}N izotópot tartalmazó közegben [6]. Az in vitro jelölések során az izotópot tartalmazó oldallánc kémiai vagy enzimreakció útján kerül be a peptidláncba.

1. SEJTKULTÚRÁK STABIL IZOTÓPOT TARTALMAZÓ AMINOSAVAKKAL TÖRTÉNŐ JELÖLÉSE (SILAC STABLE ISOTOPE LABELING BY AMINO ACID)

Mann és munkatársai kifejlesztettek egy olyan módszert, melynek során a sejteket egy normál aminosavat és egy jelölt aminosavat tartalmazó kultúrában tenyésztették [7]. A módszer során az aminosavak közül általában a lizint és az arginint jelölik ^{13}C , ^{15}N , ^2H izotópokkal. A nehéz izotópot tartalmazó aminosavak meghatározott idő alatt teljes mértékben beépülnek a sejtekben előállított proteinbe. A következő lépésben a különböző módon jelölt proteineket összekeverik, emésztik, végül tömegspektrometriás módszerrel mérik. A tömegspektrumban lévő, a könnyű és a nehéz izotópot tartalmazó peptidekhez tartozó jelintenzitás arányokból mennyiségi következtetések vonhatók le (1. ábra).

Néhány fontos feltételnek teljesülnie kell a SILAC alkalmazása esetén. A jelölt és a jelöletlen aminosavak tömege között legalább 4 Da eltérésnek kell lenni. Továbbá a sejtek növekedéséhez a módszer során alkalmazott aminosavaknak létfontosságúnak kell lennie.

A módszer előnye a nagy hatékonyságú, kis hibájú jelölés, ezért számos alkalmazási területe létezik [8,9,10] Hátránya viszont a magas költség. Alkalmazhatóságát korlátozza az élő sejt kultúra szükségessége.

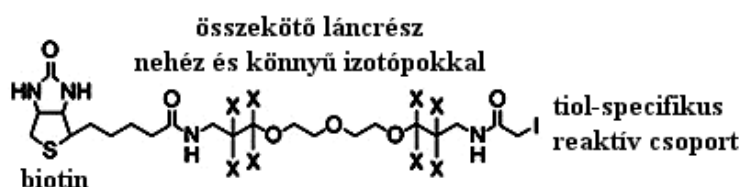


1. ábra. A sejt kultúra in vivo aminosav anyagcseréje

Fig. 1. In vivo amino acid metabolism of cell culture

Izotóppal kódolt affinitás alapján történő jelölés (ICAT Isotope Coded Affinity Tag)

Ez a módszer az egyik legnépszerűbb kémiai származékképzés cisztein tartalmú proteinek vizsgálatára. Az ICAT reagens három részből áll (2. ábra). Tartalmaz egy ún. affinitás oldalláncot, amely arra szolgál, hogy elkülönítse a jelölt peptidet avidin affinitás kromatográfia segítségével. A reagens középső része az összekötő láncrész vagy linker, ami stabil izotópokat tartalmaz. Ezáltal lesz a peptid tömegspektrometriás módszerrel azonosítható. Végül a reaktív csoport tartalmazó láncvég, amely szelektív tiol-csoportra, így tud reakcióba lépni a cisztein tartalmú peptidekkel.



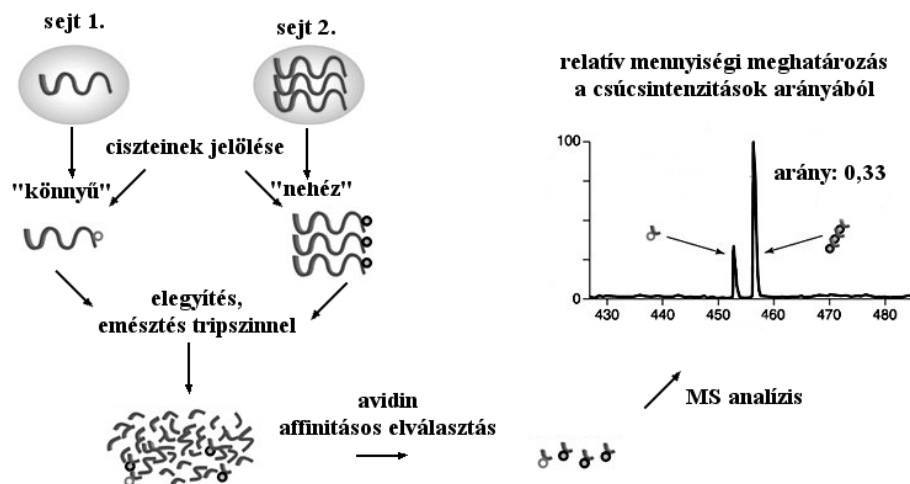
2. ábra. ICAT reagens szerkezete. „Nehéz” reagens: X=deutérium; „könnyű” reagens: X=hidrogén
Fig. 2 Structure of ICAT reagent: „Heavy reagent: X=deuterium; light reagent: X=hydrogen

Eredetileg az ICAT reagensok deutériumot tartalmaztak, de a fordított fázisú folyadékkromatográfiában a könnyű és nehéz izotópot tartalmazó komponensek eltérő retenciós idővel eluálódtak. Ezért a második generációs ICAT reagensok már

^{12}C -, ^{13}C -t tartalmaztak. A legújabb reagensok már egy további csoporttal bővültek. Ez a sav által hasítható csoport a biotin és a jelölt láncrész között található. Így a fragmens ionok szekvenciájának meghatározása egyszerűbbé vált [11,12].

A módszer során sejtkultúrákat hoznak létre elkülönítetten. Majd ezeket denaturálják, redukálják és jelölik a könnyű és nehéz izotópot tartalmazó ICAT reagenssel. Akkor a két sejtsortot meghatározott arányban összekeverik és enzimatiskus módszerrel (tripsinnel) hasítják a peptid láncokat.

A jelölt peptideket biotin affinitás kromatográfiával elkülönítik, majd ezt követi a HPLC/MS/MS analízis. A relatív mennyiségi meghatározás a tömegspektrumban lévő ICAT reagenshez tartozó ionintenzitásokból számítható (3. ábra).

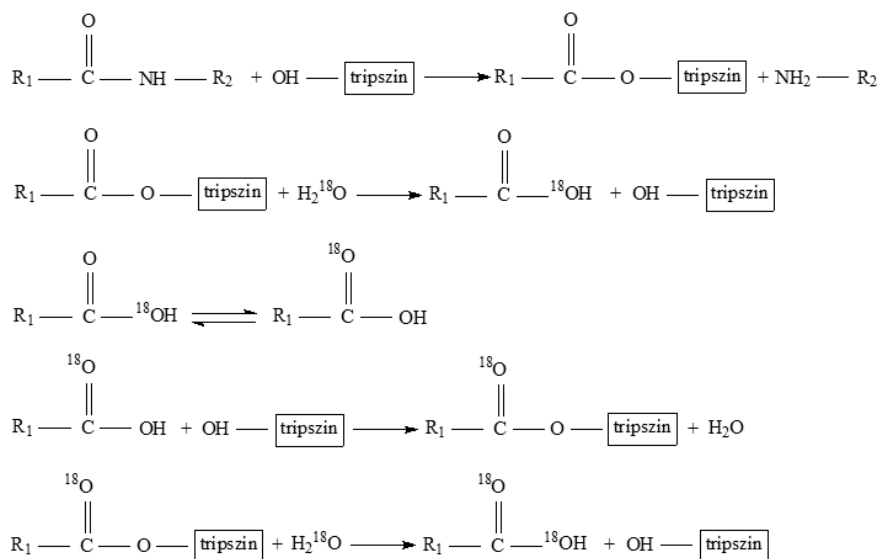


3. ábra. ICAT jelölés [13]
Fig. 3. ICAT labelling [13]

A módszernek számos előnye van. Állati vagy emberi eredetű sejtekből, szövetekből, testnedvekből származó proteinek vizsgálatára alkalmas, az alkilezési reakció nagymértékben specifikus, nem érzékeny sókra, detergentekre. Hátránya a módszernek, hogy a peptidek módosítása megnehezíti az adatbázis alapján történő azonosítást és csak ciszteint tartalmazó proteinekre alkalmazható.

2. ENZIMKATALIZÁLT, ^{18}O -T TARTALMAZÓ REAGENSSEL VALÓ JELÖLÉS

A módszer során a polipeptid lánc C-terminusán található karboxil-csoport két ^{16}O -jét cserélik le ^{18}O -re, ezáltal a jelölt peptid tömege 4Da-nal növekszik. A reakció H_2^{18}O -t tartalmazó közegben játszódik le, a ^{18}O a tripszines emésztés után kialakuló észter kötések hidrolízisével kerül a karboxil-csoportba (4. ábra).

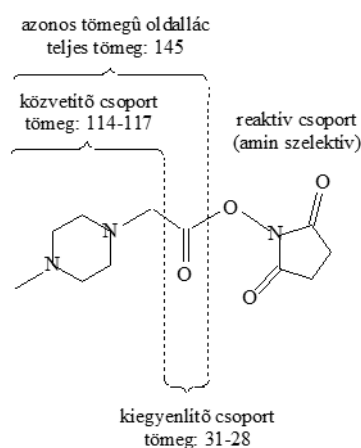


4. ábra. ^{18}O -nel történő jelölés során lejátszódó reakciók
Fig. 4. Reactions of ^{18}O -labelling

A peptidek majdnem 100%-a jelölhető abban az esetben, ha az enzimatis reakciót 95%-os $H_2^{18}O$ -t tartalmazó közegben hajtják végre. A jelölés hatékonysága függ a pH-tól, az alkalmazott enzim típusától, a peptidek sajátosságaitól, a jelölés időtartamától [14].

A gyakorlatban két módszerrel is megvalósítható ez a típusú jelölés. A közvetlen módszer során az enzimatis emésztés és a jelölési reakció ugyanazon reakció rendszerben történik. Ennek a kivitelezésnek a hátránya, hogy nem teljes mértékben tudnak megjelölni minden karboxil-csoportot. A másik eljárás szerint az emésztési és a jelölési reakciót elkülönítetten hajtják végre. A jelölés hatékonysága nagyobb, mint az előző esetben, viszont időigényesebb, mint a közvetlen jelölés.

A $H_2^{18}O$ -val történő enzimatis jelölés könnyen kivitelezhető, nem igényel különleges reagenseket és előállítási reakciókat. A folyamat független a peptidek aminosav sorrendjétől, ezért poszt-transzlációs módosítások is detektálhatók a módszer segítségével, valamint enzimatis proteolízis vizsgálatára is alkalmas az eljárás [15].

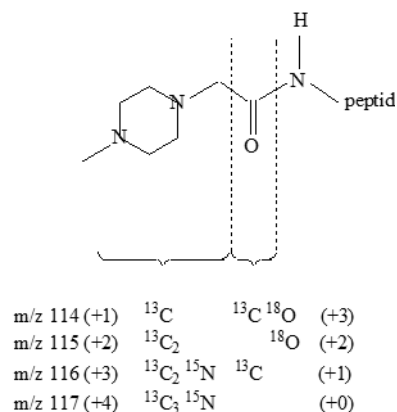


5. ábra. iTRAQ reagens szerkezete [16]
Fig. 5. Structure of iTRAQ reagent

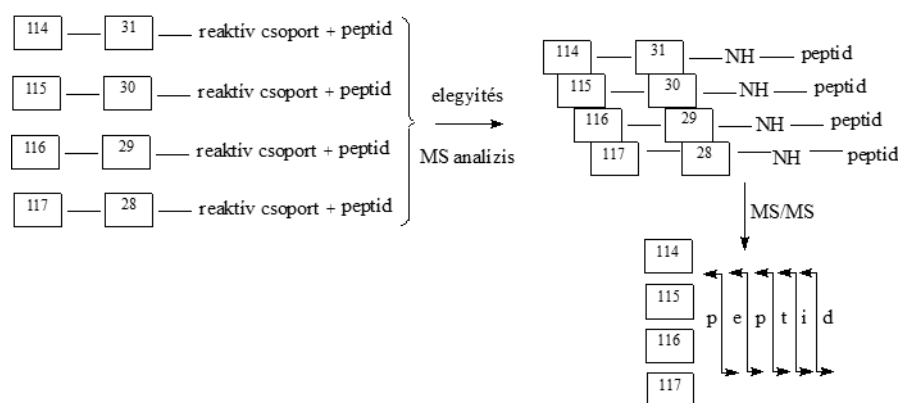
A négy különböző tömegű iTRAQ reaggenssel jelölt peptidet összekeverik, az MS analízis során kapott négy m/z érték a különböző tömegű reaggenssel jelölt peptidlánchoz tartozik. Majd a következő lépésben, az MS/MS analízis során a közvetítő csoport leszakad a molekuláról, ezek megjelennek négy különböző ionként a tömegspektrumban és a peptid fragmentálódik. A négy peptidlánc relatív koncentrációja számítható a közvetítő ionokhoz tartozó csúcsok intenzitásából.

3. AZONOS TÖMEGŰ OLDALLÁNCOKAT TARTALMAZÓ REAGENSEK ALKALMAZÁSA RELATÍV ÉS ABSZOLÚT MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSRA (iTRAQ ISOBARIC TAGS FOR RELATIVE AND ABSOLUTE QUANTIFICATION)

Az izotópos jelölések közül ez a legszélesebb körben, sikeresen alkalmazott módszer. Ezen eljárás során az emésztés után kapott peptid N-terminus és a lizin jelölése történik az iTRAQ reaggenssel. A reagens három részre tagolható: a közvetítő (report) csoport, a kiegyenlítő (balanced) csoport és a peptid reaktív csoport (5. ábra). A reaktív csoport reakcióba lép az N-terminális és oldalláncok amino-csoportjával. A közvetítő csoportnak olyan szerkezetűnek kell lennie, hogy legalább 4 különböző tömeggel rendelkezzen. A tömegkülönbséget a nehéz izotópok számának változtatásával érik el. Mindegyik közvetítő csoporthoz tartozik egy meghatározott tömegű kiegyenlítő csoport, hogy biztosítva legyen az oldallánc azonos tömege.



A módszer mindenképpen tandem (MS/MS) tömegspektrométert igényel, de még így is nehéz a mennyiségi meghatározás a jelöletlen, de azonos tömegű fragmensek jelenléte miatt. Számos alkalmazási területe van ennek a módszernek: plazma protein analízis [17], fibrinopeptidek vizsgálata [18], biomarkerként való alkalmazás rákos sejtek vizsgálatakor [19].



6. ábra. A jelölt peptidek relatív koncentrációjának meghatározása
Fig. 6. Determination of relative concentration of labelled peptides

4. ÖSSZEFOGLALÁS

A proteinek teljes kvalitatív és kvantitatív jellemzése nem egyszerű feladat. Napjainkban a kvantitatív proteomikában az elsődleges módszer a stabil izotópok alkalmazása tömegspektrometriás analízissel. A gyakorlatban alkalmazott eljárásoknak számos előnye és egyben korlátja van. A technika folyamatosan fejlődik, hogy pótolja az eddigi módszerek hiányosságait. A cél az, hogy orvosi biológiai és klinikai gyakorlatban is rutinszerűen alkalmazható legyenek a kvantitatív proteomikai eljárások.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A bemutatott kutató munka a TÁMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 jelű projekt részeként az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Haqqani A. S. Kelly J. F. Stanimirovics D. B.: Quantitative protein profiling by mass spectrometry using label-free proteomics. *Methods Mol. Biol.*, 2008, 439, 241-256.
- [2] Andersen J. S. Wilkinson C. J. Mayor T. Mortensen P. Nigg E. A. Mann M.: Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 2003, 246, 570-574.
- [3] Kirkpatrick D. S. Gerber S. A. Gygi S. P.: The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modification. *Methods*, 2005, 35, 265-273.
- [4] Brun V. Masselon C. Garin J. Dupuis A.: Isotope dilution for absolute quantitative proteomics. *Proteomics*, 2009, 72, 740-749.
- [5] Ong S. -E. Foster L. J. Mann M.: Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*, 2002, 29, 124-130.
- [6] Oda Y. Huang K. Cross F. R. Cowburn D. Chait B. T.: Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 6591-6596.
- [7] Ong S. -E. Mann M.: A practical recipe for stable isotope labeling by amino acid in cell culture (SILAC). *Protocol*, 2006, 1(6), 2650-2660.
- [8] Schulze W. X. Mann M.: A novel proteomic screen for peptide protein interaction. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 10756-10764.
- [9] Gruhler A. Olsen J. V. Mohammed S. Mortensen P. et al.: Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol. Cell. Proteomics*, 2005, 4, 310-327.
- [10] Ishihama Y. Sato T. Tabata T. Miyamoto N. et al.: Quantitative mouse brain proteomics using culture-derived isotope tags as internal standard. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23, 617-621.
- [11] Zhang H. et al.: Chemical probes and tandem mass spectrometry: a strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes. *Current Opinion Chem. Biol.*, 2004, 28, 66-75.
- [12] Li J. Steen H. Gygi S. P.: Protein profiling with cleavable isotope coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response. *Mol. Cell. Proteomics*, 2003, 2, 1198-1204.
- [13] Gygi S. P. Aebersold R.: Using mass spectrometry for quantitative proteomics. *Proteomics: A Trends Guide*, 2000, 31, 36.
- [14] Capelo J. L. Carreira R. J. Fernandes L. et al.: Latest developments in sample treatment for

- ¹⁸O-isotopic labeling for proteomics mass spectrometry-based approaches: A critical review. *Talanta*, 2009, 80, 1476-1486
- [15] Lin-Yi Q. Wan-Tao Y. Xin L. et al.: Establishment and optimization of stable isotope ¹⁸O-labeling strategy for quantitative proteomics research. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2007, 35(2), 161-165.
- [16] Ross P. L. Huang Y. L. N. Marchese J. N. et al.: Multiplex protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics*, 2004, 3, 1154-1169.
- [17] Anderson L. Hunter C. L.: Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell Proteomics*, 2006, 5, 573-88.
- [18] Enyenihi A. A. Griffiths J. R. Glish G. L.: Tandem mass spectrometric methods for the analysis of iTRAQ labeled peptides in a quadrupole ion trap. *International Journal of Mass Spectrometry Article*, 2011, in press, online available
- [19] Armenta J. M. Perez M. Yang X. et al.: Fast proteomic protocol for biomarker fingerprinting in cancerous cells. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 2862-2870.

MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

QUALITY ASSURANCE

EGY ÉRDEKES JÁRTASSÁGI VIZSGÁLAT. – AKUSZTIKUS EMISSZIÓS HELYMEGHATÁROZÁS
AN INTERESTING ROUND ROBIN TEST – DETERMINATION OF POSITION BY ACOUSTIC EMISSION

FÜCSÖK FERENC, GERÉB JÁNOS

Kulcsszavak: Akusztikus emisszió, jártassági vizsgálat, hely meghatározás
Keywords: Acoustic emission, Round Robin Test, determination of position

ÖSSZEFOGLALÁS

A Magyar Roncsolásmentes Vizsgálati Szövetség és a Dunaújvárosi Főiskola Magyar Akusztikai és Ipari Diagnosztikai Vizsgálólaboratóriuma által közösen rendezett II. Akusztikus Emissziós Vizsgálatok Nyomástartó Edényeken című szimpóziumon a résztvevő laboratóriumok jártassági vizsgálaton vettek részt. A résztvevők egy 4,85 m³ űrtartalmú, 15,6 bar üzemi nyomású, cseppfolyós PB gáz tárolására használt, üzemből kivont tartályon végeztek nyomáspróbát, annak felszakadásáig. A nyomáspróba előtt 64 lokalizációs mérést végeztek a tartály felületén. A helymeghatározás eredményét a lokalizáció hibájával jellemeztük és a Z pontszám segítségével értékeltük, melynek alapján mind az öt résztvevő eredményét megfelelőnek minősítettük.

BEVEZETÉS

A Magyar Roncsolásmentes Vizsgálati Szövetség 2011 nyarán meghirdette a negyedik körvizsgálatát, mesterséges forrásból származó hangimpulzus koordináták meghatározását akusztikus emisszióval. A körvizsgálat szervezésének megkezdése előtt nem sokkal lépett hatályba az ISO/IEC Guide 43-1:1997 jelű dokumentumot leváltó MSZ EN ISO/IEC 17043:2010 szabvány [1], amelyik egyértelművé tette a szóhasználatot is. Mivel a laboratóriumok közti összehasonlítást a MAROVISZ a lehető legkorszerűbb és nemzetközileg elismert módszerek szerint kívánja szervezni, ennek a szabványnak a követelményeit alkalmaztuk az akusztikus emisszió eredményeinek értékelése során. Az említett szabványnak megfelelően a következőkben az egyértelmű jártassági vizsgálat (proficiency testing) kifejezést fogjuk alkalmazni a körvizsgálat helyett.

A JÁRTASSÁGI VIZSGÁLAT BEMUTATÁSA

Vizsgálat koordinátora (ffucsok@maibox.hu), Magyar Roncsolásmentes Vizsgálati Szövetség Vizsgálat koordinátora, (janos.gereb@sensophone.hu), Geréb és Társa Műszaki Fejlesztő Kft.

A II. Akusztikus Emissziós Vizsgálatok Nyomástartó Edényeken című szimpózium előkészítése közben merült fel az ötlet, hogy a közösen végzett tartályvizsgálat eredményeit egy jártassági vizsgálat követelményeinek megfelelően kellene értékelni. Az akusztikus emissziós vizsgálat sok jellemzője közül nehéz volt olyan mérendő mennyiséget kiválasztani, melynek értékelése egyszerű és könnyen összehasonlítható. A szervezők, némi vita után, a gyakorlat számára fontos helymeghatározást választották az összehasonlítás tárgyának. Ennek nem elhanyagolható előnye, hogy a helymeghatározáshoz használt mesterséges hangforrások helyét ismerjük, és egyszerű hossz-méreléssel előre meghatározhatjuk koordinátáit. Így ismertek lesznek a vizsgálat valódi értékei, amit az új szabványnak megfelelően kijelölt értéknek (assigned value) nevezünk.

Fentiek alapján a jártassági vizsgálat tárgya a mesterséges forrásból származó hangimpulzus koordinátáinak meghatározása, és az akusztikus emissziós értékelés helymeghatározási pontosságának felmérése volt. E cél megvalósításához a résztvevők számára ismeretlen számú mesterséges akusztikus-emissziós jelforrást hoztunk létre egy tartály felületén. A mérés egyalkalmas feladat (single occasion exercise) körülményei között, azaz egyidejű, közös feladat egyszeri megoldásával volt teljesíthető.

A jártassági vizsgálat mérését a II. Akusztikus Emissziós Vizsgálatok Nyomástartó Edényeken című kétnapos szimpózium keretei között, 2011. október 18.-án rendeztük. A vizsgálat helyszíne a Dunaújvárosi Főiskola Magyar Akusztikai és Ipari Diagnosztikai Vizsgálólaboratóriuma volt, ahol az időjárás is kegyes volt a résztvevőkhöz, és kellemes őszi időben lehetett a méréseket előkészíteni és elvégezni.

A szimpóziumon a résztvevők egy 4,85 m³ űrtartalmú, 15,6 bar üzemi nyomású, cseppfolyós PB gáz tárolására használt, üzemből kivont tartályon végeztek nyomáspróbát, annak felszakadásáig. A nyomáspróbára a mérést végző csapatok a szokásos módon készültek fel, majd az elvégzett beállítások után a jártassági vizsgálat szervezői több

mint hatvan mesterséges akusztikus jelet hoztak létre a tartály felületén.

A jártassági vizsgálatban való részvétel nem volt korlátozva, magyarországi és külföldi érdeklődők is részt vehettek a mérésekben. Mint az 1.

táblázatból látható, a vizsgálatban öt laboratórium vett részt, és az előzetes jelzések ellenére, nem volt külföldi labor a jelentkezők között. A résztvevő laboratóriumok neve és székhelye a 1. táblázatban olvasható.

1. táblázat. A résztvevők felsorolása

Résztvevő neve	Székhelye
ÁEF Anyagvizsgáló Laboratórium Kft	1112 Budapest, Budaörsi út 45.
AETA Mérnökiroda Kft.	1118 Budapest, Háromszék utca. 32-34.
Dunaújvárosi Főiskola MAID Vizsgálólaboratórium	2401 Dunaújváros, Táncsics Mihály út. 1/A
R.U.M. Testing Kft.	1163 Budapest, Batsányi János út. 55.
TVK Műszaki Felügyelet Műszaki Vizsgáló Laboratórium	3581 Tiszaújváros, Pf. 20.

A szimpóziumot a Magyar Roncsolásmentes Vizsgálati Szövetség valamint a Dunaújvárosi Főiskola Magyar Akusztikai és Ipari Diagnosztikai Vizsgálólaboratóriuma szervezte, szponzorok aktív támogatásával. A jártassági vizsgálat nélkülözhetetlen

szponzora a Pébé-Coop Gázipari Fejlesztő, Forgalmazó és Gyártó Kft. (Hajdúszoboszló) volt, aki a vizsgálatához felhasznált tartály adományozta. A tartály fényképe, a felszerelt érzékelőkkel, az 1. ábrán látható.



1. ábra. A tartály a nyomáspróba előtt

A MÉRÉS VÉGREHAJTÁSA

Mint az 1. ábrán látható, a mérés kezdetén a vizsgálat résztvevői rögzítették érzékelő szondáikat a tartály letisztított négy felületén, és egy közösen használt mérőszalaggal ellenőrizték szondáik koordinátáit. Minden résztvevőnek lehetősége volt, hogy zajtalan tartályon ellenőrizze mérőrendszere megfelelő működését.

Az előkészületek után, és a tartály nyomáspróbája előtt, a jártassági vizsgálat szervezői mesterséges hangjeleket hoztak létre a tartály felületén. A mesterséges hangjeleket gerjesztett szondával és ceruzahegy-töréssel, véletlenszerű sorrendben, szabálytalan időközökben adták. Az impulzusok helye, száma és sorrendje a résztvevők számára ismeretlen volt. A jelek helyzetét a jeladás sorrendjében a rendezők rögzítették, ezeket tekintjük a körvizsgálat kijelölt (valós) értékeinek.

Mint később, az értékelés közben kiderült, a gerjesztett szondák közül az egyik csatolása nem volt megfelelő. A gerjesztett jelek közül néhányat, kis amplitúdóval, csak egy résztvevő tudta érzékelni, ezért ennek a szondának a jeleit törölni kellett az értékelendő adatok közül.

A résztvevőknek a lokalizált koordinátákat (x,y) , a mérés kezdetétől eltelt időt (s) , és a hozzá tartozó amplitúdót (dB) kellett rögzíteni, továbbá meg kellett adni néhány adatot a mérés körülményeiből is. Ezeket az adatokat a rendezők a mérés után egy hónapon belül várták.

AZ ÉRTÉKELÉS MÓDJA

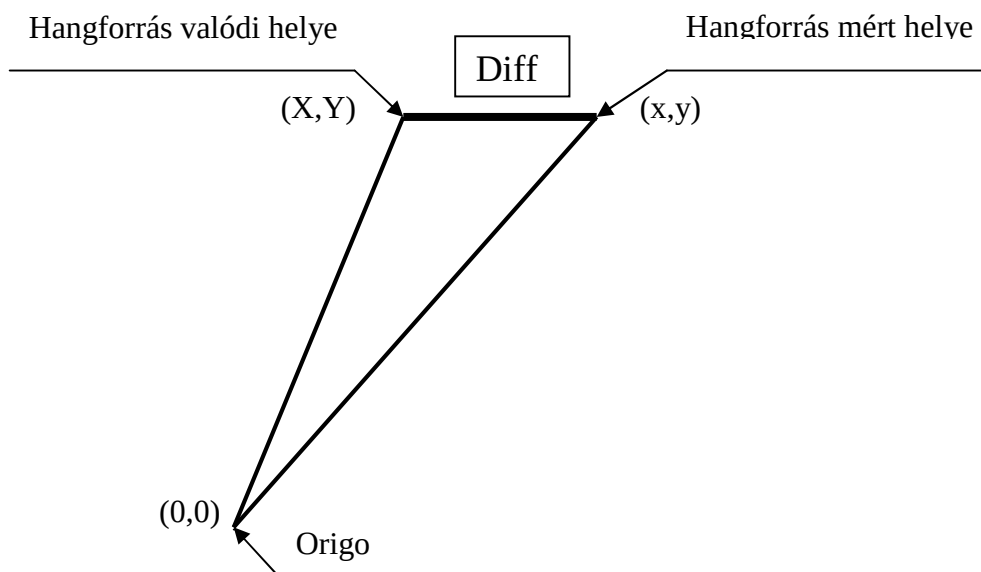
A helymeghatározás adatainak értékelését az említett szabvány [1] B mellékletében található ajánlásnak megfelelően, az eltérések számításával kezdtük. Kiszámítottuk azt a távolságot, aminek két végpontját a résztvevő mért koordinátái és a kijelölt érték koordinátái határoztak meg. Ez a távolság jellemzi a résztvevő helymeghatározási pontosságát. Az eltérés számítása az alábbi képlettel történt:

$$(Diff)^2 = (x - X)^2 + (y - Y)^2$$

ahol:

Diff = a koordináták által meghatározott pontok távolsága,
 x, y = a résztvevő által megadott koordináták,
 X, Y = az adat *kijelölt* (valós) értéke (meghatározását lásd később).

Az Diff jelű eltérés értelmezését a 2. ábra magyarázza.



2. ábra. Az eltérés értelmezése a koordináta rendszerben

A számított eltérésnek nincs általánosan elfogadott értékelési követelménye.

Az eltérések százalékos értékeit nem számítottuk ki, mert ennek értéke függ a bázis értékétől, ezért nem jellemző a mérés hibájára.

A szabvány B melléklet ajánlása szerint számszerű mérési eredmények értékelését a Z pontszám (Z score) alapján lehet végezni. A Z pontszám számítása:

$$Z = \frac{D}{S}$$

ahol:

D = az előző lépésben meghatározott, Diff -el jelölt eltérések átlaga,

S = a változékonyság mérőszáma.

Az értékelést az alábbi, általánosan elismert követelmények alapján végeztük:

$|Z| \leq 2$ megfelelő,

$2 < |Z| < 3$ kérdéses,

$|Z| \geq 3$ nem megfelelő.

Amikor a Z számra vonatkozó követelményt az összes, Diff -el jelölt lokalizáció eltérésre külön-külön alkalmaztuk, a nagyobb eltérések esetén a Z pontszám extrém értékeket (>20) vett fel. Ez az eredmény mutatta meg, hogy rosszul alkalmaztuk a Z pontszámot.

Az eredmények akkor lettek értelmezhetőek, amikor a Z pontszám meghatározásához az összes helymeghatározást egy mérési sorozatnak tekintettük. Ezt az értelmezést az indokolja, hogy a mérés elindulása után az akusztikus emissziós detektorok elhelyezésén, a csatolás minőségén, az AE berendezés érzékelési paraméterein nem lehet változtatni. Ezért résztvevőnként egy Z pontszámmal jellemezzük a vizsgálók teljesítményét.

Mivel a résztvevők mérési eredményeit egy mérésnek értelmeztük, a Z pontszám számlálójába az eltérésnek átlagát kell behelyettesíteni. A képlet nevezőjében szereplő változékonysági mérőszámot az MSZ EN ISO/IEC 17043:2010 szabvány [1] B függelékének B 3.1.3 pontja alapján, szakértői vélemény szerint, mint előírt értéket határoztuk meg.

Az előírt szórás értékét a körvizsgálat szakértői, a koordinátorokkal egyetértésben,

$$S = 30 \text{ mm}$$

értékben határozták meg. Az érték előírásánál figyelembe vett hatások:

- az általában használt detektorok átmérője,
- a detektorok rezonancia frekvenciája és a hangsebesség,
- a vizsgálattal szemben elvárt gyakorlati követelmények,
- a detektorok elrendezése és egymástól mért távolságuk,
- a vizsgálati darab geometriája.

A KIJELOLT ÉRTÉKEK

A definíció szerint [2] a *kijelölt érték* a jártassági vizsgálat próbatestének tulajdonított sajátos tulajdonság. Jártassági vizsgálatunknál ez a tulajdonság az akusztikus jeladó kijelölt helyének koordinátái. Ezt a tulajdonságot korábbi szóhasználat szerint valós értéknek, vagy valódi értéknek neveztük. A résztvevők eredményeit a kijelölt értékeknek tekintett, a mért koordináták által meghatározott ponthoz hasonlítottuk. A koordináták kijelölt értékeit a tartály palástjának szélén felvett kezdőponttól (origó), mérőszalaggal mértük meg. Ettől az origótól mérték a résztvevők a szenzorok koordinátáit is, ugyanazzal a mérőszalaggal.

Összesen 64 mesterséges impulzust kellett a résztvevőknek azonosítaniuk. Ezek közül 18 impulzus szondából indult, a többi ceruzahegy törésből. A pontszerűnek tekintett impulzusok helye ceruzahegy törés esetén a megadott pontban van. Hangimpulzusok adására használt gerjesztett szenzorok esetén a jeladás helyének a szenzor köralakú felületét tekintettük, melynek helyét a középpontja koordinátáival jellemeztük. A ceruzahegy törések helyei és a jeladó detektorok a tartályrepszítés vizsgálatára felszerelt szenzorok által kijelölt négyzetgöngön belül helyezkedtek el. A résztvevők utólag, az értékelést tartalmazó összefoglaló jelentésben, táblázatos formában, megkapták a jeladások kijelölt értékeit. A mérés indításától eltelt idő adatával kapcsoltuk össze a résztvevők koordináta adatát a jeladó adatával.

A RÉSZTVEVŐ LABORATÓRIUMOK VIZSGÁLATI EREDMÉNYEI

A résztvevők eredményeinek teljes ismertetésére itt nem érdemes kitérni, csak az összesített eredményeket ismertetjük. A kijelölt értékeket a résztvevők mért értékeivel a mérés indítása óta eltelt idő segítségével kötöttük össze. Azonban az összetartozó adatok kiválasztásához be kellett vezetni a korrigált idő adatát is. Ezeket az adatokat a résztvevő idő adataiból kisebb-nagyobb elcsúsztatással kaptuk, annak függvényében, hogy melyik mérőcsoport mekkora késéssel indította mérését. Az összetartozó adatok azonosításánál kiderült, hogy jelentős számú impulzust nem észleltek a berendezések. A hiányzó adatok feltüntetése az eredmények összehasonlíthatósága miatt van szükség. A hiány oka az, hogy a mérőberendezés az adott tesztimpulzust nem érzékelte, vagy érzékelte ugyan, de nem tudta lokalizálni.

A 2. táblázatban összefoglaltuk az elvégzett AE mérések lokalizálási teljesítményének jellemzőit. Az értékelés alapja a mesterséges impulzus valódi helye és számított helye közti különbség mm -ben kifejezett távolsága. A táblázatban láthatóak a résztvevők kódja

szerinti oszlopokban a különbségek minimális és maximális értékei, átlaga és szórása. A nincs adat sorokban látható továbbá, hogy hány hangimpulzust nem vett észre a mérőbe-
rendezés, és ez a 64 db impulzus hány százaléka.

2. táblázat. Az eltérések statisztikai jellemzői és Z értékei

Résztvevő kódja	4010	4020	4030	4050	4070
Minimum [mm]	0,8	1,4	9,9	1,4	1,0
Maximum [mm]	262,6	54,1	223,5	70,9	232,4
Átlag: D [mm]	26,7	16,5	67,9	35,6	13,2
Szórás [mm]	44,6	11,6	40,3	18,4	29,0
Nincs adat [db]	2	13	16	13	3
Nincs adat [%]	3,1	20,3	25	20,3	4,7
Z szám	0,89	0,55	2,26	1,19	0,44

Az adatok értékelése:

- Az egy mérésenként értékelt helymeghatározási feladatot a résztvevők jól teljesítették. A Z pontszám, egy kivétellel, megfelelő értékelést ért el, a kérdéses értékelésű 2,26 érték is az akusztikus emissziós mérés esetén elfogadhatónak mondható.
- Hangimpulzusok lokalizálásának elmulasztása a 2 – 3 darabtól a 16 impulzusig terjed. A legnagyobb adat az összes impulzus negyed részét jelenti, ami valós vizsgálati körülmények között még elfogadható érték.

A szervezők és értékelők szerint sikeres volt a körvizsgálat. A résztvevők teljesítették a követelményeket, többségében lokalizálták a mesterségesen keltett hangimpulzusokat. A lokalizálások pontosságát a Z pontszám követelményei alapján megfelelőnek értékeltük.

ÖSSZEFOGLALÁS

A meghirdetett akusztikus emissziós helymeghatározó jártassági vizsgálaton öt laboratórium vett részt. A lokalizációs feladat egyalkalmas jártassági vizsgálaton, egyidejű, közös feladat egyszeri megoldásával volt teljesíthető. A jártassági vizsgálat során 64 mesterséges hangjelzést kellett észlelni és lokalizálni egy tartály felületén. A mesterséges, jól definiált hangimpulzusok száma és elhelyezkedése ismeretlen volt a résztvevők előtt.

Az összes beküldött mérési eredmény értékelhető volt. A mérési adatok elemzése alapján kijelenthetjük, hogy a résztvevők a mérési feladatot megfelelően oldották meg.

HIVATKOZÁS

- [1] MSZ EN ISO/IEC 17043:2010
Megfelelőségértékelés. Jártassági vizsgálatok általános követelményei.
(ISO/IEC17043:2010)

MÉRFOLDKÖVEK

MILESTONES

175 ÉVE SZÜLETETT KARL HEINRICH ADOLF BERNHARD LEDEBUR, A „LEDEBURIT” NÉVADÓJA
ADOLF BERNHARD HEINRICH KARL LEDEBUR BORN 175 YEARS AGO, "LEDEBURIT" IS NAMED AFTER HIM

LECA MIHÁLY

Kulcsszavak: Ledeburit, életrajz, történelem

Keywords: Ledeburit, CV, history

Hazánk mintegy 69 felsőoktatási intézményében 2010-ben 361.347 hallgató tanult [1]. Ebből mintegy 80.000 volt az új belépő, amelynek 6-8%-a valamilyen mértékben kötődik a mérnöki, műszaki tudományokhoz, következésképpen az előadások valamelyik biztosan találkozik a „vas-acél” szavakkal az olyan tantárgyak körében, amelyekben az „anyagismeret a technológia” kifejezések megjelennek. A mérnökhallgatók, különösen a gépészmérnökök pedig az ilyen tantárgyakon keretében a „ledeburit” kifejezést biztosan megismerik. Ha napjaink legátfogóbb információforrására az INTERNET-re rákattintunk a LEDEBUR kifejezés begépelését követően, a találatok száma 119.000 0,15 sec alatt. a magyar nyelvű találatok száma zéró! Egyetemi tankönyveinket véletlenszerűen átnézvén a következő hivatkozások találhatók:

- Verő J., Káldor M.: Fémtan (Tankönyvkiadó, Budapest, 1977.) 148. old. „az austenit és a cementit eutektikuma a *ledeburit* (Ledeur-ról)”
- Gillemot L.: Anyagszerkezettan és anyagvizsgálat (Tankönyvkiadó, Budapest, 1967.) 111. old „Ezt mint szöveveletem Ledebur tiszteletére ledeburitnak nevezik”

De honnan is ered a „ledeburit” kifejezés? Lépjünk egy kicsit, néhány generációt vissza a történelemben! Mindig is voltak, vannak és lesznek az emberiség történetében olyan felfedezések, alkotások, amelyek gyökeresen átforgatják a gazdasági életet, a társadalmi kapcsolatok minőségét. Ilyen volt az 1770-es évek közepén a textilipar, amelynek egyik eredménye volt a munkásosztály megjelenése.

Ezt követte a gőzgép, amely többek között lehetővé tette a nagymennyiségű árú, és a nagyobb tömegek rendszeres mozgását mind a vasúti közlekedés, mind pedig a gőzhajtás megindulásával. A gőzgép világméretű

egyetemi hallgató, Debreceni Egyetem Műszaki Kar, TDK dolgozat (2011), Konzulens Tóth László egyetemi tanár

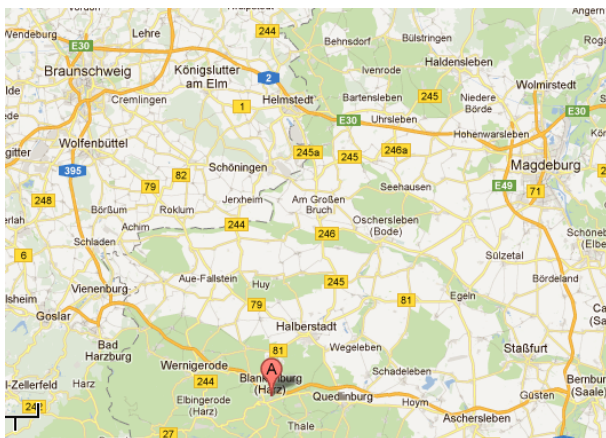
elterjedése volt a természettudományok, a mérnöki ismeretek robbanásszerű fejlődésének igazi hajtóereje. Ennek egyik ága, területe volt az anyagtudomány, hiszen ha csak a vasúti közlekedést tekintjük, akkor is a menetrendszerű közlekedés megindulását követően (1825. szeptember 27. Stockton és Darlington között) évente több mint 10.000 km hosszúságú vasútvonalat építettek a világon. Ez egy Budapest-Los Angeles távolság! Ennek eredménye, hogy a fémek relatív fontossága az ipari forradalom kezdetét jellemző 10%-ról, az 1950-es évek közepéig mintegy 70%-ra növekedett [2].

Mindez magával vonta a tömegszerűen megbízható minőséget biztosító acélgyártási eljárások bevezetését, és a független anyagminősítő szervezetek megjelenését az 1850-es évek közepétől kezdődően. [3]. Ebben az ipari környezetben természetszerűen megjelentek azon kiváló szakemberek, akiknek nagyon sokat köszönhet az egyetemes kultúrtörténet mellett a gazdasági élet.

Ezek egyike volt Adolf LEDEBUR is, aki 1837. Január 11.-én született a németországi Blankenburgban, a Braunschweig hercegségben. A ma mintegy 22 000 lakosú helység egyaránt kb. 70-km-re fekszik Magdeburgtól és Braunschweigtől (1. ábra). Apja, Georg Wilhelm Christian Ledebur Blankenburg postamestere volt, viszonylag korán, 1854-ben elhalálozott. A biztos anyagi háttér hiánya komoly problémát jelentett az ifjú Ledebur tanulmányainak folytatásában. Privát tanulmányokat folytatott matematikából, természettudományokból és rajzból. Az első másfél évet gyakorlati képzéssel töltötte Zorge városában, egy Harz megyei állami kohászati üzemben. Mindennapi munkája mellett, tanulta ki a gyakorlati vasöntést. Az 1856-1858 közötti éveket az 1745-ben alapított Braunschweig-i Carolinum kollégiumban, a későbbi Technológiai Intézetben tanult (2. ábra).

Amellett, hogy a kohászatot tanulta folyamatosan látogatta Prof. Dr. Otto kémia gyakorlatait és előadásait. Szabadidejét szívesen szentelte kísérleti laboratóriumi munkákra,

melynek későbbi felfedezéseit is köszönheti, ugyanis itt első kézből kapott olyan kísérleti utasításokat, amin tudományos munkája is alapult.



1. ábra. Balneburg, Németország

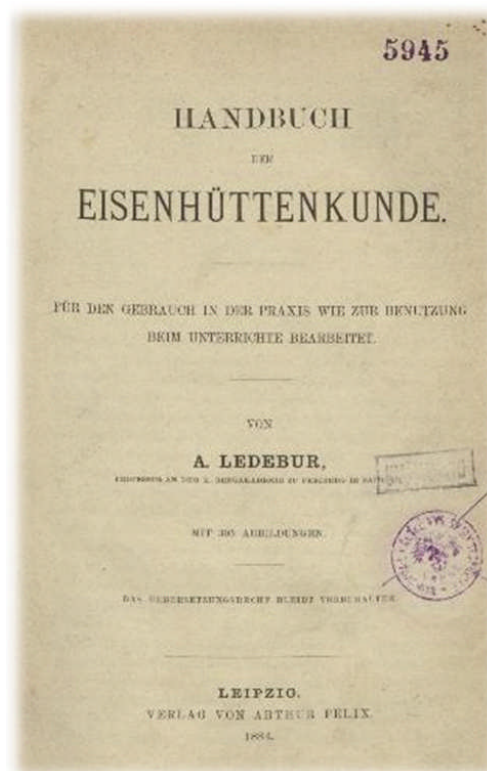


2. ábra Braunschweig-i Technológiai intézet (Technische Universität) [4]

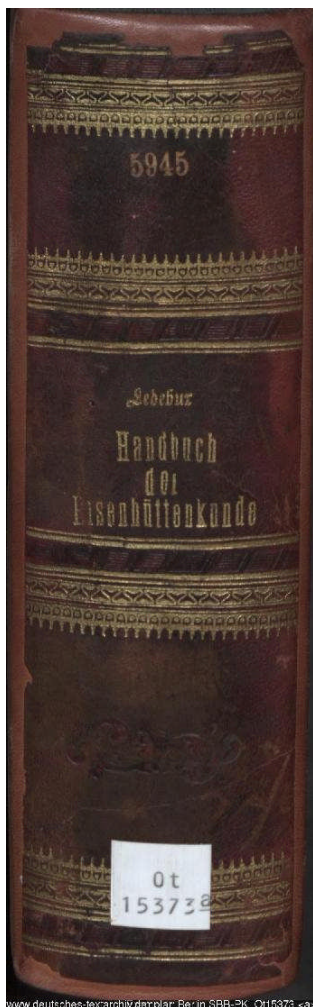
A főiskolai tanulmányainak befejeztével 1858 októberében újra Zorge városában találja Ledeburt, majd a Blankenburg-tól alig 15 km-re levő Rübelndba megy és 1862-ben államvizsgázik. Vizsgamunkája. „Anlage eines Puddelwerkes mit Zubehör zur Anfertigung von allen Sorten Stabeisen, Rudneisen, fassionirten Eisen, Schneideisen, Wagenachsen u. dergl. im Tale der Bode von Rübeland bis Treseburg” [5]. Az Ilsenburgi Grófi Vasmű (Gräfllich Wernigeroder Eisenhütte zu Ilsenburg) állami alkalmazottjaként a nagyolvasztó és az öntőde üzemeltetésében vesz részt. Hét év kitartó munka után, 1869 közepén a Berlinben üzemelő Schwartkoffschen Werke Öntődei üzemét veszi át annak vezetőjeként. De az öröm nem tarthatott sokáig a számára a kellemetlen feltételek és konfliktusok miatt két év után kénytelen feladni állását. 1871 tavaszán Hochofen- und Gießereibetrieb der Gräfllich

Eisiedelschen Werke Gröditz-ben foglalkodik. Szorgalma és kitartása nyomán rövid idő múlva „Koházmester” (Hüttenmeister) lesz, ezt a feladatát nagy odaadással végzi, egészen addig, míg ki nem nevezik Freiberg-i felsőoktatási intézetbe. Idejövételét nagyban segítette az, hogy termodinamika területén igen jelentős eredményeket ért, Chemnitz-i születésű, nála 9 évvel idősebb Gustav Zeuner (nevét utca őrzi Freibergben az egyetemi körzetben) is felfigyelt Ledebur korábbi munkáira. Az 1874. december 1.-i ideiglenes kinevezést az 1875. március 31.-i véglegesítés, a mai értelemben vett közalkalmazotti véglegesítés követte. A Bergakademie Freiberg kohászati laboratóriumának átvételével. Rendkívüli szakírói tevékenységet folytatott, hiszen a 155 cikk mellett 13 monográfiát írt, amelyek 35 kiadást értek meg különböző; német, francia (4 könyv), orosz, japán nyelveken.

A Handbuch der Eisenhüttenkunde 3. ábrán látható címlappal pl. legalább öt német kiadást ért meg 1884-1908 között miközben a két francia nyelvű változat mellett orosz és japán kiadást is megért.



3. ábra Handbuch der Eisenhüttenkunde (1884)



4. ábra. A több, mint 1000 oldal terjedelmű Handbuch der Eisenhüttenkunde c. kilenc kiadást megélt könyv.

A könyv az adott kor ismereteit igen részletesen foglalja össze, hiszen terjedelme több mint 1000 oldal. Ezt tanúsítják a tartalomjegyzék első és utolsó oldalai (5. ábra).

Oktatói tevékenységének intenzitását jellemezheti az is, hogy az 1877-1905 intervallumban végzetek közül mintegy 100 hallgató diplomamunkáját vezette. Nyelvismeretét pedig meggyőzően igazolhatja, hogy e hallgatók közül mintegy fele külföldről jött Freibergbe.

Ledebur volt az elő választott rektora a Bergakademie-nek 1899-1901 között. Korábban igazgatók irányították az intézményt (ezek egyike volt a már hivatkozott GUSTAV Zeuner). Az 1903-1905-ös periódusra pedig újraválasztották. Rektori tevékenységének egyik eredménye volt a „Doktor Ingenieur”, valamint a „Diplom-Ingenieur” fokozatok odaítélési jogának megszerzése az általa vezetett intézmény számára.

Inhaltsverzeichnis.	
Erste Abtheilung.	
Einführung in die Eisenhüttenkunde.	
I. Eintheilung des Handelseisens, Historisches und Statistisches . . .	Seite 3
Eintheilung 3. Historisches 6. Statistisches 9.	
Literatur	10
II. Ueber Verbrennung, Reduction, Wärmeerzeugung und Wärmeabgabe . . .	10
1. Verbrennung und Reduction	10
2. Vollständige und unvollständige Verbrennung	15
3. Wärmeerzeugung und Verbrennungstemperatur	19
a. Wärmeerzeugung 19. b. Verbrennungstemperatur 23.	
4. Wärmeabgabe	25
Literatur	27
III. Die Brennstoffe	27
1. Das Holz	27
2. Die Holzkohle	29
a. Verkohlung in Meilern 30. b. Verkohlung in Öfen 32. c. Verkohlung in Retorten 33.	
Eigenschaften der Holzkohle	34
3. Der Torf	35
4. Die Turfkohle	37
a. Meilerverkohlung 37. b. Ofenverkohlung 38. c. Retortenverkohlung	
Inhaltsverzeichnis.	
XIII	
2. Die Verarbeitung des Schweisseisens	Seite 957
Allgemeines	957
Die Schweissfeuer und Schweissöfen	960
a. Die Schweissfeuer und ihr Betrieb 960. b. Die Schweissöfen und ihr Betrieb 961.	
Beispiele der Verarbeitung des Schweisseisens	969
Darstellung des Gärstahles 969; des Grobeisens 971; des Feineisens und Walzdrahtes 971; Winkelseisens 973; Einfach- und Doppelt-T-Eisen 973; Blech 974.	
3. Die Verarbeitung des Flusseisens	976
Allgemeines	976
Die Wärmöfen und Heizgruben	978
Beispiele (Eisenbahnschienen)	984
4. Die Maschinen zur Zertheilung der Arbeitsstücke	995
Hobelscheeren	995
Parallelscheeren	997
Kreisscheeren	999
Kreissägen	1000
Literatur	1002

5. ábra. A több mint 1000 oldal terjedelmű Handbuch der Eisenhüttenkunde c. első kiadásának tartalomjegyzékének részlete

Munkásságával kivívta az „Iron and Steel Institute” (London) és az „Americal Foundrymen Association” (New York) tiszteletbeli tagságát 1902-ben, ill. 1903-ban. A japán kohászat fejlődését is nagyban segítette tanácsadói tevékenységével. Ezt oklevéllel ismeret el maga a japán császár is.

Freibergben hunyt el 1905 június 7.-én. Emlékét Freibergben számos létesítmény, esemény, objektum őrzi. Így többek között a Bergakademi egyik épületét neveztek el róla (6. ábra).

A Bergakademi Freiberg 2011-ben immáron 21. alkalommal szervezte meg a Ledebur-Kolloquium-ot (október 27-28), ill. 2012 június 15.-én a Berg- und Hüttenmännischen Tageskeretében az Agricola-Kolloquimok keretében június 15.-én fog megemlékezni első választott rektorának 175. születésnapjáról.



6. ábra. LEDEBUR utca Freibergben [8]

Ugyancsak nevét őrzi Freibergben egy utca is (7. ábra).



7. ábra A Ledebur épület Freibergben [7]

Nevét örökkön őrző Fe-Fe₃C eutektikumot, a „ledeburit” kifejezéssel illetve Fritz WÜRST, az Acheni Egyetem professzorának javaslatára fogadta el a szakmai közvélemény 1909-ben. Ez a név honosodott meg meglehetősen rövid idő alatt a hazai szakmai körökben is [6].

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Gyorsjelentés a 2010/2011 tanév felsőoktatási előzetes statisztikai adataiból.
http://www.nefmi.gov.hu/letolt/statisztika/statgyorstaj_felsoo_101210.pdf

- [2] Prohászka J., Tóth L.: Anyagtudomány, mint műszaki tudomány. Kohászat. Bányászati és Kohászati Lapok. 1997/10-12. p. 336-342.
- [3] Tóth L., H. P. Rossmanith: A törésmechanika és az anyagvizsgálat története. Miskolci Egyetem, 1999. 163 p.
<http://mek.oszk.hu/01100/01191/>
- [4] <http://altstadt-antiquariat.antiquariatsportal.de/>
- [5] H.J. Spies: Adolf Ledebur. Zum 100. Todestag des altmeisters der Eisenhutenkunde. Zeitschrift für Freunde und Förderer der TU Bergakademie Freiberg, 13/2006. p. 54-59.
- [6] Schleicher Aladár: A metallográfia alapfogalmai. Országos Magyar Bányászati és Kohászati Egyesület, Budapest, 1917. (a könyv részleteiben megjelent a Bányászati és Kohászati Lapok 1915 48 évf/2. kötetében, az 1916. 49. évf/1. kötetében és az 1917. 50. évf/2. kötetében folytatólagosan)
- [7] <http://www.iest.tu-freiberg.de>
- [8] <http://www.ledebur.de/>