

Elektromos térre érzékeny folyadékok és elasztomerek I.

FEHÉR József, SZILÁGYI András, VARGA Zsolt, FILIPCSEI Genovéva és ZRÍNYI Miklós*

MTA-BME Lágyműanyagok Laboratóriuma, Budafoki út 8. 1111. Budapest, Hungary

1. Bevezetés

Az utóbbi évtizedben a számítástechnika és az anyagtudomány egyaránt látványos fejlődésen ment keresztül. Mindkét területen az információáramlás fontosságának felismerése hozta az áttörést. Kézenfekvőnek tűnik olyan anyagok kifejlesztése, amelyek a számítógéptől kapott információt „megértik”, majd tulajdonságaikat ennek megfelelően változtatják. A számítógéppel befolyásolható anyagi tulajdonságoknak határt szab az a kapcsolat, amit a számítógép és az anyag között létesíthetünk. Ezt az áttételt csak olyan hatások biztosíthatják, amelyek indukálásának és megszüntetésének sebessége összemérhető vagy nagyobb a vezérlés, valamint az anyagi tulajdonság változásának sebességénél. Szabályozástechnikai szempontból elektromos vagy mágneses tér alkalmazása tűnik a legkedvezőbbnek. Ezeket a tereket ugyanis számítógéppel vezérelt elektronikával pillanatszerűen kelthetjük, változtathatjuk és megszüntethetjük. Az intelligens anyagok megjelenése lehetőséget kínált a térerővel történő (érintkezésmentes) irányítás alkalmazására. Intelligens anyagoknak azokat a multifunkcionális anyagokat nevezzük, amelyek közvetlen környezetük fizikai, vagy kémiai állapotának egy vagy több jellemzőjét érzékelik, e jelzéseket feldolgozzák, majd pedig ezekre, állapotuk jelentős megváltoztatásával, gyors és egyértelmű választ adnak^{1,2}.

A feladat szempontjából az intelligens anyagokat két nagy csoportra oszthatjuk. Az egyik csoportba tartoznak azok az anyagok, amelyek a természetes környezet változásaira (hőmérséklet, kémiai környezet, mechanikai hatás, fény stb.) reagálnak. A másik csoportba pedig azok, amelyek a változásukhoz szükséges információt a számítógépből elektronikus jel formájában kapják.

Az anyagi tulajdonságok számítógéppel történő befolyásolásához elektromos és/vagy mágneses térre érzékeny anyagok szükségesek. Az elektromos és a mágneses tér hatása általában néhány fémre erős, polimerekre és folyadékokra többnyire gyenge. Az egyre dinamikusabban fejlődő világunkban azonban a műanyagok, a polimerek, az elasztomerek és a kompozit anyagok a fémek felhasználását egyre nagyobb mértékben kiszorítják.

Önként adódik a kérdés, hogy hogyan lehetne a folyadékokat és/vagy a polimereket az említett terekre érzékennyé tenni. Ennek egy lehetséges módja: ötvözzük a szilárd és a folyadék halmazállapot tulajdonságait, olyan elasztomer előállításával, amelynek polimer mátrixa térre érzékeny és egyenletesen eloszlalt részecskéket tartalmaz. Az elasztomer duzzasztófolyadék egy elektroeológiai (ER) vagy magnetoeológiai (MR) folyadék lehet, mely mikro- vagy nanoméretű, térre érzékeny részecskéket tartalmaz homogén eloszlásban. Külső tér nélkül a folyadékokra jellemző tulajdonságokat mutatnak, azonban

elektromos vagy mágneses térbe helyezve a folyadék folyási tulajdonságai jelentős mértékben megváltoznak. Homogén térben a tér irányába mutató láncszerű aggregátumokat képeznek, inhomogén térben pedig a részecskék a nagyobb térerő irányába elmozdulnak.

A polimer térhálóba zárt részecskék elmozdulása nem lehetséges, így a polarizált részecskékre ható, a nagyobb térerősség-gradiens irányába mutató erők érvényesülhetnek és az elasztomer vázát alkotó polimer molekulákra hatva, az elasztomer alakváltozását idézik elő. Alkalmasan megválasztott tér segítségével nyújthatók, hajlíthatók, forgathatók és összehúzhatók. Az alakváltozás jelentős mértékű és igen gyors lehet. Az elemi mozgások mindegyike könnyedén megvalósítható. Dinamikusan változó térben az elasztomer alakja periodikusan változik. Ez lehetővé teszi olyan új típusú gépek konstruálását, amelyek nem tartalmaznak súrlódásnak kitett alkatrészeket, új utat nyitva ezzel a lágy robottechnika vagy a lágy műszaki szerkezetek (például lágy és nedves dugattyúk, hengerek és szelepek) kifejlesztésére.

smert permittivitású gömb alakú nanorészecskével elektromos térben. Sajnos a valóságos esetekben, amikor számtalan részecske van szuszpendálva egy szigetelő folyadékban, nem könnyű előre megjósolni, hogy elektromos tér hatására milyen folyamatok játszódnak le a rendszerben, hiszen a részecskék sokféle alakúak és méretűek lehetnek; ezen kívül a részecskék a rájuk ható elektromos mezőt is torzíthatják.

2. Az elektromos mező hatása az anyagra

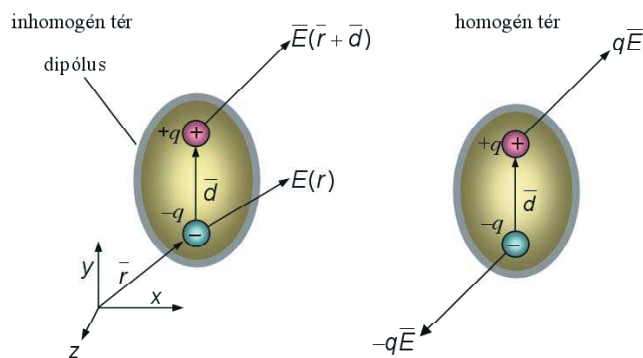
Ha az elektromos mező és az anyag kölcsönhatását vizsgáljuk, a próbatétel méretének csökkentésével egyre nehezebb a megfigyelhető jelenségek értelmezése. Az anyagtudományi alapproblémája, hogy a mikroszkopikus és a makroszkopikus törvényszerűségek között nem vonható egyértelmű párhuzam. A következőkben az időben állandó elektromos tér és a kolloid, vagy közel kolloid méretű részecskék közötti kölcsönhatással foglalkozunk.

Először nézzük meg, hogy mi történik, ha egyetlen részecskét teszünk ki az elektromos mező hatásának. Ha a részecskének van töltése, akkor igyekszik az ellentétes pólus felé elmozdulni. Ezt a jelenséget elektroforézisnek nevezzük.

Bonyolultabb a helyzet, ha a részecskének nincs töltése. Ekkor két eset lehetséges: a részecskének van eredő dipólusmomentuma, vagy a mező hatására a részecskében töltésszétválás következik be, indukált dipólus keletkezik.

*Zrínyi Miklós, Tel.: +36-1-463-2119; Fax.: +36-1-463-3767; e-mail: zrinnyi@mail.bme.hu

A kérdés, tehát a következő, mi történik egyetlen elemi fizikai dipólussal, ha elektromos térbe helyezzük? Legyen a dipólusban két ellentétes $-q$ és $+q$, egymástól d távolságra E térerősségű elektromos térben az 1. ábrának megfelelően, ahol r a $-q$ töltés helyvektora. Jelenleg semmit sem mondunk arról, hogy hogyan jött létre a tér, mindössze annyi kikötést teszünk, hogy a dipólus nem torzítja az elektromos mezőt.



1. Ábra. Az elemi dipólus inhomogén illetve homogén elektromos mezőben

Ha a mező inhomogén, akkor valószínű, hogy a $+q$ és $-q$ töltéseknél a térerősség különböző értékű, melynek eredményeként a dipólusra ható nettó erő (F) nem zérus:

$$\vec{F} = q\vec{E}(\vec{r} + \vec{d}) - q\vec{E}(\vec{r}) \quad (1)$$

Az 1-es egyenlet egyszerűsíthető, ha $|\vec{d}|$ értéke a mező inhomogenitásának jellemző dimenziójához viszonyítva kicsi. Ekkor az E térerősség vektort közelíthetjük vektoriális Taylor sorával:

$$\vec{E}(\vec{r} + \vec{d}) = \vec{E}(\vec{r}) + \vec{d} \nabla \vec{E}(\vec{r}) + \frac{1}{2} \vec{d} \vec{d}^T \nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + \dots \quad (2)$$

Ha a másodfokútól kezdődő tagokat elhanyagoljuk, az 1-es és a 2-es egyenlet összevonásával a következő egyszerű egyenlethez jutunk:

$$\vec{F} = q\vec{d} \nabla \vec{E}(\vec{r}) \quad (3)$$

Ha $|\vec{d}|$ úgy tart a nullához, hogy a $\vec{p} = q\vec{d}$ dipólusmomentum egy véges érték marad, akkor az infinitesimalisan kicsi elemi dipólusra ható erőt kapjuk eredményként:

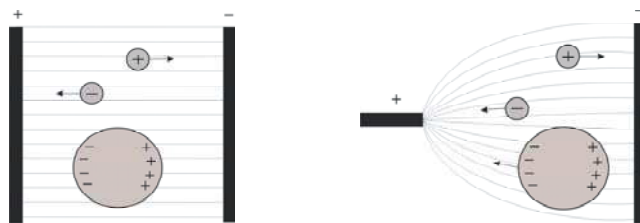
$$\vec{F}_{\text{dip}} = \vec{p} \nabla \vec{E} \quad (4)$$

A 4-es egyenletből kiolvashatjuk, hogy inhomogén elektromos térben egy elemi dipólusra olyan erő hat, amely a dipólust translációs mozgásra kényszeríti a nagyobb térerősség irányába, vagyis dielektroforézis következik be. A 4. egyenlet valójában az elemi dipólusra ható erő közelítése, mivel a dipólus véges méretű. Ez az úgynevezett dielektroforetikus közelítés, általában adekvát becslést jelent a dielektroforetikus erőre, hiszen a gyakorlatban az elektródok mérete jóval nagyobb, mint a részecskék mérete, ami azt jelenti, hogy a részecskeméret sokkal kisebb léptékű skálán mozog, mint a mező inhomogenitása. Másrészt viszont a dielektroforetikus közelítés gyakran szignifikáns hibához vezet, ha az elektromos mező inhomogenitása összemérhető a részecskék méretével³. Ebben az esetben, ugyanis a 2-es egyenletben szereplő nagyobb hatványkitevős tagokat is figyelembe kell venni.

Homogén elektromos mezőben az elemi dipólusra forgatómomentum hat, amely igyekszik a dipólust a tér irányába elfordítani. Ez az erő (T) két részből tevődik össze:

$$\vec{T} = \frac{\vec{d}}{2} q \vec{E} + \frac{-\vec{d}}{2} (-q \vec{E}) = q \vec{d} \vec{E} = \vec{p} \vec{E} \quad (5)$$

Vegyük észre, hogy az elemi dipólusra homogén elektromos térben ható forgató erő csak a térerősség vektortól függ, nem annak gradienstől. Ezen erő fellépésének egyetlen feltétele, hogy a $\vec{p}$ dipólus-momentum vektor ne legyen párhuzamos a térerősséggel. Tehát a fenti egyenlet jó közelítéssel használható inhomogén térben is, amíg a részecskék kicsik az elektromos mező inhomogenitásának léptékéhez képest. Az elektroforézis és a dielektroforézis jelenségét összehasonlítva azt a lényeges különbséget állapíthatjuk meg, hogy az elektroforézis az elektromos térerősség vektortól, a dielektroforézis pedig a térerősség vektor gradienstől⁴ függ (2. ábra). Másik fontos eltérés, hogy a dielektroforézishez inhomogén elektromos mezőre van szükség, az elektroforézis pedig homogén térben is megfigyelhető.



2. Ábra. A bal oldali ábrán az elektroforézis, a jobb oldali ábrán a dielektroforézis sematikus ábrája látható

A 4-es és 5-ös egyenletek semmit sem mondanak q dipólusmomentum vektor természetéről, pedig tudjuk, hogy ez a vektormennyiség lehet permanens és lehet, hogy az elektromos mező indukálta létrejöttét. Elsősorban az utóbbi esettel foglalkozunk, mivel nanorészecskéknél általában ez a gyakoribb. A következő feladat ilyenformán az effektív dipólusmomentum meghatározása egy permanens dipólussal nem rendelkező nanorészecskére. Képzeljünk el egy gömb alakú nem vezető nanorészecskét egy szigetelő folyadékban, például szilikonolajban, amelyet homogén elektromos tér hatásának teszünk ki. Az elektromos tér polarizálja a részecskét, azaz dipólusmomentumot indukál benne. Az effektív dipólusmomentum vektor, $\vec{p}_{\text{eff}}$ párhuzamos lesz az őt létrehozó mezővel, és képzeletben helyettesíthető egy olyan valódi dipólussal, amely ugyanazzal a dipoláris elektrostatikus potenciállal ($\Phi_{\text{dipólus}}$) rendelkezik:

$$\Phi_{\text{dipólus}} = \frac{p_{\text{eff}} \cos \Theta}{4\pi \epsilon_1 r^2} \quad (6)$$

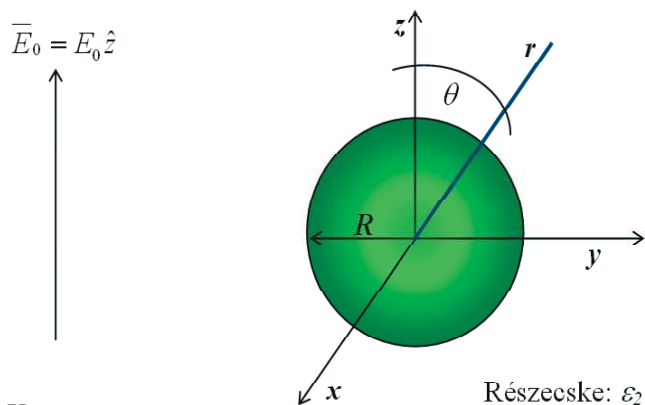
ahol ϵ_1 közeg permittivitása, r és Θ a polárkoordináták. Legyen a részecske sugara R , ϵ_2 a permittivitása, E_0 a tér erőssége a 3. ábrának megfelelően.

Tételezzük fel, hogy a közegben nincs jelen szabad töltés, és a részecske nem torzítja az elektromos teret. A részecskén belüli és kívüli potenciálra a következő egyenleteket írhatjuk fel³:

$$\Phi_1(r, \Theta) = -E_0 r \cos \Theta + \frac{A \cos \Theta}{r^2}, \quad r < R \quad (7)$$

$$\Phi_2(r, \Theta) = -Br \cos \Theta, r > R \quad (8)$$

ahol A és B a határfeltételektől függő állandók.



Közeg: ϵ_1

Részecske: ϵ_2

3. Ábra. Gömb alakú szigetelő részecske homogén elektromos térben

Mivel a részecske és a közeg határfelületén (is) a potenciálnak, és az elektromos eltolás vektor normális komponensének folytonosnak kell lennie, a határfeltételek a következők lesznek:

$$\Phi_1(r=R, \Theta) = \Phi_2(r=R, \Theta) \quad (9)$$

$$\epsilon_1 E_{r1}(r=R, \Theta) = \epsilon_2 E_{r2}(r=R, \Theta) \quad (10)$$

ahol $E_{r1} = -\partial\Phi_1/\partial r$ és $E_{r2} = -\partial\Phi_2/\partial r$ az elektromos tér normális komponensei a részecskében és a folyadékban. A határfeltételek felhasználásával:

$$A = \frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} R^3 E_0 \quad \text{és} \quad B = \frac{3\epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} E_0 \quad (11)$$

Tehát gömb alakú részecskére homogén elektromos térben az effektív dipólus momentum a következő egyenlettel adható meg:

$$\vec{p}_{\text{eff}} = 4\pi\epsilon_1 K R^3 E_0 \quad (12)$$

ahol K Clausius-Mosotti függvény.

A Clausius-Mosotti (K) függvény értéke adja meg, hogy milyen mértékben és irányban polarizálható egy ϵ_1 permittivitású részecske ϵ_2 permittivitású fluidumban:

$$K(\epsilon_1, \epsilon_2) = \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} \quad (13)$$

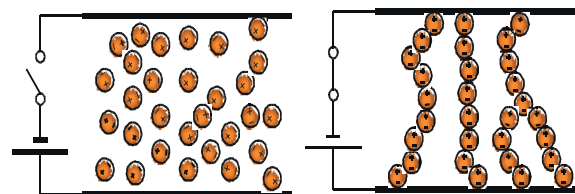
Ha $\epsilon_2 > \epsilon_1$, akkor $K > 0$ és az effektív dipólusmomentum vektor ($\vec{p}_{\text{eff}}$) azonos irányú az elektromos térerősség vektorral ($\vec{E}_0$), ha $\epsilon_2 < \epsilon_1$, akkor $K < 0$ és $\vec{p}_{\text{eff}}$ és $\vec{E}_0$ ellentétes irányú. Fontos még megjegyezni, hogy $-0,5 \leq K \leq 1$, tehát hiába növeljük a részecske és a közeg permittivitásának különbségét, ha az effektív dipólusmomentum értéke korlátozott.

Ideális esetben tehát meg tudjuk mondani, hogy mi történik egy ismert permittivitású gömb alakú nanorészecskével elektromos térben. Sajnos a valóságos esetekben, amikor számtalan részecske van szuszpendálva egy szigetelő folyadékban, nem könnyű előre megjósolni, hogy elektromos tér hatására milyen folyamatok játszódnak le a rendszerben, hiszen a részecskék sokféle alakúak és méretűek lehetnek; ezen kívül a részecskék a rájuk ható elektromos mezőt is torzíthatják.

3. Elektroreológiai (ER) folyadékok

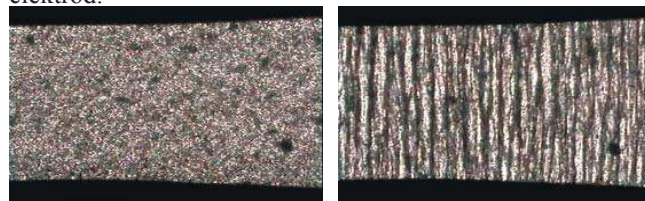
Az ER folyadékok többnyire olyan diszperziók, amelyek szigetelő folyadékban diszpergált szigetelő vagy félvezető részecskékből állnak. Az ER aktivitás nő a folyadék és a részecskék permittivitásának különbségével. Minél nagyobb ez a különbség, annál nagyobb aktivitásra számíthatunk^{5,6}.

Az ER folyadékok egyik fő ismérése, hogy statikus körülmények mellett nagyfeszültségű elektromos térben az elektródok között szálasodás figyelhető meg bennük, ami az elektromos polarizáció következménye. Erős elektromos tér hatására a részecskékben töltésszétválás következik be, polarizált dipólusok alakulnak ki, vagy az állandó dipólusmomentummal rendelkező részecskék a tér irányának megfelelően elfordulnak. A dipólusok egymás közötti, és a dipólusok és a tér közötti kölcsönhatás eredményeként láncok, szálak jöhetnek létre. A 4. ábrán ER folyadékból elektromos tér hatására kialakuló szálak, láncok sematikus ábrázolása látható. Az ábra bal oldala a tér nélküli rendezetlen állapotot mutatja, míg a jobb oldali kép a tér hatására kialakult rendezett szerkezetet szemlélteti.



4. Ábra. Nagyfeszültségű elektromos tér hatására az ER folyadékból kialakuló láncok sematikus ábrázolása

A szálasodás bizonyítja, és megfigyelhetővé teszi az elektroreológiai aktivitást. Az 5. ábrán 12 m/m%-os anatóz (TiO_2) diszperzió szálasodása látható. A bal oldali képen elektromos tér nélkül, illetve a jobb oldali képen elektromos tér ($E=6 \text{ kV/cm}$) jelenlétében. Az elektromos térben optikai mikroszkóppal készített felvételeken a képek alsó és felső részén látható fekete sáv a tárgylemezen elhelyezett nikkel elektród.

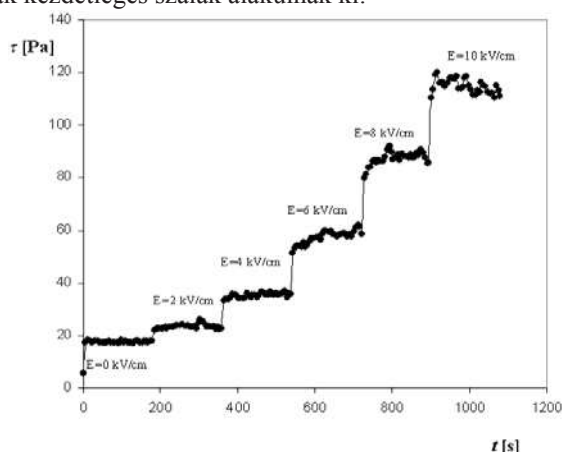


5. Ábra. Anatóz szilikon olaj közegű diszperziójának mikroszkópikus képe elektromos tér nélkül (bal oldal), illetve a jobb oldali képen elektromos tér ($E=6 \text{ kV/cm}$) jelenlétében

A szálasodás jelensége elektroreológiai módszerrel is tanulmányozható. E módszer segítségével az ER folyadék nyírófeszültségének változását követhetjük különböző erősségű elektromos teret alkalmazva. A 6. ábrán 20 m/m%-os anatóz diszperzió nyírófeszültségének változása látható az idő függvényében, lépcsősen növekvő térerősség során, $5 \frac{1}{s}$ nyírósebességet alkalmazva.

Az elektromos térerősséget növelve az ER folyadék nyírófeszültsége jelentősen megnő, mely az elektromos tér hatására kialakult szálaknak köszönhető. 10 kV/cm feszültséget alkalmazva közel hétszer nagyobb nyírófeszültséget kell alkalmazni a kialakult szerkezet

megbontására, mint 2 kV/cm elektromos térben, ahol még csak kezdetleges szálak alakulnak ki.



6. Ábra. 20 m/m%-os anatóz diszperzió nyírófeszültség változása az időben, a térerősségnek 180 másodpercenként, 2 kV/cm-rel történő, lépcsős megváltoztatása során

4. Elektromos térre érzékeny elasztomerek alakváltozásának vezérlése

Elektromos térre érzékeny elasztomereket elektorreológiai folyadékok felhasználásával állíthatunk elő. Ahhoz, hogy ezen elasztomerek fizikai kémiai tulajdonságait jellemezzük és megértsük elengedhetetlen az elektromos mező és a térre érzékeny részecske kölcsönhatásának ismerete.

Az elektorreológiai hatást felhasználva elektromos térre érzékeny poli(dimetil-sziloxán) gélek állíthatók elő^{7,8}. A polimer térhálóba beágyazott anatóz részecskék külső elektromos tér hatására polarizálódnak és a nagyobb térérő irányába mozdulnának el, azonban a térháló megakadályozza a részecskék mozgását. E két ellentétes hatás eredményeként a külső szemlélő az elasztomer alakváltozását érzékeli. A 7. ábrán egy henger alakú elasztomer egyenáramú elektromos térben történő alakváltozása látható.



7. Ábra. Anatóz töltőanyagot tartalmazó elasztomer alakváltozása inhomogén, egyenáramú elektromos térben

A 7. ábrán látható viselkedés megfelel a várakozásoknak, hiszen a gömb alakú elektród felé haladva az elektromos tér inhomogenitása nő, tehát a dielektroforetikus erők a gömb felé mutatnak. Az elasztomer felső részének elmozdulását a gravitáció segíti, míg az alsó rész hajlását gátolja. Ha a részecskékre ható dielektroforetikus erő hatása dominál, akkor a részecskék igyekeznek a Clausius-Mossotti függvénynek megfelelően, a nagyobb inhomogenitás irányába elmozdulni. A dielektroforetikus erő átvődik a polimer vázra és makroszkopikus mozgást eredményez⁹.

Az elektromos térre érzékeny elasztomerek analógiájára mágneses térre érzékeny elasztomerek is előállíthatók. Ezekről következő közleményünkben számolunk be.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki az OTKA T038228 és F046461, a GVOP-3.2.2.-2004-07-0006/3.0, valamint az NKFP 3/043/2001 szám alatt nyilvántartott támogatásaiért.

Hivatkozások

1. Gandhi, M. V.; Thompson, B. S. *Smart Materials and Structures*, Chapman & Hall: New York, **1992**.
2. Zrínyi, M. *Magyar Tudomány* **1999**, 6, 697-703.
3. Pohl H. A. *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press: Cambridge, **1978**.
4. Jones T. B. *Electromechanics of Particles*, Cambridge University Press: New York, **1995**.
5. Nakano M.; Koyama K., Eds.; *Electro-Rheological Fluids, Magneto-Rheological Suspensions and Their Applications*, World Scientific Publishing: Singapore, **1997**.
6. Thao R.; Roy G. D., Eds.; *Electrorheological Fluids*, World Scientific Publishing: Singapore, **1994**.
7. Zrínyi, M.; Szabó, D.; Filipcsei, G.; Fehér, J. *Electric and Magnetic Field Sensitive Smart Polymer Gels*, Osada, Y.; Khokhlov, A., Eds.; *Polymer Gels and Networks*, Marcel Dekker, Inc.: New York, **2002**; Chapter 11, 309-355.
8. Zrínyi, M.; Fehér, J.; Filipcsei, G. *Macromolecules* **2000**, 33(16), 5751-5753.
9. Crowley, J. M. *Fundamentals of Applied Electrostatics*, John Wiley & Sons: New York, **1985**.

Electric Field Sensitive Fluids and Elastomers I.

Today it is one of the challenging tasks is to manufacture and characterize new multifunctional materials possessing "intelligence" at the material level. We refer material intelligence in terms of three main functions: sensing changes in environmental conditions, integrating the sensed information and finally making judgment by moving away from or to the stimulus. The innovative functions of these new materials are in many respects similar to living organisms.

The current generation of intelligent materials can be divided into two main parts: Hard and dry materials such as metals, ceramics and plastics. The other class includes soft and wet materials like electrorheological fluids, magnetic fluids and polymer gels.

Attempts at developing stimuli-responsive gels for technological purposes are complicated by the fact that structural changes, like shape and swelling degree changes that occur, are kinetically restricted by the collective diffusion of chains and the friction between the polymer network and the swelling agent. This disadvantage often hinders the effort of designing optimal gels for different applications.

A new driving mechanism was discovered to induce deformation and movement of neutral polymer gels in non-conducting medium. The main idea was to incorporate finely distributed colloidal particles responding to electric field into a swollen network. Since the particles can not leave the gel matrix, so that all of the forces acting on the particles are transmitted directly to the polymer chains resulting in either the locomotion or the deformation of the gel. Bending of weakly crosslinked poly(dimethyl siloxane) gels containing finely distributed TiO_2 particles has been studied in silicon oil. Under electric field these gels undergo a significant and quick bending. Scaling down the geometry may provide a new principle of building soft micromechanical actuators.

Deprotonálható koronaéterek[§]

HUSZTHY Péter*, TÓTH Tünde

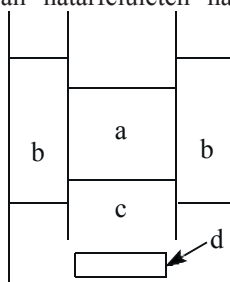
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szerves Kémia Tanszék

1111 Budapest, Szt. Gellért tér 4, Magyarország

Bevezetés

Annak érdekében, hogy egy ionofor (pl. egy koronaéter) a gyakorlatban is hasznosítható módon, a koncentrációgadiens ellenében is transzportáljon fémionokat (M^+) egy vizes adófázis – lipofil szerves folyadékmembrán – vizes szedőfázis rendszerben, ahol a két vizes fázist üveggel, ill. a membrán választja el (egy ilyen rendszert mutat be az 1. ábra)¹, az adófázis/membrán határfelületen nagy,

- a : Adófázis (0,8 ml H_2O , M^+)
 b : Szedőfázis (5 ml H_2O)
 c : Lipofil szerves folyadékmembrán
 (3 ml CH_2Cl_2)
 d : Keverőmág (120 fordulat/perc)



1. Ábra. Folyadéktömb-membrán cella fémiontranszport tanulmányozására

membrán/szedőfázis határfelületen pedig kis ionmegkötő képességgel kell rendelkeznie. Ezt a látszólag ellentmondó követelményt úgy valósíthatjuk meg, hogy az ionofor jól, ill. rosszul komplexáló formáját az adófázis/membrán, ill. a membrán/szedőfázis határfelületen valamilyen külső hatással reverzibilis módon hozzuk létre. Ez utóbbi külső hatást elő lehet idézni például valamilyen redoxireakcióval², fény hatására³, hő alkalmazásával⁴, valamint pH-gradiens létrehozásával⁵.

Az adófázis/membrán, ill. a membrán/szedőfázis határfelületén a fémionokat jól, ill. rosszul komplexáló formát a környezet pH-jának változtatásával megvalósító ún. deprotonálható koronaéterek (LH) nagy érdeklődésre tartanak számot^{5,6,7,8}. Az ilyen típusú koronaéterek (LH) az adófázis/membrán határfelületen a pK_s értéküknél jóval nagyobbra állított pH-jú közegben ligandum anionokat (L^-) szolgáltatnak, amelyek igen erősen kötik a fémionokat (M^+), semleges ML komplex képződik, míg a membrán/szedőfázis határfelületen pK_s értéküknél jóval kisebbre állított pH-jú közegben visszaalakulva semleges ligandummá (HL) eleresztik azokat.

A deprotonálható ligandumokkal a fentiekben vázolt ún. anion nélküli fémion-komplexálás- és transzport⁹ energetikailag is kedvezőbb, mint a nem deprotonálható koronaétereké, ugyanis az előbbi esetben a fémionokkal (M^+) semleges komplex (ML) képződén nincs szükség az anion deszolvatálására és szállítására. Az anion nélküli fémion-komplexálás- és transzport esetében a szelektivitás növekedésére is számíthatunk, mivel itt az ion-dipól

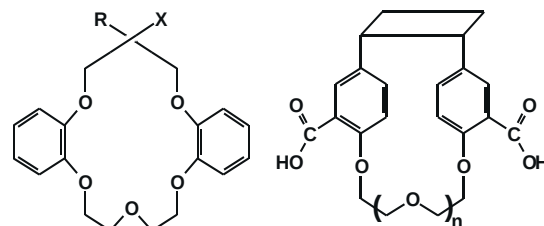
kölcsönhatás (ami a nem deprotonálható koronaétereknél is fellép) mellé egy további, nevezetesen az elektrosztatikus vonzás is járul. A kölcsönhatások számának növekedése pedig a szelektivitás növekedését hozza magával¹⁰. A fentiekben vázolt transzport megvalósulása érdekében a deprotonálható koronaétereknek elegendően lipofileknek kell lenniük ahhoz, hogy mind semleges ligandummá (HL), mind anionként (L^-), ill. fémionokkal (M^+) alkotott komplexeik (ML) formájában a szerves lipofil membránban tartózkodjanak. Amennyiben ez a feltétel nem valósul meg a ligandum (HL), az anionja (L^-), ill. a komplexe (ML) a vizes fázisba kerül, így nem lévén ionofor a membránban nem lehetséges az iontranszport sem¹¹.

A deprotonálható koronaéterek nemcsak hatékony fémion-transzportáló ligandumok, de széleskörű alkalmazást nyernek fémionok szelektív folyadék/folyadék extrakciójában⁶, ill. híg vizes oldataikból ion-flotációval történő szelektív kinyerésében¹² is.

A deprotonálható koronaétereket két osztályba sorolhatjuk, amelyeken belül ezután további csoportokat különböztethetünk meg. Az egyik osztályba azok a ligandumok tartoznak, amelyeknél a deprotonálható egység a makrogyűrűn kívül helyezkedik el, míg a másik osztályba azok sorolhatók, amelyekben a savanyú protont hordozó heteroatom a makrogyűrű része.

1. A savanyú protont a makrogyűrűn kívül tartalmazó deprotonálható koronaéterek

1.1. Szulfonsav, foszfonsav és karbonsav származékok



1 : $R = C_3H_7$, $X = O(CH_2)_3SO_3H$

2 : $R = C_{10}H_{21}$, $X = O(CH_2)_3SO_3H$

3 : $R = C_4H_9$, $X = OCH_2PO(OH)(OC_2H_5)$

4 : $R = C_{10}H_{21}$, $X = OCH_2CO_2H$

5 : $n = 3$

6 : $n = 4$

2. Ábra. A savanyú protont oxigén heteroatomon tartalmazó deprotonálható lariat koronaéterek

Az 1-4 deprotonálható lariat (lasszó) koronaéterek Zn^{2+} és Cd^{2+} ionok híg vizes oldatából történő ion-flotációjánál figyelemre

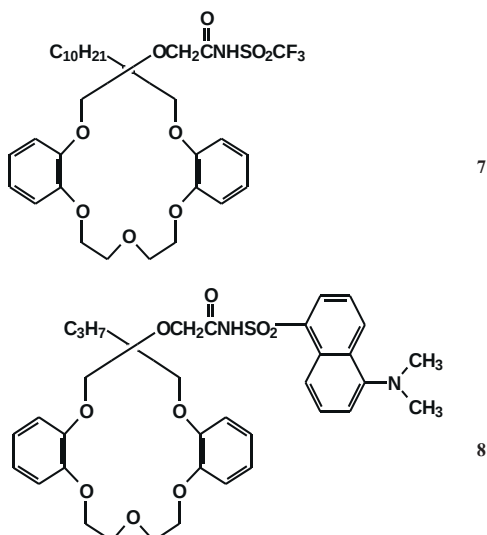
[§] Lipták András professzor úrnak ajánljuk 70. születésnapja alkalmából

* Tel.: 463-1071; fax: 463-3297; e-mail: huszthy@mail.bme.hu

méltó szelektivitást mutattak Cd^{2+} ionra Zn^{2+} ionnal szemben. Bartsch és munkatársai azt is kimutatták, hogy a legnagyobb szelektivitással a **3** monoetil-foszfónát oldalláncú rendelkező deprotonálható koronaéter rendelkezik¹². Érdekes szerkezetű „koronafán” vázat tartalmazó **5** és **6** dikarbonsav (ld. 2. ábra) előállításáról és vizsgálatáról számoltak be Inokuma és munkatársai tavaly. Ezek a deprotonálható makrociklusok vízből diklórmétánba történő extrakció során kiemelkedő szelektivitást mutattak Zn^{2+} ionra alkáli-, alkáliföld- és nehézfémionokkal szemben¹³.

1.2. N-szulfonil-karboxamid oldalláncot tartalmazó deprotonálható lariat éterek

Huber és munkatársai állították elő és vizsgálták a 3. ábrán bemutatott 7 lipofil lariat étert, melynek oldalláncán lévő nitrogénatomhoz kapcsolódó protont az acil és trifluorometilszulfonil csoportok erős elektronvonzása igen savanyúvá teszi.

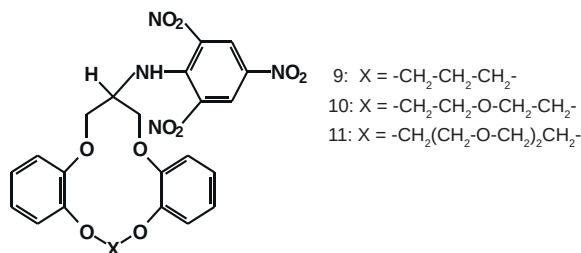


3. Ábra. N-szulfonil-karboxamid oldalláncot tartalmazó deprotonálható koronaéterek

Az amerikai kutatók víz/kloroform kompetitív extrakciós kísérletek alapján kimutatták, hogy a **7** deprotonálható lariat éter igen nagy szelektivitást mutat Na^+ ionra más alkálifémionokkal szemben¹⁴. Tong és munkatársai szintetizálták a **8** dibenzo-16-korona-5 vázzal rendelkező lariat éter típusú fluoroionofort (ld. 3. ábra), melynek oldalkarjában lévő nitrogénatomról a proton leszakadva egy ambidens aniont szolgáltat. Ez utóbbinak a szénatomhoz kapcsolódó negatív töltésű oxigénje elektrosztatikus kölcsönhatással stabilizálja a makrogyűrűben lévő alkálifémiont. Az amerikai kutatók fluoreszcencia spektroszkópia segítségével kimutatták, hogy a **8** deprotonálható ligandum bázikus közegben kiemelkedő szelektivitást mutat Na^+ ionra a többi alkálifémionnal szemben, vízből 1,2-diklórtánba történő extrakció során¹⁵.

1.3. Pikrilamino oldalláncot tartalmazó lariat éterek

A **9-11** pikrilamino oldalláncot tartalmazó kromoionoforok (ld. 4. ábra) tanulmányozása Talanovának és munkatársainak a nevéhez fűződik. Az amerikai kutatók igazolták, hogy a deprotonálható



4. Ábra. Pikrilamino oldalláncot tartalmazó deprotonálható lariat éterek

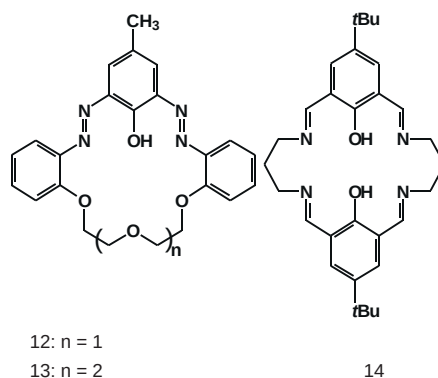
pikrilamino oldallánc és a makrogyűrű egyaránt jelentős szerepet játszik a szelektivitásban alkáli- és alkáliföldfémionok vízből kloroformba történő extrakciója során¹⁶.

2. A savanyú protont a makrogyűrű heteroatomján tartalmazó deprotonálható koronaéterek

Az előzőekben tárgyalt lariat éter típusú deprotonálható koronaéterektől eltérően, melyeknél az oldalkarban lévő negatív töltésű heteroatom a kationnak a makrogyűrű heteroatomjai által ion-dipól kölcsönhatással történő komplexálásához axiális irányú elektrosztatikus vonzással járul hozzá, itt a deprotonálással nyert anion a makrogyűrű része lévén, az elektrosztatikus vonzás az ion-dipól kölcsönhatások síkjával azonos, vagy közel azonos síkban hat. Ez az eltérés gyakran a komplexképzés szelektivitásában és a már kialakult komplexek stabilitásában is jelentős mértékben kifejezésre jut.

2.1. Fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó koronaéterek

Néhány évvel ezelőtt Inerowicz számolt be arról, hogy a **12** és **13** (ld. 5. ábra) azo-kromofor egységgel is ellátott hidroxilcsoportot tartalmazó koronaéter (különösen a kisebb üregméretű **12** kromoionofor) tetraetil-ammonium-hidroxid bázis jelenlétében nagy szelektivitást mutat Li^+ ionra egyéb alkálifémionokkal szemben.



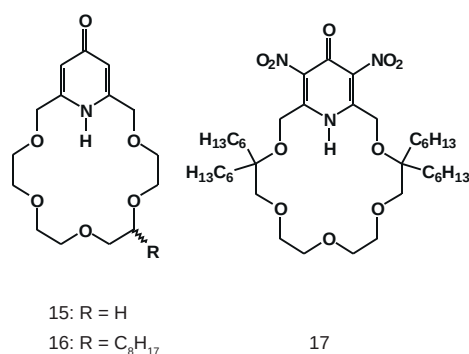
5. Ábra. Fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó deprotonálható koronaéterek

A lengyel kutató a komplexképződés egyensúlyi állapotait spektrofotometriával dioxán-víz elegyben határozta meg¹⁷. A Black és munkatársai által előállított **14** H₂L típusú deprotonálható makrociklus (ld. 5. ábra) kimagasló szelektivitással rendelkezik mind a transzport, mind az extrakciós kísérletekben Cu^{2+} ionokra más fémionokkal szemben¹⁸.

2.2. Piridon, pirimidon és akridon egységet tartalmazó deprotonálható koronaéterek

A Nakatsuji és munkatársai által először előállított **15** piridono-18-korona-6 éter (ld. 6. ábra) pK_s értéke vízben 10,98-nak adódott¹⁹, melynek racém **16** oktilcsoporttal szubsztituált lipofil származéka (ld. 6. ábra) kitűnő szelektivitással transzportált kálium ionokat 13-nál nagyobb pH -jú adófázis alkalmazása esetén, amikor is abból majdnem teljes mértékben a megfelelő ligandum anionok képződtek¹¹.

Magyar és amerikai kutatók együttműködésével sikerült a piridon egységben két nitrocsoportot tartalmazó lipofil **17** ligandumot (ld. 6. ábra) is előállítani.

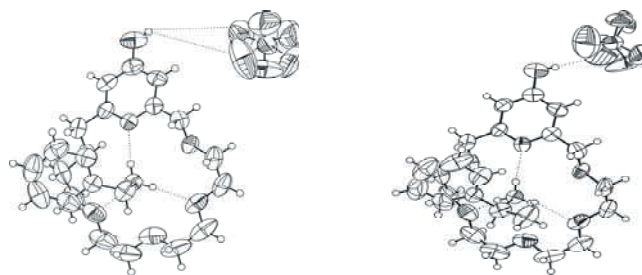


6. Ábra. Piridon egységet tartalmazó deprotonálható koronaéterek

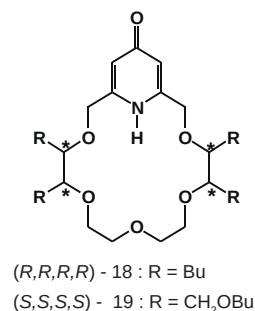
A **17** könnyen deprotonálható ligandum előállításának kettős oka volt: egyrészt a nitrocsoportok nagy $-I$ és $-M$ effektusa miatt a makrociklus pK_s értéke sokkal kisebb lévén, mint a **16** koronaéteré, jóval alacsonyabb pH -nál valósíthatja meg az igen szelektív és energetikailag is kedvező „anion-nélküli” komplexképződést, extrakciót és transzportot, másrészt a ligandumnak kromofor tulajdonsága lévén a fenti folyamatok az igen érzékeny fotofizikai módszerekkel is követhetők²⁰.

Tavalyelőtt magyar kutatók röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján igazolták, hogy a **15** piridono-18-korona-6 éter nemcsak fémionokkal, de protonált primer aminokkal is stabil komplexet képez. A 7. ábrán látható, hogy a **15** ligandum, amely egyébként szabad formában ugyancsak röntgendiffrakcióval korábban igazolt piridon tautomer formában van jelen¹⁹, benzil-amin-hidrogén-perkloráttal (BA-tal), ill. (*R*)-1-feniletílamín-hidrogén-perkloráttal ((*R*)-PEA-tal) képzett komplexében hidroxipiridin tautomerre alakul, így lehetőség van az ammóniumsó három protonjának hárompontos hidrogénkötést létrehozni a makrociklus piridin nitrogénje és két alternáló oxigénje között²¹.

Az utóbbi megfigyelés ösztönözte a magyar kutatókat arra, hogy a **15** ligandum szerkezetéhez hasonló, de enantiomertiszta királis lipofil makrociklusokat (*R,R,R,R*)-**18**-at és (*S,S,S,S*)-**19**-et (ld. 8. ábra) állítsanak elő, amelyek alkalmasak lehetnek racém, protonált primer aminok rezolválására enantioszelektív komplexképzés és/vagy extrakció és/vagy transzport segítségével²¹.

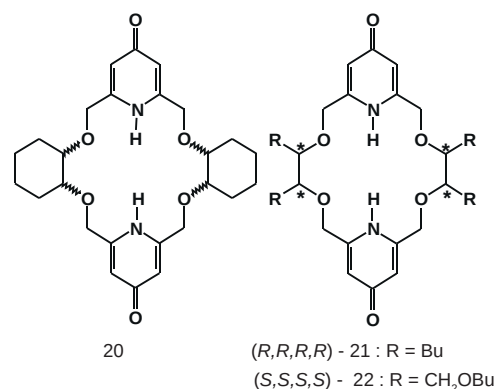


7. Ábra. A **15** piridono-18-korona-6 éter BA-tal és (*R*)-PEA-tal alkotott komplexének szerkezete



8. Ábra. Piridon egységet tartalmazó enantiomertiszta királis koronaéterek

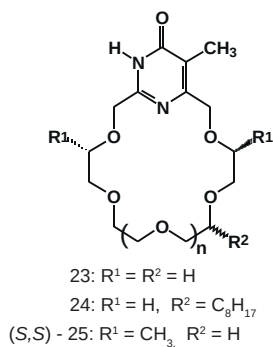
Kétértékű fémek szelektív komplexképzésének és/vagy extrakciójának és/vagy transzportjának tanulmányozása céljából Bradshaw és munkatársai előállították a két piridon egységet tartalmazó **20** deprotonálható lipofil koronaétert (ld. 9. ábra) *mezo* és *racém* vegyületek keverékeként²².



9. Ábra. Bisz-piridono-18-korona-6 éter típusú deprotonálható ligandumok

Tavaly magyar kutatók a **20** makrociklussal analóg szerkezetű, de enantiomertiszta királis, deprotonálható, lipofil bisz-piridono-18-korona-6 éterek ((*R,R,R,R*)-**21** és (*S,S,S,S*)-**22**, ld. 9. ábra) előállításáról is beszámoltak²³. Redd és munkatársai 1998-ban számoltak be a **23** akirális, a **24** racém és az (*S,S*)-**25** enantiomertiszta pirimidon egységet tartalmazó 18-korona-6 éter típusú ligandumok (ld. 10. ábra) előállításáról és vizsgálatáról.

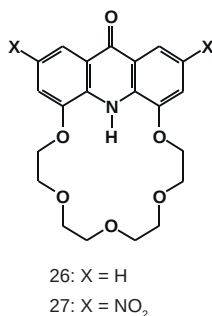
A pirimidon egységet tartalmazó **23**-(*S,S*)-**25** ligandumok pK_s értékei 8,5 körül vannak, tehát jóval erősebb savak, mint a piridon egységet hordozó analógok. Ennek az a következménye, hogy a primer aminokat is protonálják, és azokat primer ammóniumsókká alakítva stabil komplexet



10. Ábra. Pirimidon egységet tartalmazó deprotonálható koronaéterek

képeznek velük. Ezért nem meglepő, hogy az (S,S)-25 királis enantiomertizta makrociklus nemcsak az 1-(1-naftil)-etil-amin-hidrogén-perkloráttal, hanem az 1-(1-naftil)-etil-aminnal szemben is figyelemreméltó enantioszelektivitást mutat.

Redd és munkatársai azt is igazolták, hogy szilárd fázisban a 23 ligandum a 10. ábrán bemutatott tautomer formában van jelen, míg oldatban mindkét pirimidon tautomerje (tehát az a tautomer forma is, amikor a proton a makrogyűrű üregének középpontja felé irányul) kimutatható²⁴. Ígéretes deprotonálható koronaéterek közé sorolhatók az akridon, ill. a dinitroakridon egységet tartalmazó 26, ill. 27 ligandumok (ld. 11. ábra).

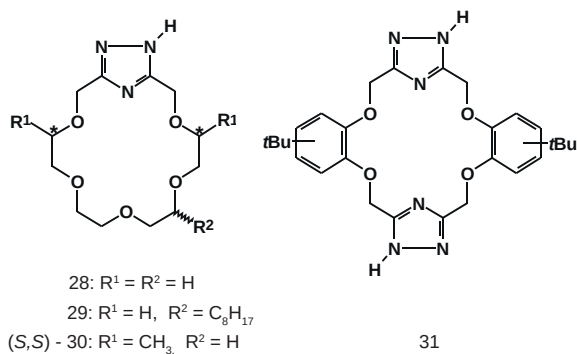


11. Ábra. Akridon, ill. dinitroakridon egységet tartalmazó makrociklusok

Ezeknek a makrociklusoknak két előnyös tulajdonságuk is van a piridon, ill. a pirimidon egységet tartalmazó társaikkal szemben. Egyrészt ezek a ligandumok fluoro-, ill. kromogének, így komplexképzésük az igen érzékeny fotofizikai módszerekkel is jól vizsgálhatók, másrészt, hogy jóval merevebb konformációval rendelkeznek; következőképpen szelektivitásuk is várhatóan nagyobb lesz⁸.

2.3. Triazol egységet tartalmazó deprotonálható koronaéterek

Az egy triazol egységet tartalmazó deprotonálható koronaéterek esetében a 28 akirális²⁵, a 29 racém²⁶ és az (S,S)-30 enantiomertizta²⁵ koronaétert szintén előállították. Ezen ligandumok pK_s értékei 9,5 körül vannak, és jóllehet a röntgenkristallográfiai vizsgálatok szerint szilárd fázisban semleges kémhatás esetén a savanyú proton a 12. ábrán bemutatottak szerint helyezkedik el, a deprotonálódás után keletkező anion a makrociklus részévé válik²⁵.

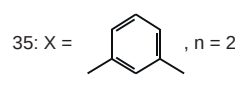
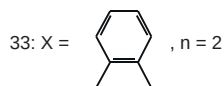
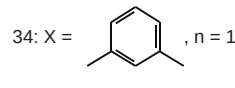
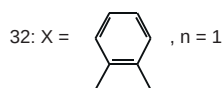
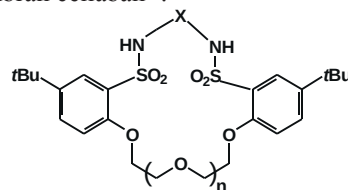


12. Ábra. Triazol egységet tartalmazó makrociklusok

Az oktilcsoportot tartalmazó lipofil 29 triazolo-ligandum a várakozásnak megfelelően a 16 piridon egységet tartalmazó analogonhoz képest alacsonyabb pH-jú adófázis esetén is már jelentősen transzportál alkálifémionokat az 1. ábrán vázolt folyadékmembrán cellában, de K^+ ionra nézve annál jóval kisebb szelektivitást mutat¹¹. A 31 lipofil bisz-triazolo-18-korona-6 éter típusú deprotonálható ligandum szuperkritikus széndioxiddal végzett extrakciós kísérletekben kitűnő szelektivitást mutat Hg^{2+} ionra más fémionokkal szemben²⁷.

2.4. Szulfonamid egységet tartalmazó deprotonálható koronaéterek

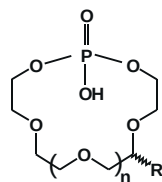
Biernat és munkatársai olyan deprotonálható koronaéterek előállításáról és vizsgálatáról számoltak be, amelyek makrogyűrűjében két szulfonamid egység található (ld. 13. ábra)^{28,29}. Ezen makrociklusok pK_{s1} értéke 9, pK_{s2} értéke pedig 12 körül van, és a 32 ligandum 14-es pH-jú adófázis esetén, amikor is az túlnyomórészt dianionként van jelen, kitűnő szelektivitással transzportál K^+ ionokat a többi alkálifémionokkal szemben az 1. ábrán bemutatott folyadékmembrán cellában³⁰.



13. Ábra. Szulfonamid egységet tartalmazó deprotonálható koronaéterek

2.5. Dialkil-hidrogén-foszfát egységet tartalmazó koronaéterek

Bradshaw és munkatársai által előállított dialkil-hidrogén-foszfát egységet tartalmazó ligandumok³¹ (ld. 14. ábra) igen savanyú protont tartalmaznak.



- 36: $n = 1$, $R = H$
 37: $n = 1$, $R = C_8H_{17}$
 38: $n = 2$, $R = H$
 39: $n = 2$, $R = C_8H_{17}$
 40: $n = 2$, $R = C_{10}H_{21}$
 41: $n = 2$, $R = C_{16}H_{33}$

14. Ábra. Dialkil-hidrogén-foszfát egységet tartalmazó koronaéterek

A **40** ligandum pK_s értéke például 70 % dioxán-30 % víz elegyben 4,43 -nak adódott³². A **39-41** lipofil deprotonálható ligandumok a várakozásnak megfelelően már viszonylag alacsony pH -jú adófázis esetén is szelektíven transzportáltak K^+ ionokat az 1. ábrán bemutatott folyadékmembrán cellában az energetikailag igen kedvező „anion nélküli” mechanizmus szerint, különösen savas szedőfázis alkalmazásakor. A legnagyobb szelektivitást az oktilcsoporttal szubsztituált **39** makrociklus mutatta K^+ ionra a többi alkáli- és alkáliföldfém-ionokkal szemben³².

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönik az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramoknak a kutatás pénzügyi támogatását (T-038393), valamint az Oktatási Minisztériumnak a posztdoktori ösztöndíjat (PAL 11/2003).

Hivatkozások

- Lamb, J. D.; Christensen, J. J.; Izatt, S. R.; Bedke, K.; Astin, M. S.; Izatt, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3399.
- Chen, Z.; Echegoyen, L. Redox-Active Polyether Ligands: Toward Metal Ion Isotopic Separations, *In Crown Compounds: Toward Future Applications*; Cooper, S. R., Ed.; VCH: New York, **1992**; pp. 207-233.
- Shinkai, S. *Pure & Appl. Chem.* **1987**, *39*, 425.
- Shinkai, S.; Kazufumi, T.; Manabe, O.; Kojiyama, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4458.
- McDaniel, C. W.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Heterocycles* **1990**, *30*, 665.
- Bartsch, R. A. *ACS Symposium Series* **1999**, *716*, 146.; Chem. Abstr. **1999**, *130*, 201386.
- Bradshaw, J. S. *J. Incl. Phenom. Mol. Rec. Chem.* **1997**, *29*, 221.
- Huszthy, P.; Vermes, B.; Báthori, N.; Czugler, M. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9371.
- Izatt, R. M.; LindH, G. C.; Bruening, R. L.; Huszthy P.; McDaniel, C. W.; Bradshaw, J. S.; Christensen, J. J. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1694.
- Hamilton, A. D. Hydrogen Bonding in Biological and Artificial Molecular Recognition *In Advances in Supramolecular Chemistry*; Gokel, G. W., Ed.; JAI Press: Greenwich, **1990**; Vol. 1, pp. 1-64.
- Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M.; Huszthy, P.; Nakatsuji, Y.; Biernat J. F.; Koyama, H.; McDaniel, C. W.; Wood, S. A.; Nielsen, R. B.; LindH, G. C.; Bruening, R. L.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J. *Studies in Organic Chemistry* **1987**, *31*, 553.
- Ulewicz, M.; Walkowiak, W.; Jang, Y.; Kim, J. S.; Bartsch, R.

- Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2276.
- Inokuma, S.; Funaki, T.; Hara, D.; Nishimura, J. *Heterocycles* **2004**, *63*, 333.
- Huber, V. J.; Ivy, S. N.; Lu, J. P.; Bartsch, R. A. *J.C.S. Chem. Commun.* **1997**, 1499.
- Tong, A. J.; Song, Y. S.; Li, L. D.; Hayashita, T.; Teramae, N.; Park, C.; Bartsch, R. A. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *57*, 420.
- Talanova, G. G.; Hwang, H. S.; Talanov, V. S.; Bartsch, R. A. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5260.
- Inerowicz, H. D. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 211.
- Black, D.; Blake, A. J.; Finn, R. L.; Lindoy, L. F.; Nezhadili A.; Rougnaghi, G.; Tasker, P. A.; Schröder, M. *Chem Commun.* **2002**, 340.
- Nakatsuji, Y.; Bradshaw, J. S.; Tse, P. K.; Arena, G.; Wilson, B. E.; Dalley, N. K.; Izatt, R. M. *J. Chem. Soc. Chem Commun.* **1985**, 749.
- Huszthy, P.; Kertész, J.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M.; Redd J. T. *J. Heterocyclic Chem.* **2001**, *38*, 1259.
- Gerencsér, J.; Báthori, N.; Czugler, M.; Huszthy, P.; Nógrádi, M. *Tetrahedron. Asymmetry* **2003**, *14*, 2803.
- Bradshaw, J. S.; Krakowiak, K. E.; Huszthy, P.; Izatt, R. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 773.
- Gerencsér, J.; Huszthy, P.; Nógrádi, M. *ARKIVOC* **2004**, vii, 7.
- Redd, J. T.; Bradshaw, J. S.; Huszthy, P.; Izatt, R. M.; Dalley, N. K. *J. Heterocyclic Chem.* **1998**, *35*, 1.
- Bradshaw, J. S.; Nielsen R. B.; Tse, P. K.; Arena, G.; Wilson, B. E.; Dalley, N. K.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J.; Izatt, R. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 361.
- Bradshaw, J. S.; McDaniel, C. W.; Skidmore, B. D.; Nielsen, R. B.; Wilson, B. E.; Dalley N. K.; Izatt, R. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1987**, *24*, 1085.
- Wang, S.; Elshani, S.; Wai, C. M. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 919.
- Biernat, J. F.; Bradshaw, J. S.; Wilson, B. E.; Dalley, N. K.; Izatt, R. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 1667.
- Bradshaw, J. S.; Koyama, H.; Dalley, N. K.; Izatt, R. M.; Biernat, J. F.; Bochenska, M. *J. Heterocyclic Chem.* **1987**, *24*, 1077.
- Biernat, J. F.; Bochenska, M.; Bradshaw, J. S.; Koyama, H.; LindH, G. C.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J.; Izatt, R. M. *J. Incl. Phenom.* **1987**, *5*, 729.
- Bradshaw, J. S.; Huszthy, P.; Izatt, R. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 1673.
- Izatt, R. M.; LindH, G. C.; Huszthy, P.; Clark, G. A.; Bruening, L. R.; Bradshaw, J. S.; Christensen, J. J. *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.* **1989**, *7*, 501.

Proton-ionizable crown ethers

In order for an ionophore (a crown ether for example) to perform a practically useful, so-called "active transport" (i.e. transport against the concentration gradient) across the membrane of an aqueous source phase/lipophilic membrane/aqueous receiving phase system, it should possess a relatively high ion-binding ability at the source phase/membrane phase interface, and have a relatively low ion-binding ability at the membrane phase/receiving phase interface. The solution for this seemingly contradictory requirement is to engineer into the ionophore a so-called "switching mechanism" which can create two different binding states. These two states can be reversibly interconverted by external forces such as redox, light, temperature and pH gradients.

Proton-ionizable crown ethers having a pH switching mechanism have attracted the attention of many researchers, because at higher pH than their pK_s values they are mostly ionized to ligand anions which increase the cation-ligand complex stability with enhancement of selectivity, and avoid the need for a counter anion in cation transport through different membrane systems or in

solvent extraction. The latter factor is of immense importance to potential practical application in separations in which hydrophilic aqueous phase anions, such as chloride, nitrate and sulfate, would be involved. The transport of cations in most of these cases is *pH* dependent so that transport can be turned on and off by adjusting the *pH*. The proton-ionizable macrocyclic carriers should have lipophilic substituents to ensure that they remain in the organic membrane. Without a lipophilic substituent, no transport occurs, because the crown ether distributes into the aqueous phase so that it is not available as a carrier.

There is always a great desire to prepare proton-ionizable macrocyclic ligands with pK_a values that allow the transport of cations at relatively low (at around physiological *pH* value for example) *pH* values. These more acidic *pH*-switched ligands can also be used to transport some of the heavy metal cations, ammonium and primary organic ammonium ions at relatively low aqueous source phase *pH* values.

Proton-ionizable crown ethers can be divided into two classes:

1. Macrocycles possess the proton-dissociable group on a sidearm.
2. Ligands in which the proton-dissociable group is part of the macroring (the complexation sphere).

Both classes (class 1. and class 2.) can be subdivided into smaller groups.

1.1. The pendant side arm contains sulfonic acid, phosphonic acid diester and carboxylic acid proton-dissociable groups.

1.2. Crown ethers containing *N*-sulfonyl-carboxamide proton-ionizable groups.

1.3. Lariat ethers with picrylamino chromogenic proton dissociable sidechains.

2.1. Crown ethers containing phenolic hydroxyl groups directed into the cavity.

2.2. Ligands with pyridone, pyrimidone and acridone subcyclic units.

2.3. Macrocycles containing the triazole unit in the macroring.

2.4. Crown ethers with sulfonamide groups in the coordination sphere.

2.5. Ligands containing the dialkylhydrogenphosphate moiety.

Az elektrokinetikai potenciál számítására használt Smoluchowski egyenlet alkalmazhatóságáról

BÁRÁNY Sándor

Miskolci Egyetem, Kémiai Tanszék, 3515 Miskolc- Egyetemváros, Magyarország

Ismeretes, hogy a diszpergált részecskék elektroforetikus (ef) sebességéből vagy a szemcsés közegen áthaladó folyadék elektroosztatikus sebességéből a részecskék zéta -potenciál (ζ) értékét az esetek túlnyomó többségében a klasszikus Smoluchowski-féle egyenletből számítják^{1,2,3} :

$$V = \epsilon \zeta E / 4 \pi \eta \quad (1)$$

Ahol V - a részecskék ef sebessége, ill. a külső tér hatása alatt a szemcsés rétegen áthaladó folyadék sebessége , ϵ - a közeg permittivitása, ζ - az elektrokinetikai potenciál értéke (mV), E - a külső elektromos tér gradiense (V/cm), η - a közeg viszkozitása. A fenti egyenlet nemvezető, illetve a közegnél kisebb vezetőségű részecskékre és vékony elektromos kettősréteg (az utóbbi Debye-sugár reciproka értékében kifejezett κ vastagságának kisebbnek kell lennie a részecske a sugaránál, azaz $\kappa a \gg 1$) feltételeknél helytálló. Az V és E közötti egyenesen arányos összefüggés csak kis elektromos terekben (általában néhány V/cm) érvényes. Közelmúltban megjelent tanulmányunkban⁴ tárgyaltuk azokat a feltételeket, melyeknél a $V \sim E$ proporcionalitás helytálló, ill. melyeknél az erős elektromos terekben (általában néhány száz V/cm) nem-lineáris (elsősorban $V \sim E^3$) elektroforézis megjelenésével kell számolnunk.

Látható, hogy az elektrokinetikai potenciál nem más mint a $V=f(E)$ függvény koefficiense. Hückel figyelembe vette az elektromos kettősréteg (EKR) ion-felhőjének a részecskékkel ellentétes irányba való mozgását, ami a környező folyadékréteg mozgását eredményezi, ennek következményeként az elektromos térben a részecskék nem nyugvó, hanem ellentétes irányba mozgó folyadékokban vándorolnak, tehát csökken az effektív sebességük. A Hückel által levezetett egyenlet a következő¹⁻³:

$$V = \epsilon \zeta E / 6 \pi \eta \quad (2)$$

Henry⁵ kimutatta, hogy a két fenti egyenlet között nincs elvi különbség. A nevezőben lévő eltérést a kolloid részecske által a külső elektromos térre kifejtett deformáció okozza, az elektroforetikus sebesség minden esetben egyenesen arányos a külső tér feszültségével:

$$V = f \epsilon \zeta E / \pi \eta \quad (3)$$

ahol a f koefficiens értéke az κa függvénye. Jelentős κa értékeknél ($\kappa a \gg 1$), függetlenül a részecske formájától $f=1/4$, míg gömb alakú részecskék esetében $\kappa a \leq 1$ feltételnél $f=1/6$ ^{1,5}.

Az irodalomban található nagyszámú (több ezer) ζ -potenciál értéket széleskörűen alkalmazták diszpergált részecskék, olajcseppek, biokolloidok felületének, többek között felületi töltésének és elektromos kettősrétege

szerkezetének jellemzésére, a kolloidstabilitás DLVO-elmélet alapján való számítások során stb. Világcégek (Malvern, Brookhaven, Rank Brothers, Dispersion Analysis és mások) kifejlesztettek - különböző effektusokon alapuló - igen érzékeny műszereket a részecskék/cseppek/sejtek stb. elektroforetikus sebességének mérésére, amiből a Smoluchowski egyenlet alapján automatikusan kiszámítják és megadják a ζ -potenciál értéket vagy akár ennek részecskék szerinti eloszlását. Ugyanakkor az irodalomban közölt értékek aránylag ritkán használhatók az EKR mennyiségi leírására, mert a szerzők legtöbbször nem vették figyelembe az elektrokinetikai potenciált lényegesen befolyásoló tényezőket, olyanokat mint hidrodinamikailag kevésbé mozgékony rétegek képződését határfelületeken, a szilárd felületek egyenetlenségét és a kettősréteg polarizációját külső elektromos térben. Mi az utóbbit vesszük részletesen szemügyre.

Az EKR polarizációját elsőként Overbeek és Booth^{6,7} vették figyelembe, akik a kettősréteg külső elektromos térben megvalósuló csak kismértékű deformációját feltételezték, azaz olyan deformációt, amikor a polarizált töltések ρ sűrűsége és az ezeknek megfelelő $\rho_p(x)$ töltés- és $\psi_p(x)$ potenciál-eloszlás lényegesen kisebb az egyensúlyi EKR $\rho_{eq}(x)$ töltésénél, ill. $\psi_{eq}(x)$ potenciáljánál. Elméletük a hasadási síkon kívül eső határrétegben, azaz csak az EKR hidrodinamikailag mozgékony részében lokalizált töltések polarizációját, deformálódását vette figyelembe, és csak kis zéta- potenciállal rendelkező részecskékre érvényes. Erre a határesetre megadták az ef sebességnek a κa paramétertől való függését. Ugyanakkor nem helyes az a feltevés, hogy a kettősréteg gyenge polarizációja csak kismértékben befolyásolja a részecskék elektroforetikus mozgékonyágát. Ha a zéta- potenciál értéke nem túl kicsi, akkor a $\psi_{eq}(x)$ és $\psi_p(x)$ értékei lehetnek összemérhetők, azaz már a kettősréteg kismértékű polarizációja is nagymértékben megváltoztathatja a részecskék ef sebességét. Az Overbeek-Booth-féle elméletet Wiersema⁸ fejlesztette tovább nagy ζ - potenciállal rendelkező részecskék esetére, aki - már számítógépet is alkalmazva - táblázatokba foglalva megadta az ef sebesség numerikusán számított változását az $\kappa a/\lambda$ paraméter függvényében, ahol $\lambda^2 = (z^+ + z^-)/2z$ (z - az ionok töltése).

Az $\kappa a \gg 1$ szükséges, de nem elégséges feltétele a Smoluchowski- féle egyenlet alkalmazhatóságának, amelynek levezetése a hidrodinamikai és elektromos terek analógiáján alapszik. Minél nagyobb a (külső tér hatására) polarizált kettősréteg elektromos tere, azaz minél jobban közelíti a külső tér erősségét, annál pontatlanabb a fenti analógia és a Smoluchowski egyenlet alkalmazhatósága⁹. A fenti nehézség áthidalására célszerű az EKR bonyolult

szerkezete helyett szemügyre venni a kettősréteg egyik fontos integráns jellemzőjét, az indukált dipólus nyomatek ún. d_p „töltés” komponensét. Mint ismeretes^{9,10,11}, egy kolloidrészecske dipólus nyomateka egy, az EKR töltésétől független d_0 és az EKR töltésétől függő d_p komponensből tevődik össze.

Könnyű kimutatni, hogy vékony kettősréteg esetében az indukált dipólus által létrehozott tér tangenciális összetevője csak kismértékben változik az EKR polarizációja hatására, ha $d_p \ll d_0$. Az EKR polarizációja érzékeny a részecske formájára és a külső elektromos térben felvett orientációjára. Az aszimmetrikus részecskék dipólus nyomatekának hosszanti és merőleges komponense eltér egymástól, ennek következtében az elektroforetikus sebesség is változni fog a részecskék formájával és orientációjával a külső térben. Tehát, ha klasszikus feltételeknél (a polarizáció hiányában) az elektroforézis sebessége bármilyen formájú részecske esetében számítható a Smoluchowski összefüggés alapján, akkor a polarizáció fennállása feltételnél minden formájú részecskére külön-külön egyenlet levezetése szükséges.

Fridrichsberg és munkatársai^{12,13}, jómagam^{14,15} és mások¹⁶ komplex elektromos felületi mérései (amely magába foglalta a felületi töltéssűrűség, felületi vezetés és elektrokinetikai potenciál méréseit) alapján nyilvánvaló, hogy: (1) a részecskék többségének felületén meglehetősen vastag hidrodinamikailag immobil folyadékréteg található, (2) ennek következtében a felületi- (ψ_0) , Stern (ψ_δ) - és zéta-potenciál értékek különböznek egymástól, általában $\psi_0 \geq \psi_\delta > \zeta$, (3) a Stern- réteg határa és hasadási sík közötti vízrétegben lokalizált ionok koncentrációja jelentősen meghaladja az EKR „mobil” részében, azaz a hasadási sík utáni periférikus tartományban lévő ionok koncentrációját és (4) a fenti „immobilizált” vízrétegben lévő ionok vezetőképessége közelíti a folyadékfázisban lokalizált ionok vezetőképességét. Tehát a Stern- réteg határán túli tartományban lévő „mobil” ionok száma, melyek a kettősréteg deformációjára, polarizációjára képes ionfelhőt alkotják, jelentősen meghaladja az elektrokinetikai potenciálnak és töltésnek megfelelő ionok számát. Ez szükségszerűen azt jelenti, hogy az EKR polarizációját ezen ionok hozzájárulásával szükséges figyelembe venni. Megjegyzem, hogy a $\psi_\delta = \zeta$ feltétel, ami a jelentős immobil hidrát-réteg hiányára utal a felületen, a gyakorlatban csak igen kevés rendszerben fordul elő, ilyenek pl. az AgI részecskék, vagy kis mennyiségű adszorbeált ionos tenzidet tartalmazó olaj/ víz emulziók^{2,9,10,15}.

Mint említettem, az EKR polarizációjának jellemzésére az egyik legalkalmasabb integráns paraméter a részecskék dipólus-momentuma, amely számítható a diszperzió elektromos vezetése méréseiből a részecskék koncentrációjának függvényében. Monodiszperz gömb alakú részecskék esetében ezt az összefüggést a felületi vezetőképesség Dukhin által kifejlesztett elmélete adja meg⁹.

$$\bar{K}/K = 1 + [4\pi n/E [(d_0 + d_p)] = 1 - 3/2p (1 + d_p/d_0) \quad (4)$$

Ahol n - a részecskék száma egységnyi térfogatban, $\bar{K}$ - a diszperzió elektromos vezetése, K - a közeg vezetése, E - a külső elektromos tér gradiense.

A nemvezető gömb alakú részecskék indukált dipólmomentuma^{9,10,11}

$$d_p = -3a^3E/2 [Du/(1+Du)] \quad (5)$$

ahol Du - az EKR polarizációját jellemző dimenzió-nélküli paraméter (l. alább).

Az ellipszis vagy nyújtott alakú részecskék polarizációja nagymértékben függ a részecske külső elektromos térben felvett orientációjától. Ennek megfelelően megkülönböztetjük a dipólmomentum hosszanti ($d_{||}$) és merőleges ($d_{\perp}$) komponensét. Dukhin^{9,11} kimutatta, hogy túszerű vagy hosszú ellipszis alakú részecskék dipólmomentumát, ha a részecske hosszanti irányú tengelyének orientációja egybeesik a külső tér irányával, a dipólmomentum hosszanti komponense határozza meg. A henger alakú részecskék dipólmomentumainak hosszanti ($d_{||}$) és merőleges ($d_{\perp}$) komponense a diszperzió vezetőképessége - részecskék térfogat törtje függvényekből számíthatók⁹:

$$\frac{\bar{K}}{K} = 1 + \frac{4\pi n}{E} \left(\frac{d_{||}^2}{3} + \frac{2d_{\perp}^2}{3} \right) = 1 + 4\pi n \left(\frac{\gamma_{||}^2}{3} + \frac{2\gamma_{\perp}^2}{3} \right) \quad (6)$$

ahol a részecskék $\gamma_{||}$ és $\gamma_{\perp}$ a hosszanti és merőleges polarizálhatósága.

A Dukhin által kifejlesztett és ma már általánosan elfogadott elmélet szerint^{2,9,10,11,15}, az EKR polarizációjának mértéke az ún. Rel dimenzió nélküli számmal (Lyklema ezt Du számnak nevezte el²) jellemezhető:

$$Rel = Du = \kappa \sigma / K a = [\exp(\bar{\psi}_\delta/2 - 1)]/\kappa a \quad (7)$$

itt $\kappa \sigma$ - a fajlagos felületi vezetőképesség, K - a közeg vezetése, $\bar{\psi}_\delta$ - a dimenzió nélküli Stern-potenciál ($\bar{\psi} = ze\psi/kT$).

Ha a Du szám lényegesen kisebb az egynél ($Du \ll 1$) a kettősréteg polarizációja elhanyagolható, ha pedig $Du \gg 1$, akkor az elektromos kettősréteg polarizációját a külső térben kötelezően figyelembe kell venni. A Du paraméter a szuszpenziók vezetőképességéből, illetve a szuszpenzió permittivitásának kis frekvenciákon mért szórásából számítható. Az első esetben gömb, illetve henger alakú, nemvezető és nem aggregálódó részecskékre az alábbi összefüggések érvényesek^{2,9,15}:

$$\bar{K}/K = 1 + 3p [-1/2 + 3/2 \{Du/(1+2Du)\}] \quad (8)$$

és

$$\bar{K}/K = 1 + p [-5/3 + 2/3 \{Du(1+2/[1+2Du])\}] \quad (9)$$

itt p - a diszpergált fázis térfogati törtje. A kísérletileg mért $\bar{K}/K(p)$ függések (nem aggregálódó részecskéknél ezek általában egyenesek, lásd alább) hajlásszögéből kiszámítható a Du szám értéke és megbecsülhető az EKR polarizációjának mértéke.

Egy másik kísérleti módszer azon alapszik, hogy a kettősréteg külső elektromos térben bekövetkező polarizációja lokális koncentráció-különbségeket idéz elő a részecskék méreteivel összemérhető távolságokon. Ez az

ún. koncentrációs polarizáció kis ν frekvenciákon jelentős, ahol a dipólus momentum is frekvenciafüggő. A Dukhin-Shilov-féle elmélet a részecskék számával arányosan növekvő permittivitás és Stern-potenciál között az alábbi összefüggést adja¹⁷:

$$\Delta\epsilon = 9/4\pi\epsilon\{\exp(z\bar{\psi})/\{(1+2/\kappa a)\exp(z\bar{\psi}/2)\}\} \quad (10)$$

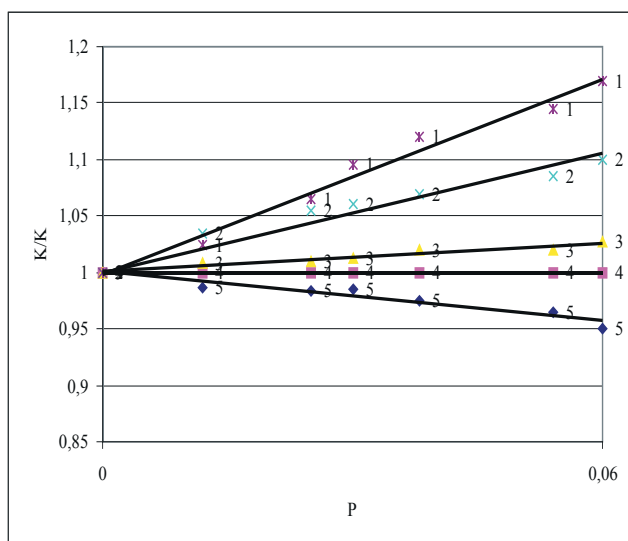
$\nu \rightarrow 0$

ahol $\Delta\epsilon = \epsilon - \epsilon_0$, a szuszpenzió és közeg permittivitásának különbsége.

A Du szám értékét durván megbecsülhetjük a mért elektrokinetikai potenciál alapján is, behelyesítve a (7) képletben a ψ_s -potenciált a ζ -potenciál értékével. Természetesen ennek az eljárásnak a korlátit meghatározza mind a ζ -potenciál számításának pontossága, mind az ψ_s és ζ közötti különbség.

Alapul véve a fentieket, fontos aláhúzni, hogy az elektrokinetikai potenciál számításánál figyelembe kell venni az EKR egész diffúz részének, tehát a Stern-réteg határain túl elterülő tartományának polarizációját, és nemcsak a hasadási síkon túli tartomány polarizációját, mint ezt a korábbi szerzők tették. Az utóbbi hozzájárulása a polarizációhoz a legtöbb esetben sokkal kisebb az immobilizált folyadékrétegben lévő ionok hozzájárulásához képest.

A ζ -potenciál számítása az EKR teljes diffúz



1. Ábra. Polisztirol latex szuszpenzió relatív elektromos vezetésének változása a részecskék térfogati törtségének függvényében különböző NaCl koncentrációknál: $5 \cdot 10^{-5}$ (1), 10^{-4} (2), $2 \cdot 10^{-4}$ (3), $5 \cdot 10^{-4}$ (4), 10^{-3} (5) mol/dm^3

része polarizációjának figyelembevételével $\kappa a \gg 1$ feltételnél a Dukhin és Semenikhin által levezetett egyenlet alapján valósítható meg¹⁸:

$$\bar{u} = 3/2 \bar{\zeta} [(1 - Du \{4 \ln \cosh \bar{\zeta}/4\} / \bar{\zeta}) / (1 + 2 Du)] \quad (11)$$

ahol $\bar{u}$ a dimenzió nélküli mozgékonyaság, $\bar{\psi}_s$ és $\bar{\zeta}$ a dimenzió nélküli potenciálok.

Látható, hogy a ζ -potenciál számításához ismernünk kell a

ψ_s -potenciál értékét, ami független- konduktometriás vagy relatív permittivitás - mérésekből határozható meg.

A fentiek illusztrálására bemutatom emulgeátortól mentes gömb alakú polisztirol latex részecskéken végzett konduktometriás és elektroforetikus vizsgálataim eredményét, melyek jól szemléltetik az EKR polarizációja figyelembevételének fontosságát az elektrokinetikai potenciál számításánál. A részecskék sugara 530 nm volt, az elektroforetikus vándorlás sebességét mikroelektroforetikus cellában, az elektromos vezetést pedig 2, 5 kHz frekvenciájú váltófeszültség mellett platina elektródok között a¹⁴ tanulmányban leírt módon mértem. Az alkalmazott frekvencia lényegesen kisebb a részecskék kettősrétegének polarizációjából származó kritikus frekvenciájánál, amit a $\nu_{cr} = D/\pi a^3$ (D -az ellenionok diffúziós koefficiense) összefüggésből^{19,18} számoltam.

Az 1. ábrán a szuszpenzió $\bar{K}/K$ relatív elektromos vezetésének változását mutatom be a részecskék p térfogati törtségének függvényében különböző NaCl koncentrációknál. Látható, hogy a függvények az adott rendszerben egyenesek (ez arra utal, hogy a részecskék között nincs számottevő aggregáció), hajlásszögük az elektrolit-koncentrációval csökken, és $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l NaCl tartalom alatt $\bar{K} > K$, azaz a szuszpenzió vezetése- az EKR fejlett diffúz részében lévő ionok hozzájárulása következtében - nagyobb, mint a közegé. A függvények meredekségéből a Du -szám értékét az (8) egyenletből számítottam, s ebből az (7) összefüggés alapján meghatároztam továbbá az adott elektrolit-koncentrációra érvényes Stern-potenciál, ill. a részecskék fajlagos felületi vezetése nagyságát. Az elektrokinetikai potenciál értékét a részecskék ef mozgékonyaságából három elképzelés alapján számoltam: (1) a Smoluchowski-féle egyenlettel, azaz az EKR polarizációjának mellőzésével- ζ_{sm} , (2) Wiersema táblázatainak adatai felhasználásával, azaz a kettősréteg hidrodinamikailag mobil része polarizációjának figyelembevételével- ζ_w és (3) a Dukhin-Semenikhin összefüggés alapján, azaz a kettősréteg egész diffúz része polarizációjának figyelembevételével- ζ_{d-s} . A ψ_0 felületi potenciál értékét a részecskék potenciometrikusan meghatározott σ_0 felületi töltéssűrűségéből számoltam a klasszikus Guy-Champan összefüggésből a^{14,15,20} tanulmányaimban leírtak alapján. A kapott eredményeket az alábbi táblázatban összegeztem (1. Táblázat). A fenti (és más rendszerekre érvényes hasonló^{15,20}) adatokból az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A latex részecskék felületi potenciálja közelíti a szuszpenzió relatív vezetéséből számolt Stern-potenciál értékeket, de mindkettő lényegesen meghaladja az elektrokinetikai potenciál nagyságát még abban az esetben is, ha az utóbbit (ζ_{d-s}) az EKR teljes diffúz része polarizációjának figyelembevételével számoltam. Ez jelentős vastagságú hidrodinamikailag immobil folyadékréteg jelenlétére utal a felület és hasadási sík közötti térrészben. Ez azt jelenti, hogy téves az irodalomban elterjedt nézet, hogy elegendő a ζ -potenciált helyesen, azaz a kettősréteg polarizációjának figyelembevételével meghatározni és ez egyenlő lesz a ψ_s -potenciál értékével¹⁹. A $\psi_s \gg \zeta$ feltételt számos rendszerben, pl. agyagásvány-, oxid-, antimon-szulfid részecskék, élesztő-sejtek, különböző olaj a vízben emulziócseppek esetében figyeltem meg (lásd^{15,20} összefoglalót).

1. Táblázat: Polisztirol részecskék elektromos felületei paraméterei

NaCl konc. mol/l	κa	ψ_0 , mV σ ₀ -ból	Du	ψ_0 , mV K/K-ból	u, μm.cm/V.sec	$\kappa^\circ \cdot 10^9$, Ohm ⁻¹	ζ_{Sm} mV	ζ_w mV	ζ_{D-S} mV
5.10 ⁻⁵	6,3	257			3,5		45	70	
10 ⁻⁴	9,0	240			4,2		53	86	
2.10 ⁻⁴	12,6	222	7,0	225	4,4	4,9	56	88	137
5.10 ⁻⁴	19,3	199	1,3	163	5,1	3,7	66	100	126
10 ⁻³	28,6	182	0,64	158	3,2	4,5	42	50	66
5.10 ⁻³	64,1	142	0,31	145	2,9	4,5	36	40	48
10 ⁻²	90,8	125	0,14	120	2,6	4,4	33	34	38
5.10 ⁻²	202	86	0,03	76	1,4	4,3	18	18	18
10 ⁻¹	320	47	0,01	45	0,9	4,3	11	11	11

2. Az elektrokinetikai potenciál értékek az ionerősség növekedésével maximumot mutatnak, ami nézetem szerint szintén az EKR polarizációjának következménye, ti. az elektrolit-koncentráció csökkenésével a Du szám és az ennek megfelelő dipólmomentum növekszik, lásd az (5) egyenletet. Mivel ez az indukált dipólus nyomaték ellentétes irányú a külső elektromos tér vektorával, a növekvő dipólmomentum a részecskék fékezéshez, elektroforetikus mozgékonyaságuk csökkenéséhez vezet, ami magyarázza az u(C) vagy ζ(C) függvények maximum előtti felszálló ágát.

3. Híg és mérsékelt híg elektrolit-oldatokban (vizsgált polisztirol latex szuszpenzióban < 10⁻² mol/l), melyeknél a Du paraméter értéke nem sokkal kisebb egynél, jelentős különbségek figyelhetők meg az elektrokinetikai potenciálnak az EKR polarizációjának figyelembevétele vagy e nélkül számított értékei között, az adott rendszerben $\zeta_{Sm} < \zeta_w < \zeta_{D-S}$. Hasonló összefüggéseket tapasztaltam a legtöbb-AgI kivételével- általam vizsgált kolloid rendszerben^{14,15,20}. A különböző módszerekkel számolt ζ-potenciál értékek csak aránylag tömény elektrolit oldatokban, melyekben Du << 1, közelítenek egymáshoz, azaz - bizonyítva a fent vázolt elképzelések helyességét - amikor az EKR polarizációja elhanyagolható.

Összegezve a fent vázolt elképzeléseket, elmondható, hogy: (1) az irodalomban található nagyszámú adat a diszpergált részecskék elektrokinetikai potenciáljáról sok esetben nem helytálló, mert a szerzők a ζ-potenciál számításánál nem vették figyelembe az EKR polarizációját, (2) az elektrokinetikai potenciál számításoknál nem elegendő az EKR hidrodinamikailag mobil részében lévő ionfelhő polarizációjának figyelembevétele (Wiersema módszere szerint), mert a reális kolloidrendszerek többségében az ellenionok döntő hányada a Stern-réteg és hasadási sík között elterülő immobilizált folyadékrétegben található, (3) az EKR teljes diffúz rétegében lokalizált ionfelhő polarizációjának figyelembevétele Du > 1 feltételnél kötelező, ebben az esetben a pontos ζ-potenciál számításokhoz (pl. a Dukhin-Semenikhin összefüggésből) szükséges a Stern-potenciál értékének ismerete, ami független felületi vezetés vagy dielektromos permittivitás- szórás mérések alapján határozható meg.

Összefoglaló.

Összefoglaltam az elektromos kettősréteg külső elektromos térben megvalósuló polarizációjának hatását a kolloid részecskék elektroforetikus mozgékonyaságára és ebből számított ζ-potenciál értékére. Kimutattam, hogy: (1) az irodalomban található nagyszámú adat a diszpergált részecskék elektrokinetikai potenciáljáról sok esetben nem helytálló, mert a szerzők a ζ-potenciál számításánál - a klasszikus Smoluchowski-egyenlet alkalmazásával - nem vették figyelembe az elektromos kettősréteg (EKR) polarizációját, (2) az elektrokinetikai potenciál számításoknál nem elegendő az EKR hidrodinamikailag mobil részében lévő ionfelhő polarizációjának figyelembevétele (Wiersema módszere szerint), mert a reális kolloidrendszerek többségében az ellenionok döntő hányada a Stern-réteg és hasadási sík között elterülő immobilizált folyadékrétegben található, (3) az EKR teljes diffúz rétegében lokalizált ionfelhő polarizációjának figyelembevétele Du > 1 feltételnél kötelező, ebben az esetben a pontos ζ-potenciál számításokhoz (pl. a Dukhin-Semenikhin összefüggésből) szükséges a Stern-potenciál értékének ismerete, ami független felületi vezetés vagy dielektromos permittivitás- szórás mérések alapján határozható meg, (4) a fent vázolt elképzelések helyességét polisztirol latex szuszpenzió elektrokinetikai potenciál és felületi vezetőképesség mérések és számítások alapján bizonyítottam.

Köszönetnyilvánítás.

A kutatást az OTKA T043360 sz. téma keretében valósítottam meg. A támogatást hálásan köszönöm.

Irodalom

1. Kryut, H.R. (Ed.) *Colloid Science*, vol. 1, Elsevier: Amsterdam-Houston- New York- London, **1952**, pp. 1-538.
2. Lyklema, J. *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, vol. II, Academic Press: London-San Diego-New York, etc., **1995**, pp.4.1-4.135.
3. Evans, D. F.; Wennerström, H. *The Colloidal Domain Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*, VCH Publishers: New York-Weinheim-Cambridge, **1994**, pp. 350-365.

4. Shilov, V.; Barany, S. *Grosse C. Advances Colloid a. Interface Sci.* **2003**, *104*, 159-173.
5. Henry, D. C. *Proc. Roy. Soc. London* **1931**, *133*, 106-122.
6. Overbeek, J. Th.G. *Kolloidchem. Beihefte* **1943**, *54*, 287-303.
7. Booth, F. *Proc. Roy Soc.* **1950**, *A20*, 514-526.
8. Wiersema, P.H. *On the Theory of Electrophoresis*. Utrecht, Rijksuniversitet, **1934**. pp. 1-98.
9. Dukhin, S.S. *Elektroprovodnosty i elektrokineticskiye szvojsztva diszpersznh szisztem*, Naukova Dumka Kiadó: Kijev, **1975**, 1-246 ol. (orosz nyelven).
10. Dukhin, S.S.; Derjagin, B.V. *Elektroforez*, Nauka Kiadó: Moszkva, **1976**. 1-328 ol. (orosz nyelven).
11. Dukhin, S.S. (Ed), *Elektrooptika kolloidov*, Naukova Dumka Kiadó: Kijev, **1977**, 1-200 (orosz nyelven).
12. Fridrichsberg, D.A.; Barkovskii V.Ya. *Kolloidn. Zhurnal.* **1964**, *26*, 722-730.
13. Sidorova, M.P.; Semina, L.A.; Fridrichsberg D.A. *Kolloidn. Zhurnal* **1976**, *38*, 722-725.
14. Baran, A.A.; Dudkina, L.M.; Soboleva, N.M. *Kolloidn. Zhurnal* **1981**, *43*, 211-219.
15. Barany, S. *Advances in Colloid a. Interface Sci.* **1998**, *75*, 45-78.
16. Hidalgo-Alvarez; Moleon, J.A.; Nieves, F.J.; Bijsterbosch J. *Colloid Interface Sci.* **1992**, *149*, 23-34.
17. Dukhin, S.S.; Shilov, V.N. *Dielectric Phenomena and the Double Layer in Disperse Systems and Polyelectrolytes*, Wiley: New York, **1974**, 1-204 pp.
18. Dukhin, S.S.; Semenikhin, N.M. *Kolloidn. Zhurnal* **1975**, *37*, 1127- 1132.
19. Hunter, R.J. *Foundation of Colloid Science*, Chapt. 13, Oxford University Press: Oxford, 1989.
20. Bárány, S. *Kémiai Közlemények* **1989**, *70*, 237-254.

On the use of the Smoluchowski equation in the calculation of the electrokinetic potential

The effect of the electrical double layer polarization in external electric field on the electrophoretic mobility of dispersed particles and calculated zeta-potential values is considered. It has been shown that: (1) a considerable number of literature data on electrokinetic potential of dispersed particles is not acceptable because the authors did not take into account the electric double layer (EDL) polarization, using by calculations the classical Smoluchowski equation, (2) to determine the ζ -potential it is not enough to take into consideration the polarization of the ionic cloud in the hydrodynamically mobile part of the EDL (using the Wiersema method) because in the majority of real

colloid systems the main part of counterions is localized in the hydrodynamically immobilized liquid layer situated between the Stern-layer and the slip plane, (3) the account of the EDL whole diffuse layer polarization is compulsory at $Du > 1$ condition, in this case calculations of the exact values of the ζ -potential can be performed by Dukhin-Semenikhin equation with using also the Stern-potential values that should be determined by independent measurements of surface conductivity or dispersion of low-frequency permittivity of the suspension, (4) validity of the above mentioned considerations was proved by electrokinetic and surface conductivity measurements and calculations of polystyrene latex suspensions.

Molekuláris lenyomatú polimerek: kombinatorikus előállítás, nemlineáris kromatográfia és pszeudo-immunanalitika

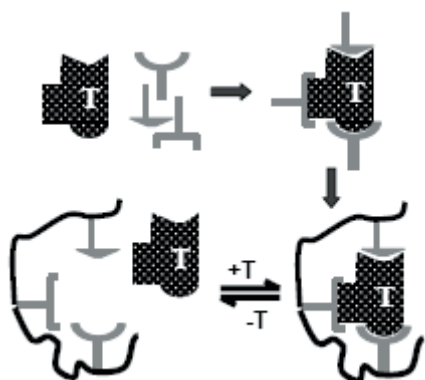
TÓTH Blanka, PAP Tímea, HORVÁTH Viola*, HORVAI György

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Kémiai Informatika Tanszék és *MTA Műszaki Analitikai Tanszéki

Kutatócsoport 1111, Budapest Szt. Gellért tér 4.

Bevezetés

A molekuláris lenyomatú polimerek („molecularly imprinted polymer”, MIP) szelektív szorbensek. Különleges tulajdonságaikat előállítási módjuknak köszönhetik. A polimert a szelektíven megkötni kívánt anyag – ami lehet viszonylag egyszerű szerves molekula, pl. gyógyszer vagy növényvédőszer, de lehet akár makromolekula vagy sejt is – jelenlétében állítják elő. Kovalens kötésen alapuló lenyomatképzés esetén a célmolekula („templát”) és a monomerek között előzetesen alakítanak ki reverzibilis kovalens kötést, ami a templát és a monomerek kapcsolódási módját és geometriáját rögzíti. Nemkovalens kölcsönhatáson alapuló lenyomatképzéskor a monomer(ek) és a közeg célszerű megválasztásával általában elérhető, hogy a polimerizációs elegyben a megköttendő anyag és a monomer molekulák között önrendeződés révén jelentős intermolekuláris kölcsönhatások jöjjenek létre. Az így kialakult térbeli elrendezés a polimerizáció során keresztkötő segítségével rögzül, kialakul a szilárd polimer, a MIP.

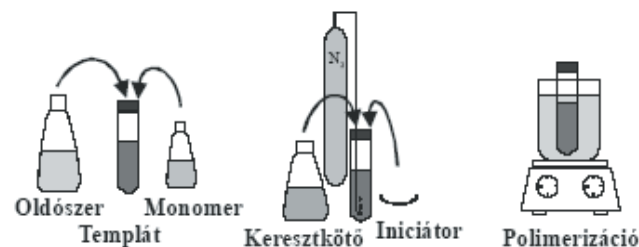


1. Ábra. A molekuláris lenyomatképzés sematikus menete (T=templát)

A templátot a MIP-hez kötő reverzibilis vagy másodlagos kötőerők valamilyen alkalmas, többnyire kompetitív reagens segítségével megbonthatók, és így a megkött anyag a polimerről leoldható. Visszamaradnak azonban a már kialakult kötőhelyek, vagyis a kiválasztott anyag térbeli és kémiai lenyomata. Ezért beszélünk molekuláris lenyomatképzésről. A polimer a templátot képes oldataiból szelektíven adszorbeálni az említett lenyomatszerű kötőhelyekre. Az adszorbeált anyag azután alkalmas lemosószerrel ismét eltávolítható. Így a molekuláris lenyomatú polimer újrahasználatos.

A molekuláris lenyomatú polimerek iránti nagy érdeklődést elsősorban az indokolja, hogy a fent ismertetett eljárás szinte bármilyen molekulára szelektív szorbens előállítását lehetővé teszi az önrendeződési elv alapján, azaz a bonyolult

szintézisek elkerülésével. A MIP készítés legegyszerűbb módja a tömbpolimerizációs előállítás (2. ábra). Az első lépés a templát, az oldószer és a monomer összekeverése, ekkor kialakulnak a templát-monomer komplexek. Ezután adjuk hozzá a keresztkötő és az iniciátort, majd oxigénmentesített (általában nitrogénnel) atmoszférában lejártszátjuk a polimerizációt. A kapott tömbpolimert összetörjük és szitáljuk, majd a templátot kioldjuk belőle.



2. Ábra. A polimer szintézis menete (nem kovalens kölcsönhatáson alapulva).

Az így kapott szemcsés szorbens fizikai és kémiai módszerekkel tesztelhető (szemcseméret, pórusméret eloszlás, sűrűség, valamint - kromatográfias vagy szilárd fázisú extrakció (SPE) oszlopba töltve - elúciós és szelektivitás jellemzők), de a gyakorlati felhasználás és nagy mennyiségben való előállítás hatékonyabb módszerek kifejlesztését igényli.

Az 1. táblázatban néhány példát mutatunk be molekuláris lenyomatú polimerekre és azok lehetséges alkalmazására. A téma bőséges irodalmából csupán néhány friss összefoglaló közleményt¹⁻⁵, egy könyvet⁶ és két magyar nyelvű értekezést⁷⁻⁸ említünk.

Közleményünkben a továbbiakban csak a kis molekulák nemkovalens kölcsönhatáson alapuló polimer lenyomataival foglalkozunk. Célunk bemutatni néhány új, általános módszert e különleges polimerek előállítására és alkalmazására. Hangsúlyosan tárgyaljuk azokat a módszereket és számítási eredményeket, amelyek létrejöttében aktívan részt vettünk.

A nemkovalens lenyomatképzés technológiájából adódóan a kapott polimerek sajátos tulajdonságokkal rendelkeznek. Az önrendeződés a tapasztalatok szerint általában nem elég erős ahhoz, hogy csupa egyforma kötőhely alakuljon ki. Emiatt a kötőhelyek kötőerőssége és szelektivitása elég széles skálán változhat egyazon anyagon belül is. A kötőhelyek hozzáférhetősége sem egyforma. Gyakorlati célra készülő szorbenseknél természetesen fontos a kötőhelyek könnyű, vagyis gyors hozzáférhetősége. Ezért a molekuláris

lenyomatú polimereket u.n. porogén oldószerekben szokták előállítani. Így nagy fajlagos felületű, mezopórusos anyag jön létre és a kötőhelyek elsősorban a pórusfelületeken alakulnak ki.

1. Táblázat. Molekuláris lenyomatú polimerek néhány alkalmazása

Célvegyület	Minta	Módszer
Clenbuterol	Vizelet	SPE
L-fenilalanin anilid	Puffer, oldószer	Királis HPLC
Teofillin	Vér	Mesters. ellenanyag
Oxidációs termékek	Motorolaj	Tömeg szenzor
Triazinok	Vizek	SPE

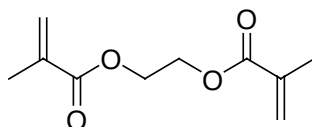
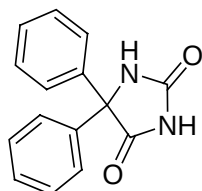
Kombinatorikus előállítás

A molekuláris lenyomatú polimerek előállításánál számos technikai nehézséget kell megoldani. Ilyenek például:

- alkalmas monomert és keresztkötőt kell találni, amely(ek) a lenyomatképző molekulával megfelelő kölcsönhatásba tudnak lépni,
- a porogén oldószer oldja jól a monomereket és a lenyomatképző anyagot, de ugyanakkor ne lépjen erős másodlagos kölcsönhatásba a lenyomatképzővel, mert akkor gátolná a monomerek és a lenyomatképző közti kötődést,
- a lenyomatképzőt könnyen és teljesen el lehessen távolítani a polimerből a szintézis után.

Ezek a problémák gyakran nehéz helyzet elé állítják még a legrutinosabb szintetikus vegyészeket is. Ezért célszerűnek látszott a vegyész által elképzelhetőnek tartott nagy számú lehetőség közül egy gyors előkísérlet sorozattal választani ki a legmegfelelőbbeket. A feladat nem volt egyszerű, mert a hagyományos módszerekkel egy új polimer tisztítása és jellemzése több napos feladat, ezért túl sok alternatíva kipróbálása nem jöhetett szóba. A megoldást a más területeken már divatos kombinatorikus módszer alkalmazása jelentette. (Tulajdonképpen nem a kombinatorikus jelleg dominált itt, hanem a kombinatorikus módszereknél használt nagy áteresztőképességű automatizált technika átvétele).

A megoldást egy konkrét példán mutatjuk be. A cél a fenitoin (difenil-hidantoin, 3. ábra) nevű gyógyszerre szelektív MIP előállítása volt. A fenitoint az amid csoportjai miatt célszerűnek látszott hidrogén hidas kötéssel kötni a polimerhez. Ezt a célt – elvben – sokféle monomerral el lehet érni. Keresztkötőként a már jól bevált EDMA-t (etilén-glikol-dimetakrilát, 3. ábra) akartuk használni. A fenitoin a szokásos porogénekből (pl. diklórmétán, toluol, acetonitril) rosszul oldódik, a jó oldószerei (pl. alkoholok, éterek) viszont gyengítik a monomerral képzett másodlagos kötéseket. Ezért a jó porogének és a jó oldószerek elegyeivel próbálkoztunk.



3.Ábra. Fenitoin és EDMA

Először is tizenkét különböző monomert vizsgáltunk meg, a polimerizációt acetonitril és tetrahydrofurán 70/30 v/v elegyében hajtva végre, fenitoin jelenlétében illetve anélkül. Utóbbi módon a kontroll, nem-imprintelt polimereket (NIP) állítottuk elő. A tizenkét monomer közül csak kettő bizonyult alkalmasnak a fenitoinnal való lenyomatképzésre. Ezekkel a monomerekkel azután négyféle oldószerkeletben készítettünk MIP-et illetve NIP-et, és a kapott polimerek kötőképességét két-két közegben vizsgáltuk. Így összesen negyven polimert állítottunk elő és vizsgáltunk be. A hagyományos módszerekkel mindez közel egy évi munkát adott volna egy kémikusnak. Ehelyett – a polimerizáció és a tesztelés miniaturizálásával, integrálásával és robotizálásával – a teljes vizsgálat egy hét alatt valósult meg⁹.

Nemlineáris kromatográfia

A molekuláris lenyomatú polimerek potenciális alkalmazási területeinek egyike az elválasztástechnika. Már számos példát írtak le a kromatográfiás, szilárd fázisú extrakciós, elektroforetikus és hasonló alkalmazásokra. Különösen sokat foglalkoztak a királis kromatográfiái alkalmazásokkal. A MIP-ek szelektív adszorpciós tulajdonságai bizonyos fokig tervezhetően változtathatók az egyetlen vegyületre való szelektivitás és egy adott vegyületcsoportra való szelektivitás között. Mindez jól hasznosítható például a mintaelőkészítésben. Erre a célra már kereskedelembe is kapható MIP és újabb termékek forgalmazását is ígérjük.

A nagy teljesítményű kromatográfiás (HPLC) alkalmazásokat bemutató közleményekben általában olyan elválasztásokat mutatnak be, ahol a szelektivitás kiváló de az oszlop hatékonysága rendkívül alacsony. A rossz hatékonyság, vagyis a jelentős csúcscsúszódás, valamint a csúcsok feltűnő aszimmetriájának (tailing) magyarázatául általában a MIP szemcsék nem gömbszerű alakját, túl nagy méretét és a méreteloszlás széles voltát hozzák fel. Ezek a tulajdonságok a MIP-ek legegyszerűbb előállítási módszerének (tömbpolimerizáció) a következményei. Az utóbbi években számos eredményes kísérletet tettek homogén, gömb alakú és néhány mikrométer átmérőjű MIP szemcsék előállítására. Mindez azonban nem sokat javított a helyzeten. Egy másik magyarázat szerint az említett problémákat a MIP kötőhelyeinek inhomogenitása okozza. Ezért többen is foglalkoznak a kötőerősség szempontjából homogénebb MIP-ek előállításával.

A hosszan elnyúló csúcsalakokra a legjobbnak tűnő magyarázatot azonban Guiochon és munkatársai adták¹⁰. Ők néhány MIP esetében sikeresen bizonyították, hogy a csúcsok torzulása elsősorban termodinamikai okokra vezethető vissza, nevezetesen az adszorpciós izoterma nemlineáris volta.

A nemlineáris izoterma az analitikai kromatográfiában egy ismert, de lehetőleg elkerülendőnek tartott jelenség. A vegyész-mérnökök, illetve a preparatív kromatográfusok számára viszont éppen ez a megszokott, ugyanis a preparatív munkáknál olyan nagy koncentrációkkal dolgoznak, ahol az izoterma már gyakorlatilag mindig elhajló. Ráadásul az elválasztandó anyagok egymás adszorpcióját és így retencióját is befolyásolják, ami az analitikai kromatográfiában szintén szokatlan.

A MIP-eknél ugyanezek a jelenségek fellép(het)nek, de már az analitikai koncentráció-tartományban, sőt még akár az alsó méréshatárnál is.

Guiochon és munkatársainak eredményei a MIPEkkel foglalkozó analitikusok és szerves kémikusok körében nem találtak nagy visszhangra. Ebben szerepe lehet a nemlineáris kromatográfia erősen matematizált voltának. Ugyanilyen fontos azonban, hogy a szerzők nem mutattak rá a nemlineáris kromatográfias viselkedésnek azokra az általános következményeire, amelyeket a MIP-ekkel dolgozóknak feltétlenül figyelembe kellene venniük. Az alábbiakban ezeket a következményeket tekintjük át.

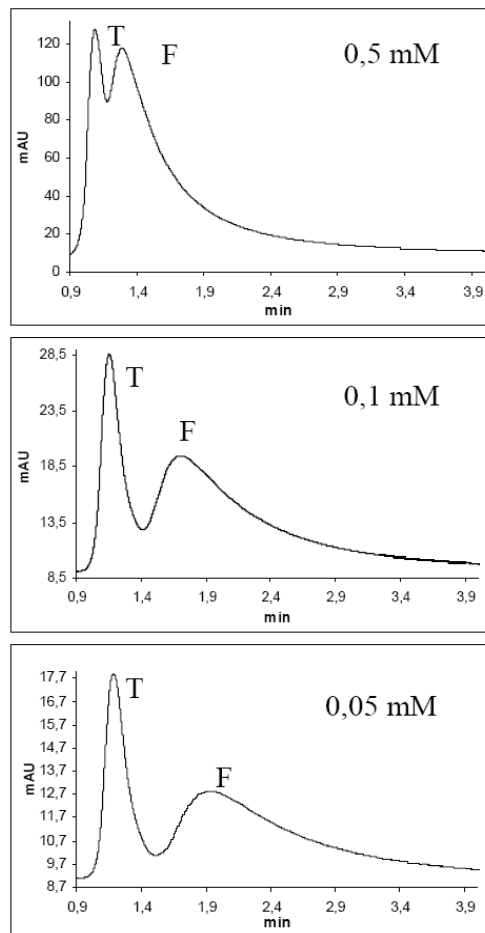
A MIP-ek legfontosabb tulajdonságának, a lenyomatékpézés következtében létrejött szelektivitásnak a jellemzésére kétféle mérőszámot használnak: a kromatográfias MIP oszlop szelektivitását (α), illetve a MIP oszlopon és a kontroll polimerből (NIP) készült oszlopon a templátra mért retenciós tényezők hányadosát (IF: imprinting factor). A számításhoz szükséges retenciós tényezőket a csúcsmaximumok helyéből állapítják meg. Ezek az adatok sajnos értelmüket veszítik ha a vizsgált anyagok adszorpciós izotermája annyira nemlineáris, hogy a csúcsalakot döntően az izoterma szabja meg. Márpedig Guiochon szerint és a mi tapasztalataink szerint is ez a helyzet, sőt az irodalomban közölt kromatogramok alapján joggal feltételezhető, hogy mások MIP-jei is így viselkedtek.

Az előbbi állítás bizonyítására megmutatjuk, hogy a szelektivitás mért értéke nagymértékben függ a beinjektált anyagok koncentrációjától illetve a minta mennyiségétől. Ennél is élesebben fogalmazva: minél alacsonyabb alsó méréshatárú detektort használunk, annál szelektívebbnek fogjuk találni ugyanazt a MIP oszlopot. A 4. ábra saját méréseink alapján mutatja, hogy egy fenitoin lenyomatú polimerből készült oszlopon (50x3mm) a fenitoin és a timin elválasztása javul a minta hígításával.

A nemlineáris kromatográfia sajátjaiból következően helytelenek azok a törekvések, amelyek a kötőhelyek kémiai sajátosságainak homogenizálásával vagy a tányérszám növelésével próbálják a csúcsok alakját javítani. A kötőhelyek homogenitása esetén az izoterma nem lineáris, hanem Langmuir típusú lesz, ami szintén egy nemlineáris izoterma. Ez csak akkor tekinthető közel lineárisnak, ha a telítési kapacitásnak csak a töredékét használjuk ki, tehát az izoterma kezdeti szakaszán. A kötőhelyek homogenitása tehát csak akkor hatásos, ha egyidejűleg nagy koncentrációban tudjuk előállítani őket, ami viszont jelenleg nem oldható meg könnyen. A tányérszám növelésével sem sikerült eddig jelentős javulást elérni. Ennek oka – legalább részben - hogy a nemlineáris kromatográfiában a tányérszám alig befolyásolja a csúcsok szélességét.

A gyakorlat számára talán legfontosabb következtetés az elmondottakból az, hogy az újonnan előállított MIP-ek jellemzésére feltétlenül meg kell mérni a lenyomatékpéző anyag izotermáját. Hasznos lehet továbbá a potenciális zavaró illetve elválasztandó anyagok izotermáját is megmérni, sőt vizsgálni kell a lenyomatékpéző és az elválasztandó anyag együttes adszorpcióját is, mert kölcsönhatások lehetségesek. A kölcsönhatás (amitől a

fentiekben az egyszerűség kedvéért eltekintettünk) többféle típusú lehet. Leggyakrabban a kötőhelyekért való versengés fordul elő, de mi arra is találtunk példát, amikor a két anyag kölcsönösen növelte egymás adszorpcióját¹¹.



4. Ábra. Fenitoin (F) és timin (T) elválasztásának javulása a minta hígításával. A megadott koncentrációértékek mindkét anyagra vonatkoznak. F=0,5ml/min, eluens: acetonitril, $\lambda=220\text{nm}$, $V_{inj}=10\mu\text{l}$

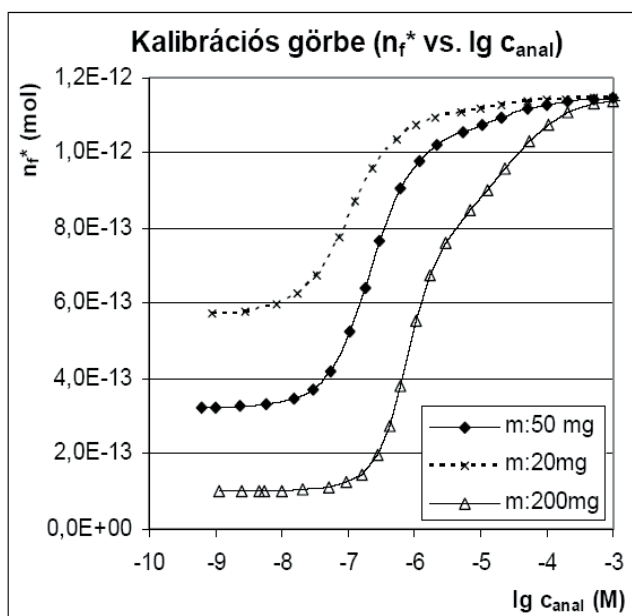
Pszedo immun-analitika

A molekuláris lenyomatú polimerek érdekes alkalmazási területe az immunreagens helyettesítése. Egyes MIP-ek az ellenanyagokhoz hasonló szelektivitással és nagy egyensúlyi állandóval kötik meg a lenyomatékpéző anyagot. Ugyanakkor a MIP sokkal stabilabb mint az ellenanyag, reprodukálhatóan állítható elő és alkalmazásával elkerülhetők az állatkísérletek is.

Többen alkalmaztak már sikerrel MIP-eket olyan mérésekre, amelyeket hagyományosan ellenanyagok segítségével oldanak meg. Legtöbbször valamelyik versengő módszert használták, vagyis a mérendő anyag egy jelzett anyaggal versenyzett a polimer kötőhelyeiért. Jelzett anyagként gyakran alkalmazták a lenyomatékpéző molekula tríciummal nyomjelzett változatát. Ebben az esetben a versengő anyagok kémiaiailag azonosnak tekinthetők. A továbbiakban csak ezzel az esettel (u.n. homolog versengés) foglalkozunk.

Az ellenanyagok helyettesítésére használt MIPEkkel a kutatók ugyanúgy optimalizálták a mérési körülményeket mint ahogy az

az immunanalitikában régóta szokásos. Ezek a módszerek rengeteg kísérletet igényelnek és nem szolgáltatnak olyan adatokat, amelyek birtokában a mérés egy másik feladathoz könnyen újra optimálható lenne. A közelmúltban sikerült megmutatnunk¹², hogy az első optimáláskor elvégzett mérésekből meghatározható a MIP izotermája, ez utóbbi ismeretében pedig a módszer más feladatokra, például más lineáris tartományra, más alsó méréshatárra, más jel/zaj viszonyú detektorra egyszerű számítással újra optimálható. Az 5. ábra például azt mutatja, hogy ha megváltoztatjuk a minta és a polimer mennyiségének viszonyát, az új jelleggörbe könnyen számítható. Így céljainknak megfelelően változtathatjuk például az alsó méréshatárt és rögtön láthatjuk ennek következményeit a többi mérési jellemzőkre, például a hasznos méréstartományra.



5. Ábra. (S)-propanolol izotermájából számított kalibrációs görbék különböző polimer mennyiség esetén (assay térfogat és a jelzett propanolol mennyiség állandó)

Munkánk érdekes következtetéseként azt találtuk, hogy míg a kromatográfiás alkalmazásoknál a nemlineáris izoterma megnehezíti a MIP-ek alkalmazását, addig az immunanalitikai típusú alkalmazás kizárólag akkor lehetséges, ha az izoterma nemlineáris. A kétféle alkalmazáshoz tehát másképp kell optimalálni a MIP előállítási eljárásokat.

Molecularly imprinted polymers: optimization of their preparation by combinatorial methods and applications in non-linear chromatography and binding assays.

Molecularly imprinted polymers are selective polymeric sorbents. They may be prepared for almost any adsorbent by self-organization principles. Miniaturization and automation of their preparation and testing is feasible and speeds up the optimization

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki a hivatkozott eredeti közleményeink társszerzőinek, munkánk anyagi támogatásáért az *Institut de Recherches Internationales Servier*-nek (*I.R.I.S. France*), az *OTKA*-nak (T048912) és az *NKTH*-nak (NKFP 3/043/2001)

Összefoglalás

A közlemény önrendeződéssel képződő, szelektív polimer szorbenseket, u.n. molekuláris lenyomatú polimereket ismertet. Megmutatja, hogy az előállítás és tesztelés miniaturizálásával és automatizálásával felgyorsítható és gépesíthető az a folyamat, amelyben tetszőleges megkötni kívánt vegyülethez megtaláljuk a megfelelő polimerizációs recepturát. A molekuláris lenyomatú polimerek alkalmazási lehetőségei közül két fontos területet mutat be a cikk: a kromatográfiát és a polimerek mesterséges ellenanyagként való felhasználását. Konkrét példákön keresztül rámutat arra, hogy a molekuláris lenyomatú polimereket alkalmazó technikák optimalizálását a polimer adszorpciós egyensúlyi izotermájának ismeretére célszerű alapozni.

Irodalom

1. Mahony, J.O.; Nolan, K.; Smyth, M.R.; Mizaikoff, B. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *534*, 31.
2. Kandimalla, V.B.; Ju, H.X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 587.
3. Turiel, E.; Martin-Esteban, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1876.
4. Ansell, R.J. *J. Chrom. B* **2004**, *804*, 151.
5. Alexander, C.; Davidson, L.; Hayes, W. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2025.
6. Sellergren, B. (Ed.) *Molecularly Imprinted Polymers*, Elsevier: Amsterdam, **2001**.
7. Berezki, A. PhD értekezés, Budapest, **2003**, <http://phd.om.hu>
8. Pap, T. PhD értekezés, Budapest, **2004**, <http://phd.om.hu>
9. Lanza, F.; Hall, A.J.; Sellergren, B.; Berezki, A.; Horvai, G.; Bayoudh, S.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 91.
10. Sajonz, P.; Kele, M.; Zhong, G.; Sellergren, B.; Guiochon, G. *J. Chrom. A* **1998**, *810*, 1.
11. Pap, T.; Horvai, G. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1034*, 99.
12. Pap, T.; Horvai, G. *J. Chrom. B* **2004**, *804*, 167.

process. Two important fields of application for the imprinted polymers are chromatography and binding assays. Method optimization in both applications may be accelerated by measuring and using the corresponding adsorption isotherms.

Kapcsolt termoanalitikai módszerek vékony filmek technológiájának fejlesztésében

MADARÁSZ János,^{a,*} Lauri NIINISTÖ^b és POKOL György^a

^{a)}Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Általános és Analitikai Kémia Tanszék, Gellért tér 4, H-1521 Budapest, Hungary

^{b)}Laboratory of Inorganic and Analytical Chemistry, Helsinki University of Technology, P.O.Box 6100, FIN-02015 Espoo, Finland

1. Bevezetés

A termikus analízis, amelynek Magyarországon is nagy hagyományai vannak,^{1,2} leggyakrabban porított, ill. aprított formájú analitikai mintákat vizsgál. Azonban a termoanalitikai technikák és mérőberendezések, jelenlegi magas összetettségi szintjüknek köszönhetően már ma is képesek vizsgálni olyan hőmérséklet indukálta változásokat, amelyek vékony filmekben jelennek meg, ahol a rendelkezésre álló mintamennyiség csekély, rendszerint 1 mg/cm² alatt van. Ez kiszélesíti a termikus analízis alkalmazhatósági körét a vékonyfilm-technológiához, mely kulcsszerepet játszik új anyagok, folyamatok és eszközök kifejlesztésében, különösen a mikroelektronikai és optoelektronikai ipar számára.^{3,4}

Egyik nem túl régi példája a mind vékony rétegek mind porok formájában igen jelentős alkalmazási potenciállal bíró új anyagoknak a magas hőmérsékletű szupravezetők. A termikus analízist ezen új oxidkerámia anyagok tanulmányozására már rögtön a felfedezésük után alkalmazni kezdték, és különösen a szupravezetők szintézisében és a kívánatos oxigéntartalmuk, ill. oxigénstöchiometriájuk jellemzésére a termoanalitikai módszerek elengedhetetleneknek bizonyultak.⁵⁻⁷

Általában elmondható, hogy a termikus analízis most válik azon technikáknak az egyik gyakran használt csoportjává, amelyek képesek problémamegoldásra a vékonyfilmek formájában leválasztásra és jellemzésre kerülő anyagok körében. A termikus analízis megnövekedett használatának egyik oka, többek között, a vékony filmek kémiai leválasztási módszereinek a mind gyakoribb alkalmazása, amelyek során a prekursoranyagok és leválasztás kémiai folyamatai kényelmesen tanulmányozhatók a termikus analízis eszközeivel.

2. Vékony filmek és alkalmazásuk

Általános elfogadott definíció a vékony filmekre nincsen, de szokásosan a vastagságuk alapján definiálják őket, azaz az 1 µm alatti rétegeket vékony filmeknek nevezik. Egy másik definíció szerint vékony filmek mindazok a rétegek, amelyeket egy vékonyfilm-leválasztási módszerrel állítottak elő, még akkor is ha a tényleges rétegvastagságuk a néhány µm-t is meghaladja. Általában a legtöbb mikroelektronikai és optoelektronikai eszköz olyan vékony filmeket alkalmaz, amelyek rétegvastagsága 1 mikron alatt van.

1. Táblázat. Vékony filmek alkalmazásának néhány példája

Elektromos kontaktusok	Fémek, pl. Al, Cu, Ag, Au, W, Pt
Átlátszó vezetőfilmek	In ₂ O ₃ :Sn ⁴⁺ (ITO), SnO ₂ :F (FTO) ⁴³
Félvezető filmek	GaAs ⁴⁴
Fotovoltaikus filmek napelemekhez ⁴⁵	CdTe, CuInSe ₂
Szupravezető filmek ⁷	YBa ₂ Cu ₃ O _{7-δ} ^{8,46}
Szigetelő filmek, 'high k'	Al ₂ O ₃ , SiO ₂ , (ZrO ₂ , HfO ₂) ⁴⁷
Elektrolumineszcens filmek ⁴⁸	ZnS:Mn, SrS:Ce ³⁺ , ⁴⁸
Kopásálló rétegek	TiN, TiC
Gáz szenzorok	SnO ₂
Vékonyfilm kondenzátorok	BaTiO ₃ , PbTiO ₃
Piezoelektromos filmek	LiNbO ₃
Anti-reflexiós rétegek	CeO ₂

3. Vékony filmek leválasztásának módszerei

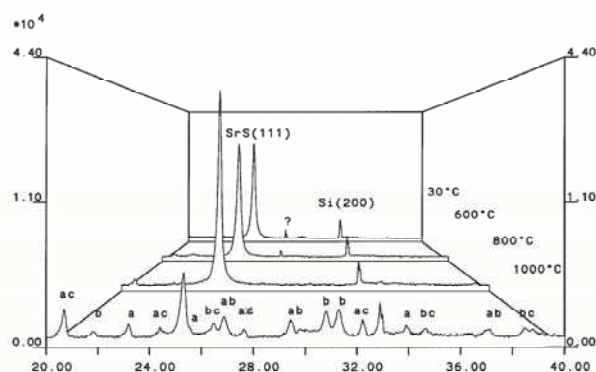
Praktikus módon úgy oszthatjuk két csoportba a vékonyfilm-leválasztások módszereit, hogyha leválasztási folyamat természetét tekintjük, ami lehet fizikai avagy kémiai. A fizikai módszerek a termikus és lézeres elpárologtatás, a molekulásugár-epitaxia (MBE) és az ionmaratás (sputtering) módszereit foglalják magukba. A kémiai módszerek gázfázisú és oldatos leválasztási technikák lehetnek. Gázfázisú módszer a kémiai gőzleválasztás (CVD)⁸ és annak egy érdemileg újszerű variánsa, az atomréteg-leválasztás/epitaxia (ALD, korábban ALE).^{9,10} A porlasztásos pirolízis, a szol-gél, a spin- és dip-befedés módszerei viszont prekursor oldatokat alkalmaznak. Mivel a végtermék szilárd halmazállapotú film, a CVD és ALD folyamatok magukba foglalják a szilárd vagy folyadék halmazállapotú prekursorok elpárologtatását, a gőzök mozgását, és az azt követő reakciót a hordozólap felületén, azaz náluk a halmazállapotváltozások sorozata: sz/f → g → sz. Az oldatos technikáknál a szekvencia csupán f → sz.

4. Termoanalitikai technikák a vékony filmek közvetlen tanulmányozásában

Bár a termoanalitikai alaptechnikák és kombinációik alapvetőek régi és új anyagok vizsgálatában és fejlesztésében, csak ritkán alkalmazzák őket közvetlenül magukra a vékony filmekre. Ez többek között amiatt van,

* Főszerző. Tel.: +36-1-463-4047 ; fax: +36-1-463-3408 ; e-mail: madarasz@mail.bme.hu

hogy a szokásos termoanalitikai technikák kimutatási alsó határa, ill. érzékenysége az esetek többségében nem megfelelő a filmminta nagyon kis mennyisége miatt, ill. azt is számba véve, hogy az a kevés filmminta is egy kiterjedtebb hordozó anyag tetején helyezkedik el.³ Gyakorlatilag egy módszer tekinthető kivételnek ez alól, mégpedig a magas hőmérsékletű röntgendiffrakció (HTXRD),¹¹⁻²¹ amely képes közvetlenül is felvenni a diffraktogramot egy-egy olyan vékony filmről is, amely csak kb. fél mikrométer vastagságban fekszik a hordozó tetején (1. ábra).



1.Ábra. In situ magas hőmérsékletű röntgendiffrakcióval (HT-XRD) (a) 28, (b) 600, (c) 800 és (d) 1000°C-on mért SrS thin film minta (630 nm). A csúcsok azonosítása 1000°C-on azt mutatja, hogy a vékony SrS film reagált a levegővel és a szilícium hordozó lapkával. Az azonosított fázisok: a=SrSO₄, b=SrSiO₄, c=SrSiO₃.¹⁵

Kedvező esetben, nagy érzékenységgű DTA/DSC berendezések iképesek lehetnek fázisváltozásokat közvetlenül is detektálni vékonyfilmekben. Leggyakrabban viszont a hordozóról eltávolított és összegyűjtött filmet lehet érdemben megvizsgálni ilyen módon.⁴ Különösen jó megoldás lehetőségét jelenti az, ha a vékonyréteget közvetlenül a vékonyréteg előállítási módszerekkel mikrofabrikált „nanokalorimetrias”, ill. „vékonyréteg DSC (TF-DSC)” Si₃N₄/Pt szenzoregység felületére választhatjuk le.²²⁻²³

Az ún. mikro-termikus analízis (μTA) vagy más néven pásztázó termikus mikroszkópia (SThM)²⁴ pedig oly módon teszi lehetővé a minták különböző területeinek jellemzését termikus tulajdonságaikkal (pl. olvadásponttal, lágyulási ponttal), hogy kombinálja az atomi térerő mikroszkópia képalkotó képességét a lokálisan elvégezhető termikus analízissel (kalorimetriás és termomechanikus mérések formájában). Ez a szerves polimer filmekben túlmenően szervesen vékonyfilmek elemzésére is lehetőséget nyújthat²⁵, másfelől a tűszonda az aktív fűtő és hőárammérő voltán túl pirolizáló kalorifer szerepet is nyerhet, amikor is a keletkező gőzöket, gázokat csapdázás után GC-MS berendezésbe deszorbeálthatják, ill. közvetlenül tömegspektrométerbe juttathatják²⁶. A tűszonda passzív hőmérsékletmérő szerepbe kerülhet, ha a mintára szélessávú IR-forrást fókuszálnak reflektáló optikával, s a mintahőmérsékletnek az abszorbeált sugárzás miatti emelkedését a szondával detektálják és felhasználják a minta reflexiós spektrumának rekonstruálására.^{26,27}

A fejlődőgáz-analízis (EGA) módszerei közül közvetlenül vékonyfilmekre történő alkalmazásra a

tömegspektrometria látszik legalkalmasabbnak.²⁸ Több szerző is tömegspektrométerrel vizsgálta GaAs típusú félvezetők aranykontaktussal való ellátásakor megjelenő As eltávozását.²⁹⁻³¹ Hasonló vizsgálat alá vetették GeSe filmeket is, ahol H₂Se távozását figyelték meg.³²

Az emanációs termikus analízis (ETA) érzékenysége is elegendően magas a vékonyfilmek közvetlen vizsgálatára, de a nyert adatok interpretálása nem igazán egyszerű, ill. egyértelmű.

Egy igen hatékony új termikus mérőberendezés a röntgendiffrakcióval szimultán kapcsolt differenciális pásztázó kaloriméter kombinációja (XRD/DSC),³³ amely kedvező esetekben talán vékonyfilmek közvetlen vizsgálatára is alkalmas lehetne.³⁴

5. Termoanalitikai technikák a vékony filmek képződési folyamatainak tanulmányozásában

A kép az eddigiektől egészen különböző lesz, ha a termoanalitikai módszerek alkalmazási lehetőségeit az előállítási folyamatok teljes láncolatában nézzük, a prekursoroktól a különböző alkalmazási célokat szolgáló vékonyfilmekig (2. ábra). Különösen az első lépés, a prekursorok szintézise és jellemzése kívánja meg a termoanalitikai technikák széles skálájának használatát. Például, alapvető információk nyerhetők az oldatos leválasztási (szol-gél, porlasztásos pirolízis) technikák folyamatairól, amikor a prekursorok hőbomlási reakcióit tanulmányozzuk a vékonyfilmek előállítását szimuláló körülmények között, célszerűen szimultán termogravimetria és differenciális termoeanalízis (TG/DTA) segítségével.

Prekursorok szintézise és jellemzése

- olvadáspontok, forráspontok mérése (DTA, DSC)
- tisztaságvizsgálat (DSC, DTA)
- illékonyágvizsgálat (TG)
- gázfázisú specieszek felderítése (TG-MS, TG-FTIR)
- a vékonyfilm-növekedési reakciók szimulációja (TG/DTA-ban)

Vékonyfilm-növesztés CVD-vel, ALD-vel

- in situ monitorálása
- a reaktor atmoszférájának MS-sel, FTIR-gázelemzővel
- a hordozó felületének spektroszkópiai módszerekkel
- a filmtömeg növekedésének kvarckristály-mérleggel

A vékonyfilmek jellemzése, vizsgálata

- termikus degradációjuk, TG-vel, EGA-MS-sel, ETA-val
- fázisátalakulásaik, magas hőmérsékletű XRD-vel
- reakciójuk a hordozójukkal, DTA/DSC, XRD

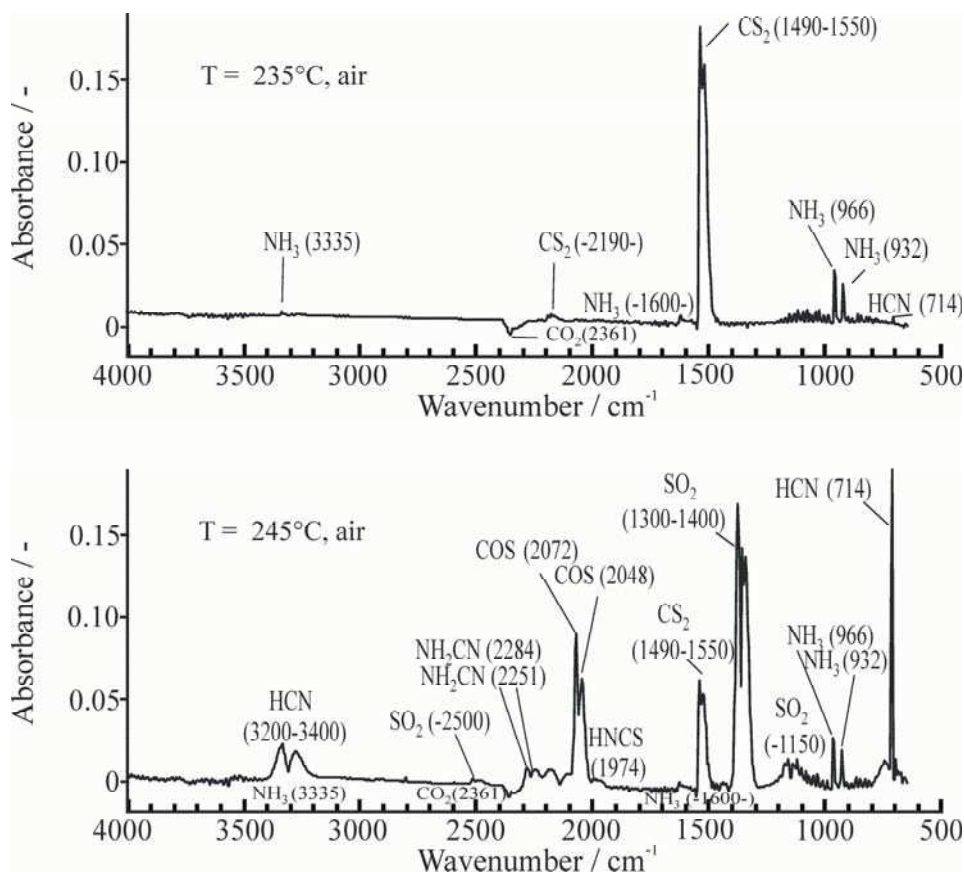
2. Ábra. Vékony filmek gázfázisú kémiai (CVD, ALD) módszerekkel történő leválasztásában alkalmazható termoanalitikai módszerek.³

A vékony filmek gázfázisú kémiai (CVD, ALE) módszerekkel történő leválasztásának in situ nyomonkövetésében, a leválasztásra leginkább alkalmas hőmérsékleti

tartományokban leginkább használható analitikai mérőműszereknek a kvarckristály mérlegek (QCM) és kvadrupól tömegspektrométerek (QMS) bizonyultak, egyrészt a vékonyfilm tömeggyarapodásának, másrészt a gázfázisú reagensek, ill. bomlástermékek koncentrációjának követésére.³⁵⁻³⁷ Az oldatos technikák közül a szol-gél eljárások szinte mindig megkövetelik a leválasztott rétegek megfelelő gázatmoszférában történő utólagos hőkezelését, így a TG-hez kapcsolható fejlődőgáz analitikai műszerek különösen a tömegspektrométerek (TG-MS) igen jelentős szerephez jutnak a nem kívánt filmalkotók eltávolításának,

elbomlásának a nyomonkövetésében pl. elektrokatalitikus filmként alkalmazandó $\text{IrO}_2/\text{SnO}_2$, RuO_2 vezetőoxidok esetén.³⁸⁻⁴⁰

A porlasztásos pirolízis technikák esetében az egyes prekursorok, ill. szerencsés esetben az egyforrású, azaz a szükséges elemeket lehetőleg már a vékony filmnek megfelelő arányban tartalmazó prekursorok termikus stabilitásának és reakcióképességének vizsgálatára az összes eddig említett termoanalitikai módszer alkalmazására van példa.



3. Ábra. ZnS filmek porlasztásos pirolízis előállítására ajánlott,⁴⁹ (Zn- és S-tartalmú) egyforrású $\text{Zn}_2(\text{tiokarbamid})_2\text{Cl}_2$ prekursor vegyület termikus bomlásása során keletkező gőzök és gázok FTIR spectrumai egy on-line kapcsolt TG-FTIR-gázcellás mérőrendszerrel in situ mérve. A 235°C-on intenzíven keletkező széndiszulfid (CS_2) (felső spektrum) az áramló levegőben meggyullad és 245°C-on már az égéstermékei, úgymint kén-dioxid (SO_2) és karbonil-szulfid (COS) jelennek meg, ill. hidrogén-cianid gáz, HCN intenzív fejlődése is tapasztalható (alsó spektrum), (fűtési sebesség 10°C min⁻¹, kezdeti mintatömeg 24,10 mg, az interferogramok kumulálási ideje kb. 30 s).⁴¹

A magasabb információtartalom elérése és az adatok jobb interpretálása érdekében a prekursorok előzetes vizsgálata során is előnyös, ha két vagy több egymást kiegészítő termikus és analitikai módszer együttes kombinációját, azaz szimultán, ill. on-line kapcsolt termoanalitikai mérőberendezéseket (TG/DTA-MS, TG-FTIR, XRD-DSC) használunk (3. ábra).^{34, 41, 42}

Hivatkozások

1. Paulik, F. *Special Trends in Thermal Analysis*, John Wiley and Sons, **1995**.
2. Pokol, Gy. *Magyar Kémikusok Lapja* **2005**, 60, 45-49.
3. Niinistö, L. *J. Therm. Anal. Cal.* **1999**, 56, 7-15.
4. Gallagher, P. K. *J. Therm. Anal.* **1992**, 38, 17-26.
5. Niinistö, L.; Karppinen, M. *J. Therm. Anal.* **1989**, 35, 319-327.
6. Karppinen, M.; Fukuoka, A.; Niinistö, L.; Yamauchi, H. *Supercond. Sci. Technol.* **1996**, 9, 121-135.
7. Karppinen, M.; Niinistö, L.; Yamauchi, H. *J. Therm. Anal.* **1997**, 48, 1123-1141.
8. Leskelä, M.; Mölsä, H.; Niinistö, L. *Supercond. Sci. Technol.* **1993**, 6, 627-656. and refs therein.
9. Niinistö, L. *Curr. Opin. Solid State & Mater. Sci.* **1998**, 3, 147-152, and refs therein.
10. Leskelä, M.; Ritala, M. *Thin Solid Films* **2002**, 409, 138-146.
11. Blanton, T. N.; Lelental, M. *Mater. Res. Bull.* **1994**, 29, 537-543.
12. Mattern, N.; Pitschke, W.; Danzig, A.; Doyle, S. *Fresen. J. Anal. Chem.* **1994**, 349, 91-96.
13. Pitschke, W.; Koch, M.; Heinrich, A.; Schumann, J. *Fresen. J. Anal. Chem.* **1994**, 349, 246-247.
14. Batzer, R. S.; Yen, B. M.; Liu, D.; Chen, H.; Kubo, H.; Bai, G. R. *J. Appl. Phys.* **1996**, 80, 6235-6242, and refs therein.
15. Madarász, J.; Leskelä, T.; Rautanen, J.; Niinistö, L. *J. Mater. Chem.* **1996**, 6, 781-787.

16. Babushkin, O.; Lindbaeck, T.; Brooks, K.; Setter, N. *J. Eur. Cer. Soc.* **1997**, *17*, 813-818.
17. Katsui, A.; Iwata, T. *Thin Solid Films* **1999**, *347*, 151-154.
18. Rodriguez, M. A.; Tissot, R. G. *Advances in X-Ray Analysis* **1998**, *40*, 74-82.
19. Galesic, I.; Reusch, U.; Angelkort, C.; Lewalter, H.; Berendes, A.; Schweda, E.; Kolbesen, B. O. *Vacuum* **2001**, *61*, 479-484.
20. Zhao, C.; Roebben, G.; Heyns, M.; Van der Biest, O. *Key Eng. Mater.* **2002**, *206-213*, 1285-1288.
21. Quaas, M.; Steffen, H.; Hippler, R.; Wulff, H. *Surf. Sci.* **2003**, *540*, 337-342.
22. Efremov, M. Yu.; Olson, E. A.; Zhang, M.; Lai, S. L.; Schiettekatte, F.; Zhang, Z. S.; Allen L. H. *Rev. Sci. Instrum.* **2004**, *75*, 179-191.
23. Efremov, M. Yu.; Olson, E. A.; Zhang, M.; Zhang, Z.; Allen, L. H. *Macromolecules* **2004**, *37*, 4607-4616.
24. Price, D. M.; Reading, M.; Hammiche, A.; Pollock, H. M. *Int. J. Pharm.* **1999**, *192*, 85-96.
25. Botterill, N.W.; Grant, D.M. *Mater. Sci. Eng. A* **2004**, *378*, 424-428.
26. Price, D. M.; Grandy, D. B.; Reading, M.; Bozec, L.; Hammiche, A.; Pollock, H. M.; Proceedings of the 29th NATAS Annual Conference on Thermal Analysis and Applications **2001**, 574-579.
27. Reading, M.; Grandy, D.; Hammiche, A.; Bozec, L.; Pollock, H. M. *Vibr. Spectrosc.* **2002**, *29*, 257-260.
28. Gallagher P. K. *Thermochim. Acta* **1980**, *41*, 323-327.
29. Gallagher, P. K.; Kinsbron, E.; English, A. T. *Solid-State Electron.* **1979**, *22*, 517-524.
30. Leung, S.; Wong, L. K.; Chung, D. D. L.; Milnes, A. G. *J. Electrochem. Soc.* **1983**, *130*, 462-468.
31. Mojzes, I.; Veresegyházy, R. *J. Electrochem. Soc.* **1985**, *132*, 1256.
32. Lum, R. M.; Sinclair, W. R.; Jones R. P.; Lamberti, V. E. *Proceedings - Electrochemical Society*, **1982**, 82-9(Proc. Symp. Inorg. Resist Syst.) 223-236.
33. Arai, T.; Kishi, A.; Kobayashi, Y. *Thermochim. Acta* **1999**, *325*, 151-156.
34. Arai, T.; Kishi, A.; Sawada, Y. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2004**, *78*, 639-655.
35. Rahtu, A.; Alaranta, T.; Ritala, M. *Langmuir* **2001**, *17*, 6506-6509.
36. Matero, R.; Ritala, M.; Leskelä, M.; Sajavaara T.; Jones, A. C.; Roberts, J. L. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 5630-5636.
37. Aaltonen, T.; Rahtu, A.; Ritala, M.; Leskelä, M. *Electrochem. Solid State Lett.* **2003**, *6*, C130-C133.
38. Horváth, E.; Kristóf, J.; Nasser, H.; Frost, R. L.; De Battisti, A.; Rédey, A. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *242*, 13-20.
39. Horváth, E.; Kristóf, J.; Frost, R. L.; Heider, N.; V. Vágvölgyi, J. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2004**, *78*, 687-695.
40. Hara, Y.; Rengakuji, S.; Nakamura, Y.; Shinagawa, A. *Electrochemistry (Tokyo, Japan)* **2002**, *70*, 13-17.
41. Madarász, J.; Krunk, M.; Niinistö, L.; Pokol, G. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2004**, *78*, 679-686.
42. Hehemann, D. G.; Lau, J. E.; Harris, J. D.; Hoops, M. D.; Duffy, N. V.; Fanwick, P. E.; Khan, O.; Jin, M. H.-C.; Hepp, A. F. *Mater. Sci. Eng., B- Solid* **2005**, *B116*, 381-389.
43. Okuya, M.; Osa, D.; Kaneko, S. *Key Eng. Mater.* **2002**, *228-229(Asian Ceramic Science for Electronics II)*, 247-250.
44. Abernathy, C. R. *EMIS Datarev. Ser.* **1996**, *16*, 663-671.
45. Bube, Richard. H. *Photovoltaic materials*, Imperial College Press, **1998**
46. Yamamoto, S.; Kawaguchi, A.; Nagata, K.; Oda, S. *Appl. Surf. Sci.* **1997**, *112*, 30-37.
47. Niinistö, L.; Päiväsari, J.; Niinistö, J.; Putkonen, M.; Nieminen, M. *Phys. Stat. Sol. A* **2004**, *201*, 1443-1452, and refs therein.
48. Törnquist, R. In *Inorganic and organic Electroluminescence*; Manch, R. H.; Gumlich H.-E. Eds; Wissenschaft & Technik Verlag: Berlin, **1996**, 278-284
49. Dedova, T.; Krunk, M.; Volobujeva, O.; Oja, I. *Phys. Stat. Sol. C* **2005**, *2*, 1161-1166, and refs. therein.

Online coupled thermoanalytical (TA) techniques in the development of thin film technology

Contribution and application of thermoanalytical methods to the development of thin film technologies applied in microelectronic and optoelectronic industry is discussed. While direct TA measurements of thin films are still not very common, studies related to chemical deposition processes (CVD, ALD, spray pyrolysis, sol-gel methods) are rapidly increasing in number. The most successful technique for direct studies of thin films are high-temperature XRD (HTXRD) and DSC/DTA, while TG and evolved

gas analysis (EGA) are applied for precursors and processes. For enhanced information content and a better interpretation of the data it is advantageous to use, instead of a single technique, two or three of simultaneous and/or online coupled TA methods (e.g. TG/DTA-MS, TG-FTIR, or XRD/DSC) which complement each other. For studies on organic polymer films, newly developed micro-fabricated thin film DSC (T-DSC) sensors, and various hyphenated EGA-methods of micro(μ)-TA or scanning thermal microscopy (SThM) provide very promising means.

Az élelmiszerbiztonság és -minőség kihívásai az élelmiszeranalitikában

VÁRADI Mária*

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, 1022. Budapest, Herman Ottó-út 15.,

1. Bevezetés

Napjainkban világszerte az érdeklődés középpontjába került az élelmiszerbiztonság és minőség kérdése. Az orvostudomány, a biológia, a kémia és fizika új eredményei alapján lehetőség nyílik arra, hogy a táplálkozás során az emberi szervezetbe jutó anyagok pozitív és negatív hatásait mind jobban megismerjük. A globalizáció, az élelmiszerek szabad kereskedelme a világban, szükségessé teszi az élelmiszerbiztonság feltételeinek megteremtését, a kockázatelemzés megvalósítását az emberi egészség védelme érdekében.

Az élelmiszerekből származó egészség-veszélyeztetés megítélése kockázat becsléssel lehetséges. A kockázatbecslés nem nélkülözheti olyan analitikai módszerek alkalmazását, amelyek biztosítják a vizsgálandó anyagok/komponensek nagy érzékenységu (ppm, ppb) szelektív mérését, kimutatását, valamint a gyors eredményszolgáltatást.

Sok esetben a hagyományos analitikai módszerek nem alkalmazhatók a minőségbiztosítási rendszerek kiépítésénél.

A modern élelmiszervizsgálati módszerek mellett, mint a nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia (HPLC), gázkromatográfia (GC), tömegspektrometria (MS), HPLC-MS, GC-MS, atom- és molekula-spektroszkópia, magmágneses rezonancia (NMR), egyre inkább előtérbe kerülnek a különböző biológiai és molekuláris biológia módszerek. Így a bioszenzorok különböző típusai, az enzimalapú szenzorok, az immunszenzorok, az affinitás szenzorok, továbbá az egyéb immunanalitikai módszerek, valamint a DNS alapú eljárások.

Jelen közlemény keretében ismertetjük azokat az élelmiszerekből származó veszélyeket, amelyek bizonyos esetekben szervezetünk károsodásához vezethetnek. A közlemény rövid áttekintést ad a szennyezők mérésére alkalmas analitikai módszerekről, néhány példán keresztül bemutatja az újonnan kifejlesztett módszerek hatékonyságát, alkalmazhatóságát.

2. Élelmiszerbiztonság és -minőség

Az élelmiszerbiztonság és élelmiszerminőség egymással szoros kapcsolatban levő, egymástól el nem választható fogalmak. Az élelmiszerminőség, amint az 1. ábra mutatja, magában foglalja az élelmiszerbiztonság követelményét, azaz az élelmiszer fogyasztása nem okozhat ételmérgezést, -

fertőzést, egészségkárosodást. Az élelmiszernek ugyanakkor a fogyasztó igényének megfelelően egészségesnek, táplálónak, élvezetesnek és ezen tulajdonságait romlásmentesen megőrizve fogyasztásra alkalmasnak kell lenni. A fogyaszthatóság fogalma ezen kívül más paramétereket is tartalmaz, így például a csomagolás-, jelölés-, feldolgozottság jellemzőit, stb.¹.



1. Ábra. Élelmiszerminőség fogalma

3. Az élelmiszerek minőségét, biztonságát veszélyeztető és károsító tényezők, valamint ezek kimutatására, meghatározására alkalmas analitikai módszerek.

3.1. Biológiai szennyezettség

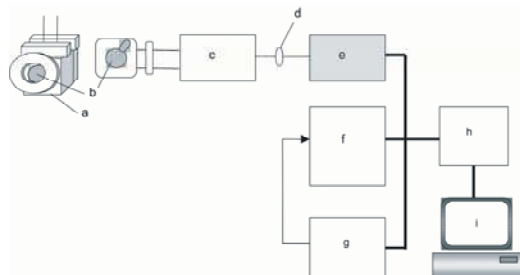
3.1.1. Baktériumok

Az élelmiszerekkel közvetíthető mikrobák közül az utóbbi időben számos fertőzést okozott a *Salmonella enteritidis*, amely elsősorban szárnyasokból, sertésekből, feldolgozó eszközök felületéről, nyers tengergyümölcsseiből mutatható ki. Továbbá számolni kell a húskészítményekben, gyümölcslevekben, nyers tejben az *Escherichia coli*, a nyers tejben, lágy sajtokban, fagylaltban, nyers húsokban, nyers, ill. füstölt halakban a *Listeria monocytogenes*, valamint elsősorban vizekben a *Vibrio cholerae* jelenlétével.

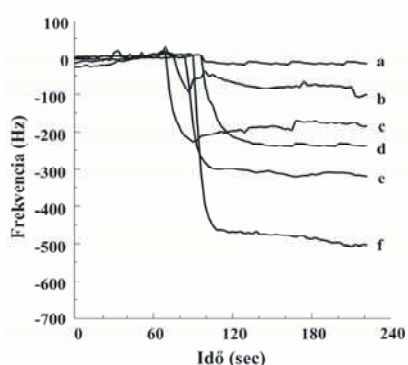
A mikroorganizmusok vizsgálata, kitenyésztése igen hosszú időt igényel (5-7 nap), ezért egyre fontosabb a gyors tesztek, elektrokémiai immunszenzorok^{2,3}, jelölés mentes immunszenzorok^{4,5} fejlesztése.

Az immunszenzorok közül a kvarckristály mikromérleg (QCM) jelölésmentes detektáláson alapuló eljárás sémáját mutatja be a 2. ábra, míg a 3. ábrán az e detektorral mért jelek láthatók különböző *E. coli* standardok esetén⁶.

* Tel: 355 8982; Fax: 212 9853; e-mail m.varadi@cfri.hu



2. Ábra. A kvarckristály mikromérleg (QCM) analízátor működési elve a) puffertartály, b) perisztaltikus pumpa, c) minta injektor, d) átfolyó cella, e) hulladék, f) oszcillátor, g) kvarckristály analízátor, h) potenciostát, i) számítógép



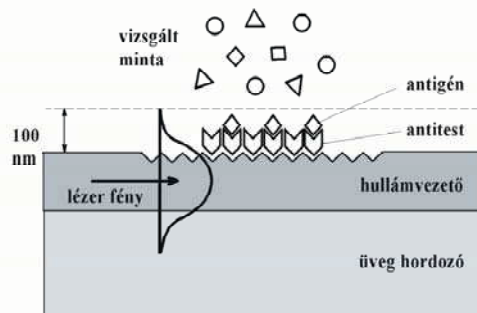
3. Ábra. QCM immunszenzor jele a különböző koncentrációjú *E. coli* standardokra a) 0, b) 2.3×10^6 , c) 1.8×10^7 , d) 2.2×10^7 , e) 3.1×10^7 f) 8.7×10^7 CFU/ml *E. coli*.

3.1.2. Penészgombák által termelt mikotoxinok

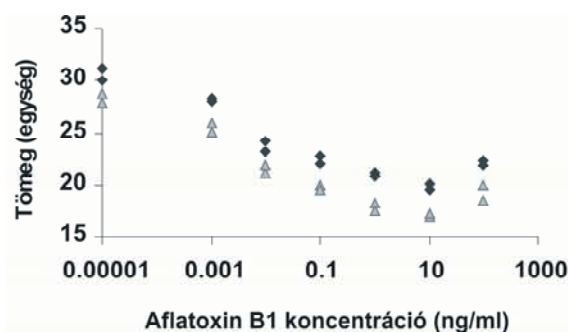
A gombák jelenléte az élelmiszerek ill. élelmiszer-nyersanyagok minőségét hátrányosan befolyásolja, hiszen jelentős szerepük van az élelmiszerek érzékszervi tulajdonságainak romlásában, tápértékének csökkenésében és az általuk termelt mikotoxinok egészségkárosító hatásában⁷. Aflatoxinokat elsősorban az *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, termeli. A növényi terményekben a B₁ és G₁ toxin fordul elő leggyakrabban és a legnagyobb mennyiségben, a tejben az aflatoxin M₁ és M₂ hidroxilált metabolitok választódnak ki. A közvetlen emberi fogyasztásra vagy felhasználásra szolgáló árura 4 g/kg összes aflatoxin, ill. 2 µg/kg B₁, a felhasználás előtt még válogatásra, tisztításra kerülő termékekben 5 vagy 8 µg/kg összes aflatoxin, ill. 10 vagy 15 µg/kg B₁ a megengedett határérték. A tej és tejtermékek aflatoxin M₁ tartalma legfeljebb 0,05 µg/kg lehet. Ochratoxinokat az *Aspergillus* és *Penicillium* törzsek termelik és leggyakrabban, és legnagyobb mennyiségben a gabonafélékben, hüvelyesekben (kakaó-, kávé- és szójababban) rizsben, borból, aszalt gyümölcsökben, fűszerekben fordulnak elő. A gabona magvak fizikai kezelésével (mosás, felületi koptatás) az ochratoxin-A szennyezettségnek több mint a fele eltávolítható. Az élelmiszerek megengedhető ochratoxin-A szintjeire nemzetközileg elfogadott határértékek még nincsenek, néhány országban ezt 5-50 µg/kg értékben határozták meg. A *Fusarium* gombakultúrákból izolált zearalenon-származékok közül a zearalenon (F-2 toxin) a legjelentősebb, mint a növényi termékek természetes szennyezője. A *Fusarium* a gabonaféléket már a földön megtámadja. A gomba növekedése és a toxin képződése

a betakarítás után is folytatódik, ha a termény kezelése és szárítása nem megfelelő. A zearalenon a gabonaféléken felületi szennyeződésként jelenik meg, a malomipari feldolgozás után a korpába kerül. Határértéket csak kevés országban állapítottak meg az F-2 toxinra 30-1000 µg/kg közötti értékben. A patulint az *Aspergillus*, *Penicillium* és *Byssoschlamys* törzsek termelik. A patulin penészes gyümölcsökben, zöldségekben és cereáliákban, illetve takarmányokban, valamint feldolgozott gyümölcs és zöldségkészítményekben fordul elő, leggyakrabban a sérült felületű „kék penész” miatt romlott almafélékben mutatható ki. A határérték Magyarországon azonos a jelenleg nemzetközileg elfogadott 50 µg/l értékkel.

Az igen alacsony határértékeknek megfelelően a mikotoxinok azonosítására és mennyiségi meghatározására egyre kisebb kimutatási határral rendelkező analitikai módszerekre van szükség. Napjainkban az általánosan alkalmazott vékonyréteg-kromatográfia, túlnyomósos réteg-kromatográfia⁸, kapillár elektroforézis⁹ mellett egyre gyakrabban HPLC technikát használnak fluoreszcenciás vagy tömegszelektív detektálással¹⁰. A gyors módszerek közül kifejlesztésre kerültek immunoassay (ELISA teszt csomagok)¹⁷, fluoreszcens polarizációs assay¹¹, radio-immunoassay alapú eljárások¹⁶ (0,2 ng/ml), SPR (surface plasmon resonance) detektáláson alapuló jelölés mentes immunszenzorok^{15, 18} (0,2 ng/g aflatoxin, 0,1 ng/g OTA, 0,01 ng/g ZON), monitorozásra pedig antitest alapú immunaflatinitás kolonnákat^{14, 19} (0,1 ppb aflatoxin) és immuneszt csíkot forgalmaznak¹². A 4. és 5. ábra bemutatja egy korszerű technikán, az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópián (OWLS) alapuló immunszenzor működési elvét, és ennek alkalmazását aflatoxin B1 koncentrációjának mérésére¹³.



4. Ábra. Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópián (OWLS) alapuló immunszenzorok működési elve



5. Ábra. Aflatoxin B1 koncentrációjának meghatározása OWLS detektáláson alapuló immunszenzorral

3.1.3. Prionok, BSE

Az eddigi kutatási eredmények alapján legvalószínűbbnek tekinthető elmélet szerint fertőző természetű fehérjék: prionok (protein of infectious nature, proteinaceous infectious particles, rövidítve a PrP-k) váltják ki a kerge marha kórt (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE), amely emberre átjutva okozhatja a CJD betegséget. A fertőző prionok olyan kis molekulatömegű fehérjék, amelyek a beteg állatok (és az ember) idegsejtjeiben képződnek, s a közönséges PrP-ktől „csupán” néhány aminosavban, illetve a PrP-k megváltozott térszerkezetében különböznek egymástól. A fertőző prionokat a fehérjebontó enzimek nem képesek elbontani, ellenálló képességük igen nagy, fertőtlenítőszerrel nem tehetők ártalmatlanná, biztos elpusztításukhoz 133 °C-on legalább 20 percnyi hőkezelési időre van szükség. A fertőzés lehetőségének kizárása érdekében mindennemű állati eredetű fehérjetakarmány (húsliszt, vérliszt, csontliszt) behozatalát, továbbá ezen anyagok takarmányba való bekeverését és etetését megtiltották.

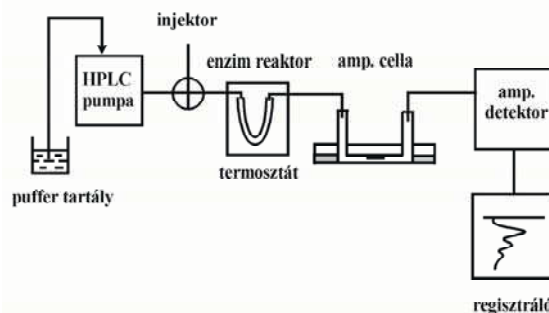
Mivel a prion viszonylag apró fehérje és kis mennyiségben van jelen, rendkívül nehéz a kimutatása. Megbízható megoldást erre elsősorban a Western Blot, illetve LIA (luminescence immunoassay) technika alkalmazása kínál²⁰. Számos affinitás alapú bioszenzort fejlesztettek ki, ilyen például: a fluorescein isotiocianáttal jelölt prion epitóp kompetitív meghatározása²¹, nanorészecskék felszínén rögzített fluoreszcens prion epitóp alkalmazása²², SPR felszínén rögzített antitesttel jelölésmentes eljárás²³.

3.2. Élelmiszerek természetes toxikus vegyületei

A sóska- és parajfélékben található oxálsav, a mandula és barackmag, valamint a csonthéjas gyümölcsökből készült gyümölcspálinkák ciánhidrogén- és metilalkoholtartalma, valamint a zöldségfélékben akumulálódó nitrátokból esetleg keletkező nitrózaminok közismerten veszélyt jelenthetnek az egészségre bizonyos koncentráció tartomány felett. Ezek mérése már régóta fontos részét képezi az élelmiszervizsgálatoknak.

A biogén aminok az élelmiszerek egy részének természetes alkotóelemei, fontos szerepet játszanak az aroma és ízanyagok kialakulásában. A biogén aminok mennyisége az élelmiszer frissességét, higiéniai állapotát, gyártási és tárolási körülményeit jelzi. A biogén aminok mérésére elsősorban a HPLC és OPLC technikákat alkalmazzák, de ELISA tesztek is bevezetésre kerültek, valamint enzim reakción alapuló bioszenzor kutatások is megindultak²⁴. A 6. ábra FIA rendszerbe illesztett diamino oxidáz enzim alapú bioszenzor működési elvét mutatja be, amelyet az összbiogén amin meghatározására használtak, mint romlásindikátor²⁵.

Az alkaloidok közül a burgonyában, különösen szélsőséges időjárási körülmények között a szolanin tartalom jelentősen megnövekedhet. Az étkezésre alkalmas burgonya szolanin tartalma nem haladhatja meg a 180 mg/kg-ot. A más alkaloidok közül a morfin, narkotin, tebain és kodein étkezési mákbán megengedhető mennyiségét rendelet írja elő, a morfin tartalma nem haladhatja meg a 30 mg/kg értéket.



6. Ábra. Enzim alapú amperometriás bioszenzor működési elve

Az alkaloidok meghatározására jól beváltak a különböző nagyhatékonyságú kromatográfiai módszerek^{26, 27}. A gyors vizsgálatok céljára ELISA tesztek, liposzomákat tartalmazó fluoreszcenciás tesztet, kolinészteráz alapú FET-et és molekuláris meghatározáson alapuló amperometriás módosított elektródot is fejlesztettek^{28, 29}.

3.3. Vegyi szennyezettség

3.3.1. Toxikus fémek és elemek

Az ólom a talaj, a víz és a levegő közvetítésével jut a növényekre, az élelmiszer-nyersanyagokra. Az állati eredetű élelmiszerek – a tej kivételével – általában több ólmot tartalmaznak, mint a növények. Kadmiumot elsősorban a gabonafélék, zöldségek és a burgonya tartalmazza. Az arzén a bioszférában természetesen lejátszódó metabolikus folyamatok eredményeként különböző szerves és szervetlen formában fordul elő az egyes élelmiszerekben. A szervetlen arzéntrioxid közismert mérge, a metilált formának (pl. dimetil-arsenát) azonban kicsi az akut toxicitása, míg a halakban és rákfélékben előforduló legfontosabb arzénvegyület, az arsenobetain, nem tekinthető toxikusnak. Leggyakrabban az ivóvízből, gombákból, rizsből kerül az emberi szervezetbe. Higanyt, illetve higanyvegyületeket sokféle célra használnak, többek között fungicidek és csávázószerként. Az élelmiszerek közül a zöldségfélékben és a burgonyában általában csak 1-2 g/kg, a gabonafélékben 5-6 mg/kg, a húsokban 6-15 mg/kg, a halakban olykor 20-2000 mg/kg higany található.

A fémtartalmú anyagok vizsgálatánál a szerves anyagok eliminálása után a fémtartalom meghatározására az élelmiszerek döntő többségénél az atomabszorpciós spektrofotometriás (AAS) eljárás különféle technikáit alkalmazzák, így a fémek oldatának lángba porlasztását, lángmentes hideggőzös eljárást, vagy grafitkályhában történő atomizálást. Korszerű vizsgálati eljárás az induktívan kapcsolt plazmaemissziós spektroszkópia (ICP), amely MS detektorral összekapcsolva még szelektívebb és pontosabbá tehető. Az egyes elemek oxidációs formáinak, illetve a különböző szerves molekulákhoz való kapcsolódásának fontos szerepe van a toxicitás megítélésében, ezért napjainkban széles körben terjednek a különböző technikák összekapcsolásával végezhető speciációs vizsgálatok. A minták extrahálásakor és szeparációjakor ügyelni kell arra, hogy az egyes molekulák megtartsák kémiai integritásukat

(pl. fémionok oxidációs foka, szerves molekulák összetétele). A minta előkészítéshez enzimes emésztést, ioncserélő oszlopot, ionpár kromatográfiát, szuperkritikus folyadék extrakciót, szilárd fázisú extrakciót alkalmaznak ^{30, 31, 32}.

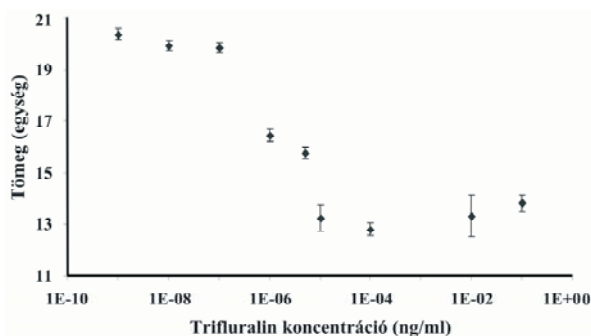
3.3.2. Radioaktív anyagok

Az általuk okozott szennyezettsége az élelmiszereknek normál körülmények között minimális. Közvetlenül egy baleset vagy kibocsátás után elsősorban a tej és tejtermékek, továbbá a leveles zöldségek és bogyósgyümölcsök jódt-131 izotóp tartalma, később a radioaktív cézium és stroncium izotópok (Cs-134, Cs-137, Sr-90) koncentrációja jelzi a szennyeződés mértékét. Kimutatásukra többek között folyadék szcintillációs méréseket ³³, β - és γ -spektroszkópiát ³⁴ alkalmaznak.

3.3.3. Szermaradványok (növényvédő szer, rovarirtó, műtrágya), antibiotikumok

Rendkívül sokféle vegyületcsoport, melyek számát lényegesen növeli, hogy a növényben, növényi termékben, illetve a környezetben kimutatható ezek bomlás-, illetve reakcióterméke is.

Az állatgyógyszerek révén az állati eredetű élelmiszerekkel az emberi szervezetbe jutó maradékok allergiát, enzim defektust, baktérium rezisztenciát okozhatnak, károsíthatják a vérképzőrendszert, rákkeltő, mutagén, teratogén stb. hatást válthatnak ki. Ezért igen fontos pl. a tej és tejtermékek antibiotikum-tartalmának vizsgálata.



7. Ábra. Trifluralin növényvédő szermaradvány koncentrációjának meghatározása OWLS detektáláson alapuló immunszenzorral

A szermaradványok vizsgálata igen szerteágazó analitikai feladat, bizonyos csoportok közös meghatározására fejlesztettek ki eljárásokat, elsősorban TLC, HPTLC, SPME/GC/MS, ECD, LC/MS, APCI, PI, MS/MS módszereket ^{35, 10, 36}. Ionszelektív elektródot, elektrokémiai bioszenzorokat fejlesztettek ki, amelyekkel a biokémiai reakciók gátlása alapján lehet következtetni már igen kis koncentrációjú szermaradvány jelenlétére (26 nM carbaryl, 0,6 mM fenithrothion ³⁹, 1-2 ill. 0,1 ng/ml atrazin, szimazin ⁴⁰, 5ng/g inszekticid ⁴¹). Számos ELISA eljárás ³⁷ és jelölésmentes immunanalitikai eljárás is kifejlesztésre került SPR (1 ng/ml triazin ⁴², 2,6 ng/g penicillin G ⁴³), vagy QCM detektálással ⁴⁴. A 7. ábra a trifluralin növényvédőszer bioszenzorral történő mérését mutatja be OWLS detektálás alkalmazásával ³⁸.

3.3.4. Ipari szerves szennyezők

A levegőben lévő füstgázokból, porból, koromból, kipufogó gázokból a növényi élelmiszerek felületére rakódott policiklusos aromás szénhidrogén vegyületek (PAH-ok) a vegetációs időszak alatt lassan beleoldódnak a zöldség-, gyümölcs- és gabonafélék külső viaszrétegébe, vizes mosással nem távolíthatók el. A közel 200féle anyag legfontosabb képviselője, a 3,4-benzpirén erősen rákkeltő. A PAH alapvegyületeken kívül mintegy 1000 derivált vegyület jelenlétével is számolni kell, ezek egyrésze karcinogén.

A poliklórozott bifenilek (PCB-k) valamint a dioxinok (poliklórozott dibenzo-para-dioxinok (PCDD-k) és poliklórozott-dibenzofuránok (PCDF-k) hosszú ideig megmaradnak mind a környezetben, mind az élő szervezetekben, erősen lipofil vegyületek, a táplálékláncon át feldúsulnak, a zsírszövetben raktározódnak, így elsősorban édesvízi halakban, húspan, tejben, tejtermékekben, tojásban található. Az élelmiszerekben a dioxinok rendszerint a PCB-kel együtt fordulnak elő.

A PAH-ok, PCB-k, PCDD-k élelmiszerekben való meghatározásának legfontosabb feltétele a megfelelő mintaelőkészítés, extrakció és elválasztás, az előkészített mintákat elsősorban GC-vel és HPLC-vel vizsgálják, MS, elektronbefogásos (ECD), többdimenziós GC-t (MDGC), atom emissziós (AED) detektorokat alkalmazva ^{45, 46}. Utóbbi időben egyre több RIA (0,01 mg/kg PCB ⁴⁷), ELISA eljárást (0,1-50 ppm PCB ⁴⁸), biológiai folyamatok gátlásán alapuló bioszenzorokat ⁴⁸, valamint gyors ellenőrzésre immuneszt csíkot ⁴⁵ fejlesztettek ki.

3.3.5. Élelmiszerfeldolgozás során keletkező toxikus anyagok

Egyes élelmiszerekben megtalálható a ditiokarbamát típusú fungicid növényvédőszer bomlásterméke, az etiléntiourea (ETU), amely rákkeltő hatású. Főzés hatására az ETU tartalom növekszik, ezért, mivel a ditiokarbamátokat gyakran használják komló kezelésére elsősorban söriben kell ETU maradékot ellenőrizni. Nitrózaminok a nitrétek és tercier aminok reakciója során keletkeznek. Ez a reakció végbemehet a nitrátot vagy nitrítet és amin forrást (fehérje) tartalmazó élelmiszerben (pácolt húsok, sör). A klórpropanolok, ezeken belül is elsősorban a 3-monoklórpropán-1,2-diol (3-MCPD) és a 1,3-diklór-2-propanol (1,3-DCP) bizonyos élelmiszer típusokban keletkezik, zsiradék és klór reakciója következtében. Leggyakrabban a sósavval hidrolizált növényi fehérjékben (HVP), és a savas körülmények között fermentált szójaszósóban lehet kimutatni, de kisebb mennyiségben találtak már kenyerekben, szalámiakban is. Elsősorban nagyobb keményítő tartalmú és magasabb hőmérsékleten kezelt élelmiszerekben (burgonya) akrilamid keletkezhet. A reakció mechanizmusa még nem ismert, azt viszont bizonyították, hogy csak a 120 °C felett készített élelmiszerekben keletkezik akrilamid.

Az említett szennyezők meghatározására általában HPLC, HPLC-MS és GC-MS módszereket dolgoztak ki ^{49, 50}.

3.3.6. Élelmiszeripari adalékanyagok

Ebbe a csoportba tartoznak az élelmiszer színezékek, az antioxidánsok (aszcorbinsav, BHT, BHA, gallátok, tokoferol, borkósav, citromsav, foszforsav, tejsav), a tartósítószer (konyhasó, cukor, alkohol, ecetsav, tejsav), a mesterséges édesítőszer (szacharin, ciklamát, aszpartám, aceszulfám-K, taumatini, neoheszperidin DC), az állományjavító, valamint a természetes és mesterséges aromák.

Vizsgálatuk az érvényes hazai és nemzetközi szabványok szerint történik. Az aroma vizsgálatokat jelentősen megkönnyítette a szilárd fázisú mikroextrakció (SPME) kidolgozása és elterjedése, majd a GC-MS alkalmazása⁵¹. Több szerző beszámol az elektronikus orr és nyelv berendezés kifejlesztéséről és sikeres alkalmazásáról, amellyel például sajtok érettsége, borok aromája gyorsan ellenőrizhető⁵².

3.4. Transzgenikus, génmódosított (GM) élelmiszerek

GM élelmiszerek közé a közvetlenül élelmiszerként történő felhasználásra szánt genetikusan módosított szervezeteket (GMO-kat), az azokat tartalmazó vagy azokból előállított élelmiszereket soroljuk. A GM élelmiszereknél az elvárt pozitív változások mellett azonban számos új hatással is számolni kell, pl. az idegen génről olyan fehérje íródik át, amelyet a szervezet eredetileg nem tartalmazott, és ez a fehérje lehet toxikus vagy allergén, antibiotikum rezisztenciáért felelős gén átjuthatnak emberbe, állatba. Különösen nagy jelentősége van a „nyomonkövethetőség” megkövetelésének, hogy a GMO-kat vagy a GMO-ból előállított termékeket az előállítási és értékesítési láncokon keresztül, forgalomba hozataluk minden szakaszában követni lehessen.

A GMO-t tartalmazó élelmiszerek vizsgálatánál két irányban folynak a kutatások, a fehérjék meghatározására, illetve az ismert promotor DNS szakaszok meghatározására fejlesztettek ki eljárásokat⁵³. A fehérjék vizsgálatánál elsősorban az ELISA módszerek és a Western blot terjedt el, de immuneszt csíkot is forgalmaznak gyorsmérésekre⁵⁴. A beépített génszakasz által termelt új fehérjék gyors vizsgálatára biochipek, microarray-k alkalmazása lehetséges. A DNS alapú eljárások között említhetjük a Southern blottot, a polimeráz láncreakción alapuló (PCR) és real-time PCR módszereket⁵⁵. Többféle ismert génszakasz gyors meghatározását teszi lehetővé a multiplex PCR⁵⁶.

4. Összefoglalás

Jelen közleményben bemutatott nagyhatékonyságú méréstechnikák mutatják, hogy az élelmiszeranalitika legújabb eredményei jelentősen hozzájárulnak az élelmiszerbiztonság és –minőség követelményeinek teljesítéséhez, elősegítik a kockázatelemzés elvégzését és ezáltal a fogyasztók egészségének védelmét.

A módszerfejlesztések során elért alapvető eredmények fokozatosan kerülnek át az élelmiszervizsgáló rutinlaboratóriumokba, miután nemzetközi szervezetek (ISO, AOAC, FAO/WHO Codex Alimentarius, stb.) elfogadták ezeket, és nemzetközi körvizsgálatok bizonyították alkalmazhatóságukat.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Adányiné dr. Kisbocskói Nórának a közlemény összeállításában nyújtott segítségével. Továbbá köszönöm az Országos Tudományos Kutatási Alap (T 046402) támogatását.

Hivatkozások

1. FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 76. 2004 Assuring Food Safety and Quality: Guidelines for Strengthening National Food Control Systems
2. Sippy, N.; Luxton, R. Lewis, R.J.; Cowell, D.C. *Biosens Bioelectron* **2003**, 18, 741-749.
3. Carnes E.; Wilkins E. *American J Appl Sci* **2005**, 2, 607-613.
4. Grow, A.E.; Wood, L.L.; Claycomb, J.L.; Thompson, P.A. *J Microbiol Meth* **2003**, 53, 221-233.
5. Leonard, P.; Hearty, S.; Brennan J.; Dunne, L.; Quinn J.; Chakraborty, T.; O'Kennedy R. *Enzyme Microb Tech* **2003**, 32, 3-13.
6. Adányi, N.; Váradi, M.; Kim, N.; Szendrő, I. *Curr Appl Phys* **2005**, (in press).
7. Sohár, P.; Varga, I. In: *Élelmiszerbiztonság és táplálkozás-egészségügy*; Rodler, I. Ed. OKK OÉTI, Bp. **2003**, pp 215-227.
8. Whitaker, T.B. *Mol Biotechnol.* **2003**, 23, 61-71.
9. Pena, R.; Alcaraz, M.C.; Arce, L.; Rios, A.; Valcarcel, M. *J Chromatogr A* **2002**, 967, 303-314.
10. Sherma, J. *J Chromatogr A* **2000**, 880, 129-147
11. Nasir, M. S.; Jolley, M. E. *Comb Chem High Th Scr* **2003**, 6, 267-273.
12. Ho, J. A. A.; Wauchope, R. D. *Anal Chem.* **2002**, 74, 1493-1496.
13. Adányi, N.; Levkovets, I.A.; Rodriguez-Gil, S.; Szendrő, I.; Ronald, A.; Váradi, M. *The 8. World Congress on Biosensors*, Granada **2004**, Abstract book, P2.4.55.
14. Stroka, J.; von Holst, C.; Anklam, E.; Reutter, M. *J AOAC Int.* **2003**, 86, 1179-1186.
15. Daly, S.J.; Keating, G.J.; Dillon, P.P.; Manning, B.M.; O'Kennedy, R.; Lee, H. A.; Morgan, M.R.A. *J AgrFood Chem* **2000**, 48, 5097-5104.
16. Korde, A.; Pandey, U.; Banerjee, S.; Sarma, H.D.; Hajare, S.; Venkatesh, M.; Sharma, A.K.; Pillai, M.R.. *J Agr Food Chem.* **2003**, 51, 843-846.
17. Lipigorngoson, S.; Limtrakul, P.; Suttajit, M.; Yoshizawa, T. *Food Addit Contam* **2003**, 20, 838-845.
18. van der Gaag, B.; Spath, S.; Dietrich, H.; Stigter, E.; Boonzaaijer, G.; van Osenbruggen, T.; Koopal, K. *Food Control* **2003**, 14, 251-254.
19. Huebner, H.J.; Phillips, T.D. *J AOAC Int.* **2003**, 86, 534-539.
20. Nunnally, B.K. *Trends Anal Chem* **2002**, 21, 82-88.
21. Anand, A.; Moreira, R.; Henry, J.; Chowdhury, M.; Coté, G.; Good, T. *Lebensm-Wiss Technol* **2005**, Available online
22. Moreira, R.; Good, T. *Anal Biochem* **2004**, 334, 1-8.
23. Luck, L.A.; Moravan, M.J.; Garland, J.E.; Salopek-Sondi, B.; Roy, D. *Biosens Bioelectron* **2003**, 19, 249-259
24. Tombelli, S.; Mascini, M. *Anal Chim Acta* **1998**, 358, 277-284.
25. Váradi, M.; Adányi, N.; Kiss, J.; Sass-Kiss, Á. *CEFood Congress*, Budapest **2004**, Congress proc. (CD) P-S-63.
26. Zywicki, B.; Catchpole, G.; Draper J.; Fiehn, O. *Anal Biochem* **2005**, 336, 178-186.
27. Edwards, S.R.; Smith, M.T. *J Chromatogr B* **2005**, 814, 241-249.
28. Friedman, M. *J Chromatogr A* **2004**, 1054, 143-155.
29. Bacigalupo, M.A.; Longhi, R.; Meroni, G. *J Food Compos Anal* **2004**, 17, 665-673.
30. Gomez-Ariza, J.L.; Morales, E.; Giraldez, I.; Sanchez-Rodas, D.; Velasco, A. *J Chromatogr A* **2001**, 938, 211-224.

31. Kaniansky, D.; Masar, M.; Marak, J.; Bodor R. *J Chromatogr A* **1999**, 834, 133-178
32. Rosenberg, E. *J Chromatogr A* **2003**, 1000, 841-889.
33. Schönhofer, F. *Sci Total Environ* **1995**, 173-174, 29-40.
34. Beljaars, P.R.; van Dijk, R.; Geertsen, J.A.M.; Nootenboom, H. *JAOAC Int* **1997**, 80, 545-548.
35. Kataoka, H.; Heather, L.L.; Pawliszyn, J. *J Chromatogr A* **2000**, 880, 35-62
36. Stajnbaher, D.; Zupancic-Kralj, L. *J Chromatogr A* **2003**, 1015, 185-198.
37. Franek M.; Hruska K. *Vet Med Czech* **2005**, 50, 1-10.
38. Székács, A.; Trummer, N.; Adányi, N.; Váradi, M.; Szendrő, I. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 487, 31-42
39. Solná, R.; Sapelnikova, S.; Skládál, P.; Winther-Nielsen, M.; Carlsson, C.; Emnéus J.; Ruzgas T. *Talanta* **2005**, 65, 349-357.
40. Yulaev, M.F.; Sitdikov, R.A.; Dmitrieva, N.M.; Yaznina, E.V.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. *Sensor Actuat B* **2001**, 75, 129-135.
41. Schulze H.; Schmid R.D.; Bachmann, T.T. *Anal Bioanal Chem* **2002**, 372, 268-272.
42. Nakamura, C.; Hasegawa, M.; Nakamura, N.; Miyake, J. *Biosens Bioelectron.* **2003**, 18, 599-603.
43. Gustavsson, E.; Bjurling, P.; Sternesjö Å. *Anal Chim Acta* **2002**, 468, 153-159.
44. Park, I.S.; Kim, D.K.; Adanyi, N.; Varadi, M.; Kim, N. *Biosens Bioelectron* **2004**, 19, 667-674.
45. Ahmed, F. E. *Trends Anal Chem* **2003**, 22, 170-185.
46. Stolyhwo, A.; Sikorski, Z.E. *Food Chem* **2005**, 91, 303-311.
47. Sisak, M.; Franek, K.; Hruska, K. *Anal Chim Acta* **1995**, 311, 415-422.
48. Björklund, E.; von Holst, C.; Anklam, E. *Trends Anal Chem* **2002**, 21, 40-53.
49. Garcinuno, R.M. Ramos, L. Fernández-Hernando P. Cámara C. *J Chromatogr A* **2004**, 1043, 35-41.
50. Pittet, A.; Périsset, A.; Oberson, J. M. *J Chromatogr A* **2004**, 1035, 123-130.
51. Ferreira, V.; Jarauta, I.; López R.; Cacho J. *J Chromatogr A* **2003**, 1010, 95-103.
52. Di Natale, C.; Paolesse, R.; Macagnano, A.; Mantini, A.; D'Amico, A.; Legin, A.; Lvova, L.; Rudnitskaya A.; Vlasov Y. *Sensor Actuat B-Chem* **2000**, 64, 15-21.
53. Ahmed, F.E. *Trends Biotechnol* **2002**, 20, 215-223.
54. Stave, J.W. *Food Control* **1999**, 10, 367-374.
55. Brett, G.M.; Chambers, S.J.; Huang, L.; Morgan M.R.A. *Food Control* **1999**, 10, 401-406.
56. Forte, V.T.; Di Pinto, A.; Martino, C.; Tantillo, G.M.; Grasso, G.; Schena, F.P. *Food Control* **2005**, 16, 535-539.

Challenges of food safety and quality in food analysis

Nowadays, food safety and quality have become the centre of interest all over the world. New advances of medicinal sciences, biology, chemistry and physics presented the opportunity to know better and better the positive and negative effects of foods consumed by humans. Health hazards originating from food can be judged by risk assessment. Risk assessment cannot be done without such analytical methods, which insure the highly sensitive (ppm, ppb) and selective measurement of substances/components to be determined as well as rapid provision of results. In many cases, traditional analytical methods cannot be applied for developing quality assurance systems. Besides the modern food analytical methods such as high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), mass spectrometry (MS), HPLC-MS, GC-MS, atomic and molecular spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR) etc., different biological and molecular biological methods come into prominence more and more, namely different types of biosensors, enzyme-based sensors, immunosensors, affinity sensors, complemented by other immunoanalytical methods, as well as DNA chips.

The paper gives a brief survey of the factors, which involve some risks for the human health by the consumption of food. The most frequently applied analytical methods for determination of potentially dangerous compounds are summarized. New techniques such as enzyme-based biosensors, immunosensors, and label-free detection technique quartz-crystal microbalance (QCM) and optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) are demonstrated.

In recent years, immunosensors for the detection of biological contamination like bacterial infections as well as micotoxins produced by moulds have been developed. Determination of *E. Coli* has been performed by QCM sensor in the 2.3×10^6 and 8.7×10^7 CFU/ml range. Immunosensor based on optical waveguide lightmode spectroscopy has been applied for the measurement of different toxins. For Aflatoxin B1, 10-3 ng/ml detection limit has been attained by the authors.

Measurement of natural toxins in foods has long been an important part of food analyses. For this purpose different high performance chromatographic methods have been proven very useful. Besides these methods, ELISA tests have been introduced and biosensor

research activities based on enzyme reactions also got under way. Thus, a biosensor has been developed based on diamino oxidase enzyme and applied by the authors in an FIA system and for serial measurement of total biogenic amines.

As for chemical contamination, toxic metals and elements, industrial organic contaminants (polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, dioxins and polychlorinated dibenzofurans) should be mentioned. For the analysis of metals different methods of atomic absorption spectroscopy and the inductively coupled plasma emission spectroscopy provide adequate sensitivity. For the determination of industrial organic contaminants, GC and HPLC instruments with various detectors have become common.

Measurement of chemical residues such as those of herbicides, insecticides and artificial fertilisers require highly sensitive analytical techniques. Apart from diverse coupled techniques, numerous ELISA and label-free immunoanalytical methods have been elaborated as well. The authors have reported on the development of an immunosensor capable of measuring trifluralin. With OWLS detection, 10-6 ng/ml lower detection limit has been achieved.

Health impairing and toxic materials are also produced in the course of food processing. In addition, unit operations machinery and packaging materials can contaminate foods with toxic substances as well. Analysis of various additives (colourants, antioxidants, preservatives, artificial sweeteners, texture enhancers) as well as natural and artificial aromas is significant, too. A number of authors have reported on the successful application of electronic nose or tongue, primarily for aromas. Nowadays, one of the most important challenges for those in food analytics is the investigation of transgenic and genetically modified (GM) foods. Methods development has been pursued in two directions; namely, determination of protein or DNA segments. The high performance measurement techniques introduced in this article demonstrate that the latest results of food analysis significantly contribute to complying with the requirements of food safety and quality, facilitate risk analysis and thereby protection of consumer health.

Dopping a sportban az analitikai kémia szemszögéből

NOSZÁL Béla^{1,2}, KRASZNI Márta^{1,2}, RÁCZ Ákos^{1,2}, SZÓKÁN Gyula³

¹Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Hőgyes Endre u. 7-9., 1092, Budapest

²MTA-SE Kábító- és Doppingszertudományi Kutatócsoport, Hőgyes Endre u. 7-9., 1092, Budapest

³ELTE Szerves Kémiai Tanszék, Pázmány Péter sétány 1/a., 1117, Budapest

1. Bevezetés

Az emberi szervezetbe bejutó, ott számottevő biológiai hatást kifejteni képes vegyületek három csoportba sorolhatók:

- gyógyszerek
- kábítószer
- dopping

Jellemzésükben, a szervezetből való kimutatásukban és meghatározásukban, hatóságok általi engedélyezésükben, visszautasításukban kiemelkedő szerep jut az analitikai kémianak.

A dopping fogalmat a társadalom – ha nem is szabatosan – alapvetően ismeri. Definíciószerűen doppingon értjük a sportteljesítményt tiltott módon fokozó anyagok és módszerek összességét. A dopping kérdés társadalmi méreteiben általában egy-egy jelentős sportesemény alkalmával kerül előtérbe, elsősorban nyári olimpiákon, ahol jelentős azon sportágak száma, melyekben erős a kísértés a doppingolásra. A 2004-es athéni olimpiai játékokon összesen 2796 esetben végeztek dopping vizsgálatot vizeletből, 709 esetben vérből. Ezen vizsgálatok során 24 esetben, azaz a tesztek 0,68%-ában találtak pozitív mintát. Nem tartozik ezek közé a nagy publicitást kapó Annus Adrián és Fazekas Róbert eset, melyeknél más típusú dopping vétség történt. A dopping kérdéskörével világviszonylatban az 1990-ben alakult World Anti Doping Agency, a WADA hivatott foglalkozni.

2. A tiltott anyagok és módszerek típusai

A WADA szerint¹ a tiltott anyagok körébe tartoznak a bármely időszakban (all time; in-and -out-of-competition) tiltott szerek, a verseny közben (in-competition) tiltottak, és a csak bizonyos sportágakban tiltott anyagok, melyek többségükben szintén csak verseny közben tiltottak. A tiltott módszerek első csoportjába tartoznak az oxigénátadás növelését elősegítő módszerek, a vérdopping, valamint az oxigéntranszportot növelő szerek, melyek közé tartoznak a hemoglobin készítmények és a perfluoro-szénhidrogének^{2,3}.

A tiltott módszerek következő kategóriájába a biológiai, kémiai, fizikai manipulációs módszerek tartoznak, amilyen például a vizeletcsere, katéterezés és infúzió, végül a tiltott módszerek harmadik csoportját a géndopping képezi.

A géndopping napjaink legsúlyosabb, legnagyobb kérdése, amellyel a WADA-nak szembe kell néznie. Erről a közlemény végén részletesebben is szó lesz. A tiltott anyagok csoportosítása, néhány példával, az 1. táblázatban található.

1. Táblázat: A tiltott szerek WADA szerinti csoportosítása¹

Tiltott anyagok	
Csoportok	Példák
Bármely időszakban tiltott anyagok	
S1. Anabolikus hatású anyagok (66 szteroid, 3 nem szteroid típusú*)	tesztoszteron, sztanozolol, klenbuterol ⁴
S2. Peptidhormonok és származékaik	eritropoietin, gonadotropin, kortikotropin
S3. β_2 -agonisták (kivételek: formoterol, szalbutamol, szalmeterol, terbutalin, inhalációs alkalmazása, asthma bronchiale roham megelőzésére)	fenoterol
S4. Antiösztrogének (12 vegyület*)	anesztrezol
S5. Diuretikumok és egyéb maszkírozó szerek (21 vegyület*)	furoszemid, epitesztoszteron
Verseny közben tiltott anyagok	
S6. Stimulánsok (42 anyag*)	efedrin ⁵ amfetamin ^{6,7} metiléndioxi-metamfetamin
S7. Kábító fájdalomcsillapítók (11 anyag*)	morfin, heroin
S8. Kannabinoidok	Δ^9 -tetrahidro-kannabinol
S9. Glükokortikoidok (kivéve a dermatológiai felhasználások esetét)	prednizolon, dexametazon
Csak bizonyos sportágakban tiltott anyagok	
P1. Alkohol (sportágtól függően eltérőek a megengedett plazmakoncentráció határok)	
P2. Béta-blokkolók (20 anyag*)	metoprolol, atenolol

*A számok a konkrétan felsorolt vegyületekre vonatkoznak, de a WADA listájában a csoportok többségénél szerepel a „but not limited to” kitétel, tehát a felsoroltakon kívül egyéb ismert anyagokat is számításba kell venni.

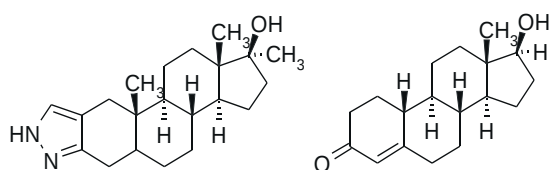
A WADA által tiltott vegyületekről látható, hogy számos kémiai vegyülettypust képviselnek, találunk köztük egészen

* Főszerző. Noszál Béla, Tel.: 247-0891 ; fax: 247-0891; e-mail: .nosbel@hogyes.sote.hu

kis molekulákat (például az alkohol, a stimulánsok), és makromolekulákat: peptideket, fehérjéket, köztük például az eritropoietin nevű, 35 ezres molekulatömegű glikoproteint. Hogy mennyire fontos ennek a kérdésnek a kezelése, a doppingolás megelőzése, vagy az esetleges doppingvétség kimutatása, azt néhány példa illusztrálja.

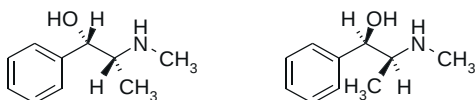
3. Néhány doppingeset az élsport területéről

A sportdopping egyik legnagyobb nyilvánosságot kapott esete Ben Johnson 1988-as olimpiai győzelme Szöulban, a 100 méteres síkfutás döntőjében, ahol 9:79 másodperces eredménnyel, nagy fölénytel utasította maga mögé a mezőnyt, köztük Carl Lewist, minden idők egyik legkiválóbb atlétáját. Ben Johnson szervezetében azonban a doppingvizsgálat sztanozololt mutatott ki, aminek következtében olimpiai aranyérmétől megfosztották.



1.Ábra. A sztanozolol és a nandrolon.

Ennél feltétlenül kisebb jelentőségű, de szintén nagy port vert fel az eset 1994-ben, a labdarúgó világ bajnokságon. Diego Maradona (egyike a világ valaha volt legnagyobb tehetségű labdarúgóinak) szervezetében efedrint találtak, aminek következtében a további játéktól azon a világ bajnokságon eltiltották.



2.Ábra. Az efedrin két sztereoizomerje

Egy harmadik eset Florence Griffith Joyneré, aki az 1980-as években jeles atléta volt, de az 1988-as szöuli olimpiai játékokig aranyérmet jelentős versenyen nem tudott elérni. Elsősorban 200 méteres női síkfutásban versenyzett. Az 1988-as szöuli olimpiai játékokra, szemmel is látható módon, egészen férfias, ultramaszkulin izomzatra tett szert, amit igyekezett ellenpontoszni a nőiesség külső jegyeinek hangsúlyozásával. Florence Griffith Joyner az 1988-as nyári olimpiai játékokon 100 méteres síkfutásban, 200 méteres síkfutásban és női négyszer 100-as váltóban is aranyérmet szerzett, tehát háromszoros olimpiai aranyérmes lett. Egy évvel később, 1989-ben válogatott atlétatársa, Darrel Robinson azt nyilatkozta, hogy tőle kért növekedési hormonokat. 1989-ben Florence Griffith Joyner a versenyzéstől és a közéletől is visszavonult, és a nagyközönség számára az volt a legközelebbi hír róla, hogy 1998-ban, 38 éves korában elhunyt.

4. Az analitikai kémia feladatai a doppingellenőrzésben

A doppingvizsgálatra szánt minták kb. 80 %-a vizelet, kb. 18 %-a vér. Hajból, nyálból, székletből, kilélegzett levegőből a mintavételnek kb. 2 %-a történik. A két legfontosabb mintatípusra, a vizeletre és a vérre vonatkozó analitikai, illetve mintavételi előnyök és hátrányok olvashatóak a 2. táblázatban

2.Táblázat. A vizeletből ill. vérből történő mintavétel előnyei és hátrányai.

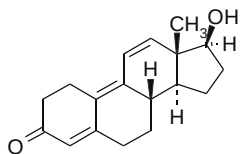
A minta típusa	Előny	Hátrány
Vizelet	Kényelmes Noninvazív Gyors	Metabolitok sokasága
Vér	Peptidhormonok nagyobb koncentrációja Manipuláció kizárása Hematológiai paraméterek Genetikai ujjlenyomat	Invazív Kis molekulák kis koncentrációja Gyors feldolgozást igényel

Az analitikai feladat fázisai:

- Mintaelőkészítés, mely áll az adott komponensre, vagy komponensekre történő esetenkénti bekoncentrálásból, a háttértől (endogén és exogén anyagoknak az összessége) való elkülönítésből. Eszközei a folyadék-folyadék extrakció, a folyadék-szilárd extrakció és a preparatív, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia. Szintén a mintaelőkészítés lehetséges része a származékképzés, ami elsősorban gázkromatográfiás vizsgálatok esetén fordul elő.
- Az elválasztástechnikában a gázkromatográfia, a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia^{8,9}, valamint bizonyos immuno-assay módszerek¹⁰ találhatók meg, de újabban megjelent a kapilláris elektroforézis is.
- A detektálás, azonosítás, meghatározás fázisában a WADA ma már azonosítási célra nem tekinti elfogadhatónak a retenciós faktor, vagy a Kováts-index használatát. Valamilyen tömegspektrometriás¹¹ detektálásra van szükség. Újabban a tandem tömegspektrometria, a nagyfelbontású tömegspektrometria és az izotóp arányon alapuló tömegspektrometria is használatos. Esetenként ultraibolya abszorpciós spektroszkópiás detektálással is találkozunk.¹² A tiltott szerek vizeletben illetve vérben, meglehetősen széles határértékek szerint fordulhatnak elő. Például, az anabolikus ágensek közül több olyan is van, amely 1 vagy 2 ng/ml koncentrációban engedhető meg^{11,13}, ami figyelembe véve a molekulatömegeket, 10^{-8} – 10^{-9} mol/dm³-es koncentrációt jelent. Az összes többi kismolekulájú szer többségénél, (stimulánsoknál, kábító fájdalomcsillapítóknál¹², β -blokkolóknál, diuretikumoknál¹⁴, glükokortikoidoknál¹⁵), ennél jelentősebben, két vagy három nagyságrenddel magasabb a megengedett koncentráció. A peptidhormonoknál, például az eritropoietinnél^{16,17}, a doppinganalitikai feladat rendkívül összetett, amit a későbbiekben részletesebben áttekintünk.

A doppinganalízisnek több sajátossága is van. Az egyik az, hogy doppingszerként endogén anyagok, azaz olyan vegyületek is használhatók, melyeket maga a szervezet is termel. Ezért doppingolási célra való alkalmazásuk kimutatása igen nagy körültekintést igényel. A másik jellegzetesség a doppinganalízisben a metabolizmus.

Azaz a szervezetbe bekerülő doppingszer a metabolizáló rendszerben átalakul, az esetek túlnyomó többségében nagyobb vízoldhatóságú származékká. Mivel azonban egy vegyületből számos metabolit képződik, amelyek maguk is aktívak lehetnek biológiai folyamatok befolyásolásában, ezért ezen metabolitokat is szükséges detektálni és meghatározni ahhoz, hogy tudjuk, használt-e a sportoló doppingszert. Harmadik jellegzetessége a doppinganalízisnek, hogy doppingnak jelenleg olyan szerek és módszerek tekinthetők, melyeket a WADA annak nyilvánít. Így, ha készítenek valahol szintetikus olyan szert, amely a WADA doppinglistáján még nem szerepel, azt de jure a sportoló használhatja. Természetesen ezen szerek az analitikai kimutatása és meghatározása, újabb külön feladatot jelent, mégpedig akkor, ha majd a WADA listáján is szerepel az adott szer. Ezek a kábítószeranalitikában „design drug”-nak nevezett szerek analógjai, azzal a különbséggel, hogy míg kábítószerek esetén az újabb szerek általában nagyon primitív körülmények között készülnek a különböző rejtett laboratóriumokban, addig doppingszerek esetén jó ok van feltételezni azt, hogy a szerek a legmodernebb technológiák alkalmazásával, a tudomány eredményeinek felhasználásával készülnek, eléggé el nem ítéhető és igen sajnálatos módon. (Ennyiben hasonlítanak a gyógyszerek kifejlesztéséhez)



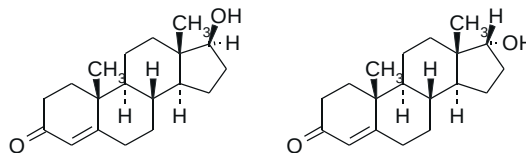
3.Ábra. Egy kizárólag dopping célra kifejlesztett anyag, a trenbolon.

A doppinganalízisnek így további jellegzetessége a versenyfutás a dopping ellenőrzéséért felelős szervezet, a WADA, és ennek támogatói, valamint a doppingolást alkalmazó, támogató, és – sajnálatos módon – a versenyzők egészségével és a fair-play-jel mit sem törődő szakemberek és szerveződések között.

5. Néhány érdekes példa a doppinganalitikából

A tesztoszteron, abba a kategóriába tartozik, amikor a doppingként használatos anyagot a szervezet maga is termeli. Megoldás lehetne, ha a szervezet számára szükségesnél nagyobb mennyiségben jelen levő szert már doppingszernek tekintenék. Számos anyag esetében ez így igaz. A tesztoszteronnál azonban az a nehézség adódik, hogy koncentrációja az egyének testnedveiben tág határok közt tud változni. Önmagában tehát egy viszonylag magas tesztoszteron koncentráció nem feltétlenül bizonyítéka a doppingolásnak. Ezért a tesztoszteronra vonatkozó doppingvizsgálat az epitesztoszteronra vonatkozó vizsgálattal egészül ki. Az epitesztoszteron, amelyben a tesztoszteronhoz képest a 17-es szénatomnak ellentétes a konfigurációja, és amely szintén endogén anyag, viszonylag állandó koncentrációban fordul elő az egyének szervezetében. Ezért a WADA 2005-től érvényes eljárása szerint, tesztoszteron dopping vétségnek az bizonyul, ha a tesztoszteron-epitesztoszteron koncentráció aránya meghaladja a 4:1 értéket. Hogy ez mennyire megbízható, arra az ad információt, hogy 2005 előtt ez a bizonyos érték 6:1 volt. Ezen tesztoszteron tesztnél megbízhatóbb

eljárás az izotóparány mérésén alapul.^{18,19} Ennek lényege, hogy az emberi szervezet által termelt tesztoszteronban a ¹³C illetve a ¹²C izotóp koncentrációk aránya nem ugyanaz, mint az exogén módon a szervezetbe vitt tesztoszteronnak az esetében.



4.Ábra. A tesztoszteron és az epitesztoszteron

A tömegspektrometria igen nagy érzékenysége és kicsiny hibája miatt alkalmas a ¹³C/¹²C arány nagy pontossággal történő meghatározására, így segítségével a szervezetből származó, természetes illetve a külső módon bevitt tesztoszteron koncentrációinak aránya is megadható, tehát a doppingvétség megállapítható.¹⁹

Korunk egyik legnagyobb doppingolási problémája, egyben vegyülete az eritropoietin, röviden EPO^{16,17}. Az EPO a vesében termelődik, a csontvelőben a vörösvértestek előalakjainak képződéséhez nélkülözhetetlen, termelődését a vérben lévő oxigén koncentrációjának csökkenése fokozza. Vesekárosodásban az EPO életmentő gyógyszernek minősül. Kémiaiailag 165 aminosavból álló glikoprotein, 2 diszulfid-híddal, szialinsav részvételével. Kb. harmincezer Dalton molekulatömegű, 40%-ban szénhidrátot tartalmazó molekula. A vérben 10-12 mol/dm³ koncentrációban fordul elő. A külső módon bevitt EPO felezési ideje 6 óra. Tehát ha EPO-t juttatnak a szervezetbe, annak a fele 6 óra alatt elbomlik és 12 óra múltán az eredetileg bejuttatott mennyiségnek már csak a negyede található meg a vérben. Újabban, biotechnológiai módszerekkel előállítottak a humán EPO-hez hasonló, rekombináns humán EPO-féleségeket. Ilyenek a rHuEPO-α és a rHuEPO-β, valamint a darbepoetin. A darbepoetin a natív humán EPO-tól az aminosav szekvenciában és az oligoszaccharid oldalláncokban tér el. Hatásuk – a rekombináns humán EPO-knak és a darbepoietinnek is – azonos az endogén EPO-ével. Az EPO-féleségek elsősorban állóképességi sportokban (országúti kerékpározás, cross-country sélés, maratoni futás, triatlon) kerültek a doppingszerek közé. Az EPO-nek a doppinganalitika szempontjainak is eleget tévő meghatározása 2000-re, a Sydney-i olimpiai játékokra alakult ki. Önmagában az EPO vérkoncentráció meghatározása nem elegendő a doppingolás megállapítására. A Sydney-i olimpiai játékokra elfogadott módszer tartalmazza a vér hematokrit értékének, három alakos elem – az eritrocita, makrocita és retikulocita – számának (1 ml vérre vonatkozóan), az eritropoietin koncentrációnak, valamint az oldható transzferrin-receptor (STR) vérkoncentrációjának a meghatározását. Ezen értékek összességéből állapítható meg, hogy a sportoló használt-e EPO-t doppingolási célra.

6. A géndopping

Korunk legsúlyosabb doppingolási problémája a géndopping, ami a biotechnológia rohamos fejlődésével és a humán genom mind részletesebb megismerésével vált lehetővé. Mára tudjuk, hogy az emberi génkészlet mintegy 30 000 génből

áll. Ebből 2003-as adatok szerint, 126 olyan gént sikerült azonosítani, amely a sportteljesítmény valamely változatát befolyásolja. Ilyen a vörösvértestszámot meghatározó, ezért az oxigénszállítást és a hemodinamikai tulajdonságokat befolyásoló gén, vagy az antropometriával, testösszetétellel és a szervezetben található izommennyiséggel összefüggő, azt megszabó gén. További ilyen gének az inzulinépződést, szénhidrát háztartást, valamint a lipidanyagcserét befolyásoló gének. A sportteljesítmény genomikája napjainkban két, összefüggő fogalomra épül. Egy élsportoló kiválasztásakor, két típusú munkát végeznek el: Az egyik a sportolójelölt fiatalember genotipizálása, amely magában foglalja a DNS, RNS, fehérje összetétel jellemzését. A másik a fenotipizálás, amely magában foglalja a sportoló szüleinek, felmenőinek a sportolási hajlam, sportteljesítmény szempontjából való felmérését. Nyilvánvaló, hogy akkor van több esélye valakinek arra, hogy élsportoló legyen, ha a szülei között is található volt élsportoló. Hazánkban ismeretes számos, kiváló sportolókat magába foglaló dinasztia, például vízilabdázásban ilyen a Szívós család, vízisportokban a Gyarmati Dezsőt, Székely Évát, Gyarmati Andreát, Hesz Mihályt, Hesz Mátét magába foglaló család.

Ha tehát egy sportoló genotípusában és fenotípusában egyaránt jó esélyű, akkor érdemes vele foglalkozni a továbbiakban is, mondják a kiválasztással foglalkozó szakemberek. Eddig a folyamat talán el is fogadható.

Kérdés azonban egyrészt, hogy szabad-e genetikai módszerrel beavatkozni egy ember életébe, a sportoló biológiájába, másrészt pedig, hogy rendelkezik-e a tudomány olyan eszközökkel, amelyek egy sportolójelölt embernek a génállományát megváltoztatni képesek? A molekuláris biológia eszköztára napjainkra olyan szintre fejlődött, hogy adott DNS szakaszt bevinni egy sejtbe már megoldható feladat. Ennek első fázisa az, hogy azt a DNS szakaszt, mely egy adott sporttulajdonságot kódol, valamilyen kémiai hordozóhoz kell kapcsolni. Ez lehet liposzóma, vagy patogénmentesített vírusfehérje. Ezzel be lehet juttatni a komplexet a sejtbe, így a sejtmag génállománya megváltozik. A sejtmag génállományának a megváltozása ennek megfelelő expresszációként jelent a riboszómán, a mRNS-en és a fehérjéken. Vagyis a sportoló fehérjei – például az izomzatában – a megújított, megváltoztatott génállomány szerint fognak alakulni. Ma vannak genetikailag módosított, transzgenetikus állatok, például egerek. Ismert példája ennek a knock-out egér, a Schwarzenegger-egér, vagy a maratoni egér. A Schwarzenegger-egér – természetesen – a túlfejlett izomzatáról ismert, a maratoni egér pedig a rendkívüli munkabírájáról. A legnagyobb, legsúlyosabb kérdés ma az, hogy vannak-e genetikailag módosított sportolók? Erre ma nem lehet egyértelmű választ adni. Annyi biztos, hogy a WADA-nak napjainkban nincs még módszere a géndopping kimutatására. Ha géndopping történik, vagyis a sportoló genetikailag módosított, akkor az új génállománnak megfelelően működik a szervezete, például izomzata, amely táplálékból keletkezik, összetételét tekintve ugyanolyan lesz, mintha nem lenne módosított a génállománya. A kimutatás tehát rendkívül nehéz. Teljes mértékben támogatható és helyeselhető az az álláspont, hogy el kell kerülni azt, hogy tényleg sportolók legyenek a jövőben. Jelenleg a WADA minden nyilvános pályázata – nagyon helyesen – a géndopping megelőzését, elkerülését célozza.

7. Következtetések

Az analitikai kémiának tehát, a dopping kimutatásában igen nagy szerepe van napjainkban. A géndopping kimutatása a jelenlegi analitikai kémia lehetőségeit, eszköztárát meghaladja, de biztosan állítható, hogy a jövő analitikai kémiája a géndopping kimutatásában is igen nagy szerepet fog játszani.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondunk a jelen munkához nyújtott sokoldalú segítségért

- Dr. Pucskok Józsefnek
- Dr. Hollósi Ildikónak
- Dr. Dékány Miklósnak az Országos Sportegészségügyi Intézet munkatársainak
- Az Országos Tudományos és Kutatási alaphoz (T43579)
- És az Egészségügyi Tudományos Tanácsnak (535/2003)

Hivatkozások

1. The World Anti-Doping Code. *The 2005 Prohibited List, International Standard WADA*, (http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/list_2005.pdf).
2. Riess, J.G., Krafft, M.P.: Fluorinated materials for in vivo oxygen transport (blood substitutes), diagnosis and drug delivery. *Biomaterials* **1998**, 19, 1529–1539.
3. Spence, R.K.: Perfluorocarbons in the twenty first century: clinical applications as transfusion alternatives. *Artif. Cell Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **1995**, 23, 367–380.
4. von Deutsch, D.A., Abukhalaf, I.K., Wineski, L.E., H.Y. Aboul- Enein, Pitts, S.A., Parks, B.A., Oster, R.A., Paulsen, D.F., Potter, D.E.: β -Agonist-Induced Alterations in Organ Weights and Protein content: Comparison of Racemic Clenbuterol and Its Enantiomers. *Chirality* **2000**, 12, 637–648.
5. Gurley, B.J., Wang, P., Gardner, S.F.: Ephedrine type alkaloid content of nutritional supplements containing Ephedra sinica as determined by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 1547–1553.
6. Trociewicz, J.: Sample preparation of amphetamine and methamphetamine by means of supported liquid membrane technique for high-performance liquid chromatography analysis. *J. Separation Sci.* **2001**, 24, 587–592.
7. Halvarsen, T.G., Pedersen-Bjergaard, S., Reubsaet, J.L.E., Rasmussen, K.E.: Liquid-phase microextraction combined with flow-injection tandem mass spectrometry. Rapid screening of amphetamines from biological matrices. *J. Separation Sci.* **2001**, 24, 615–622.
8. Báthori, M., Kalász, H.: Separation Methods for Phytoecdysteroids. *LC-GC Europe* **2001**, 14, (10), 626–633.
9. Dear, G., Mallett, D., Plumb, R.: Applications of Capillary LC/MS to Drug Metabolism Studies. *LC-GC Europe* **2001**, 14, (10), 616–625.
10. Cody, J.T., Schwarzhoff, R.: Fluorescence Polarization Immunoassay Detection of Amphetamine, Metamphetamine, and Illicit Amphetamine Analogues in *Drug Testing in Sports* D.I. Black. Preston Publ., Niles, U.S.A., **1995**. p. 53–57.
11. Buiarelli, F., Cartoni, G.P., Amendola, L., Botré, F.: Screening and confirmation analysis of anabolic agents in human urine by gas chromatography-hybrid mass spectrometry (high resolution-time of flight). *Anal. Chim. Acta* **2001**, 447, 75–88.
12. Crump, K.L., McIntyre, I.M., Drummer, O.H.: Simultaneous Determination of Morphine and Codeine in Blood and Bile, Using Dual Ultraviolet and Fluorescence High-Performance Liquid Chromatography in the same book (see above) p.

- 94–98. 2002/4. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 243
13. Choo, H.-Y.P., Kwon, O.-S., Park, J.: Qualitative Determination of Stanozolol and Its Metabolite in Urine by Gas Chromatography/Mass Spectrometry in the same book (see above) p. 110–113
 14. Park, S.-J., Pyo, H.-S., Kim, Y.-J., Kim, M.-S., Park, J.: Systematic Analysis of Diuretic Doping Agents by HPLC Screening and GC-MS Confirmation in the same book (see above) p. 133–139.
 15. Park, S.-J., Kim, Y.-J., Pyo, H.-S., Park, J.: Analysis of Corticosteroids in Urine by HPLC and Thermospray LC/MS in the same book (see above) p. 161–170.
 16. Ohta, M., Kawasaki, N., Hyuga, S., Hyuga, M., Hayakawa, T.: Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography-electrography ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2001**, 910, 1–11
 17. Parisotto, R., Gore, C.J., Ernsly, V.R., Ashenden, M.J., Brugnara, C., Howe, C., Martin, D.T., Trout, G.J., Hahn, A.G.: A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* **2000**, 85, 564–572
 18. Aguilera, R., Becchi, M., Casabianca, H., Hatton, C.K., Catlin, D.H., Starcevic, B., Pope, H.G.: Improved method of detection of testosterone abuse by GC/IRMS analysis of urinary steroids. *J. Mass Spectrom* **1996**, 31, 169–176
 19. de la Torre X, Gonzalez JC, Pichini S, Pascual JA, Segura J. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal.* **2001 Feb**; 24(4):645-50.

Doping in athletics: aspects of Analytical Chemistry

The types and groups of prohibited doping substances and methods are discussed, referring to the WADA Prohibited List. These groups are: the in-and -out-of-competition, the in-competition prohibited substances and methods and those prohibited in specific sports only. There are five groups in the category of in-and -out-of-competition prohibited substances: anabolic agents, peptide hormones, bronchodilator β_2 -agonists, anti-estrogens, diuretics and other masking agents. Within the category of in-competition prohibited substances, the groups are: stimulants, narcotic analgesics, cannabinoids, glucocorticosteroids. The sport-specific prohibited substances are the beta-blockers and the ethanol. Some examples from the history of olympic games, and soccer championships to confirm the importance of the doping problem, are cited: the Ben Johnson scandal in Seoul, Maradona's doping affair in the Soccer World Cup in 1994. The advantages and difficulties working with different biological samples, are described, focusing on the most important sources: blood and urine samples. The methods for sample purification, separation of the components, identifications and quantifications, problems related to doping analysis are discussed. These are: the endogenous

compounds, occurring of some doping substances, the wide range of concentrations in biofluids, the complicated and diversified metabolism and the high-tech support of doping substance production. In the last part of the article three major problems are covered: the novel trends in the anabolic steroid doping, and doping analysis – especially, the emerging role of isotope ratio mass spectrometry – the upcoming use of haematopoietic agents with special regard to recombinant human erythropoietin, rHu-EPO. These drugs are applied in endurance sports, demanding long-range, long-time physical efforts, and the concomitant enhanced oxygen consumption. The bioanalytics of EPOs is highly complex, not only chemical but haematological task, because counting of certain blood cell forms is necessary. The third, most challenging task is: fighting gene doping. It is well-known that genetic factors affect sporting capabilities of humans, and some efforts were made to select the genetically and phenotypically appropriate persons. The most important ethical problem is, however, to set the border between the acceptable genetic modifications and the harmful (and therefore illegal) gene doping manipulations. This is very similar to that doubtful gene manipulations in food production.

Új vizsgálati irányzatok a farmakokinetika és gyógyszermetabolizmus kutatásban

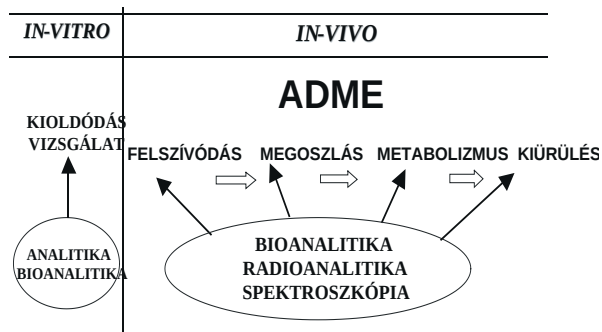
KLEBOVICH Imre

Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet, Högyes E. u. 7., 1092 Budapest

1. Bevezetés

A XXI. század gyógyszerkutatásában a farmakokinetika és a gyógyszermetabolizmus kiemelt szerephez jutott. Egyedüli tudomány terület, amely a felfedező kutatástól a törzskönyvezés utáni vizsgálatokig a gyógyszer innováció teljes K+F vertikumát átfogja. A kapott információ eszenciálisan hozzájárul az új farmakon alapvető biztonsági, hatásmechanizmus, dózis-hatás, dózis-kiválasztás, interakciók, aktív metabolitok, stb. területeinek megismeréséhez. Így a farmakokinetika, illetve gyógyszermetabolizmus különböző területei^{1,2} átvitt értelemben egy „állandó kapocs”-nak nevezhetők a farmakon szervezetbeni sorsa, koncentráció-idő változásai és azok elméleti és gyakorlati terápiás vonatkozásai között. A testidegen anyagok – a xenobiotikumok – (a gyógyszerek is) szervezetbeni sorsának kvantitatív és kvalitatív nyomon követését az **ADME** betűszóval lehet jellemezni.

A farmakokinetikai és metabolizmus kutatásban az analitikai és bioanalitikai, radioanalitikai, valamint a metabolitok szerkezetkutatásához alkalmazott spektroszkópiai módszerek tematikus összefoglalását szemlélteti az 1. Ábra.



1. Ábra. Analitikai/bioanalitikai módszerek összefoglaló sémája az in-vitro kioldódás és in-vivo ADME vizsgálatokban

2. Farmakokinetika és metabolizmus kutatásban alkalmazott módszerek és új vizsgálati irányzatok

A különböző típusú farmakokinetikai, metabolitkinetikai és toxikokinetikai vizsgálatokat csak a szigorú hatósági előírások és szabályozások alapján kidolgozott és validált bioanalitikai módszerekkel lehet végezni, amelyek az évek során jelentősen változtak, általában szigorodtak³.

A szervezetben lejátszódó részletes **ADME** folyamatokat csak a különböző biológiai mátrixokból, bioanalitikai módszerekkel kapott kvalitatív (pl. szerkezetazonosítás) és kvantitatív információval (koncentráció-idő függvényből számított farmakokinetikai paraméterek) lehet leírni.

Az extra igényekhez (érzékenység, szelektivitás, stb.) csak igen korszerű bioanalitikai, elválasztástechnikai, radiokromatográfiás, spektroszkópiai módszerekkel felelhetünk meg, amelyek jelentős átstrukturálódáson estek át az elmúlt néhány évben. Az itt alkalmazható metodikák jelentősen eltérnek a klasszikus „szubsztancia analitikában” használt szélesebb palettájú vizsgálati, detektálási lehetőségektől, mivel a kémiai jel/zaj viszony szignifikánsan különbözik a biológiai mátrixokban (plazma, vizelet, széklet, nyál, epe, szövet, stb.).

Az 1. és 2. Táblázat összefoglalja a XXI. században a farmakokinetikai és metabolit kutatásban alkalmazott legfontosabb bioanalitikai, radioanalitikai és spektroszkópiai módszereket.

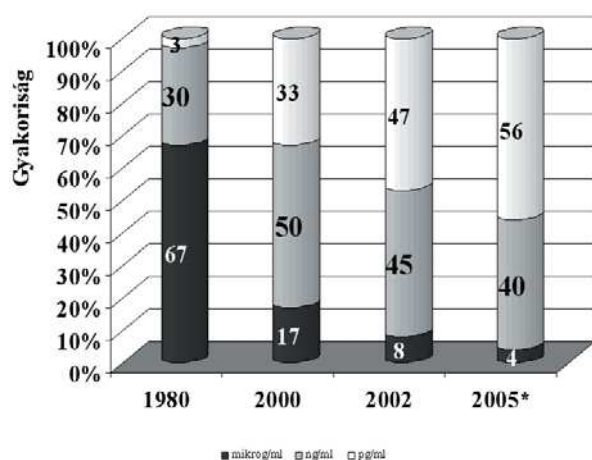
1. Táblázat. A farmakokinetikai gyakorlatban alkalmazott legfontosabb bioanalitikai technikák és detektálási módjai⁴

Technikák	Detektálási mód
I. Gázkromatográfia	FID
GC	NPD
	ECD
	RD
	MSD (P/N-EI, P/N-CI)
II. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	UV, DAD
HPLC	FLD
	EC
	RD
	RD-MS
	MSD (ESI, APCI, APPI)
	MS/MS (ESI, APCI, APPI)
III. Kapilláris elektroforézis	UV, DAD
CE	FLD
	MSD
IV. Kapillár elektrochromatográfia	DAD
CEC	FLD

Egyre hatékonyabb, korszerűbb gyógyszerek kerülnek törzskönyvezésre, azaz az alkalmazott dózis alacsonyabb lett és ennek következtében a szisztémás keringésbe jutó hatóanyag és a keletkező metabolit(ok) koncentrációja is jelentősen csökkent. Mindezek a tendenciák, a farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatokat végzőket egyre érzékenyebb és specifikusabb bioanalitikai, elválasztástechnikai, radioanalitikai (³H-, ¹⁴C-) és

*Klebovich Imre. Tel./Fax: (1)-217-0914; e-mail: klebovich@hogyes.sote.hu

szerkezetkutatási módszerek fejlesztésére készítették. Ezt lehetővé tette az elmúlt időszak igen intenzív műszer fejlesztési trendje, a kapcsolt technikák intenzív elterjedése: LC-MS/MS, LC-NMR, OPLC-RD, stb.), amely átütő eredményeket hozott a bioanalitika, radioanalitika, így a farmakokinetika és a metabolitok szerkezetkutatása területén⁴⁻⁶. A világon jelenleg törzskönyvezett legjelentősebb forgalmú hatóanyagok közül a legfontosabb 50 készítménynek, többmint 56 %-a csak igen alacsony plazmakoncentrációt (fg/ml, pg/ml) ér el emberben, további 40%-a a ng/ml átlagos plazmakoncentráció tartományba esik. Csak a készítmények 4%-ának a vérszintje esik a magasnak számító µg/ml koncentráció-tartományba. A 2. Ábra szemlélteti az elmúlt 25 év "drámai vérszint-változását" a legjelentősebb 50 hatóanyag esetén⁷.



2. Ábra. A világon törzskönyvezett legjelentősebb 50 gyógyszer-készítmény plazmaszintjeinek (LLOQ) megoszlása emberben (*2005 áprilisi adat)

Ezek a plazmakoncentráció arányok jelentősen változtak az elmúlt 25 év alatt, amely következménye a vegyületek egyre javuló farmakológiai hatékonyságának (alacsony dózis), valamint a programozott hatóanyag leadású retard készítmények jelentős elterjedésének a terápiában (alacsonyabb C_{max} plazmakoncentráció) (3. Táblázat).

Ezért a ma farmakokinetikai gyakorlatában a legtöbb korszerű bioanalitikai módszer kidolgozásánál igen nagy érzékenységet (fg/ml, pg/ml, ng/ml) és szelektivitást biztosító módszert (pl. LC/MS/MS) szükséges alkalmazni.

A fenti okok és az analitikai kémia intenzív fejlődése átstrukturálta a századforduló környékén a „rutinban” alkalmazott nagy érzékenységű bioanalitikai módszerek tárházát.

A világ vezető nagy „CRO”-inak (contract research organisation) statisztikai adatai (2004)⁸ alapján, a különböző kapcsolt MS technikákat alkalmazzák (78%) messze a leggyakrabban: LC-MS/MS 58%; LC-MS 10%; GC-MS 8%; CE-MS 2%. Ezt követi a kissé háttérbe szorult HPLC

(15%) technika: HPLC-UV/DAD 9%; HPLC-FLD 4%; HPLC-EC 2%. A korábban jelentős gázkromatográfia is nagymértékben veszített (7%) a gyakoriságából: GC-NPD 4%; GC-ECD 2%. Az egyéb alkalmazott módszerek közül a kapilláris elektroforézis (CE) és a RIA mintegy 3%-ot képvisel az alkalmazott technikák gyakoriságában.

2. Táblázat. A XXI. század kezdetének metabolizmus kutatásában alkalmazott vizsgáló módszerek komplex összefoglalása

Metabolitok izolálása, elválasztása és szerkezetkutatása	Módszer
I. On-line kapcsolt technikák	• GC-MS (P/N-EI; P/N-CI) • GC-FTIR • LC-MS (ESI; APCI; APPI) • LC-MS/MS (ESI; APCI; APPI; TOF; TOF/TOF; Ion Trap; PDA) • LC-NMR • LC-NMR-MS/MS • OPLC-RD • OPLC-RD-MS/MS • OPLC-RD-NMR
II. Off-line technikák	• NMR • Nanoprobe®-NMR • FAB-MS(-MS) • EI-MS • MALDI • OPLC-DAR-FAB/MS/MS
III. „Kvázi” on-line technika	
IV. Különböző spektroszkópiai módszerek kombinációja	• Szerkezetkutatásban különféle technikák kombinációjának alkalmazása
V. Speciális nukleáris technikák	• Folyadék scintillációs spektroszkópia (LSC) • Tradicionális film kontakt autoradiográfia • Teljes test autoradiográfia • Nukleáris égetés • RIA • DAR • PIT Foszfor imaging technikák (radioluminográfia)
VI. Egyéb technikák	• Egyensúlyi dialízis (fehérjekötődés) • Enzimes hidrolízis (metabolizmus) • Kombinált eljárások (metabolizmus)

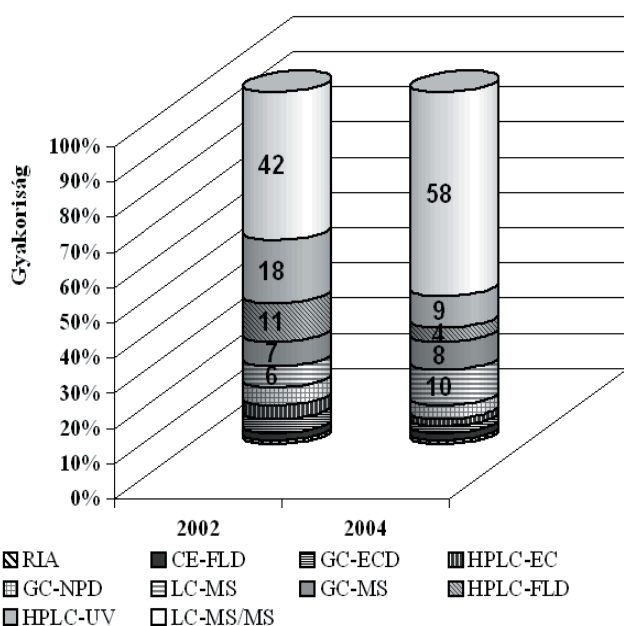
3. Táblázat. Extrém alacsony plazmakoncentrációk lehetséges okai

Farmakológiai aspektus:

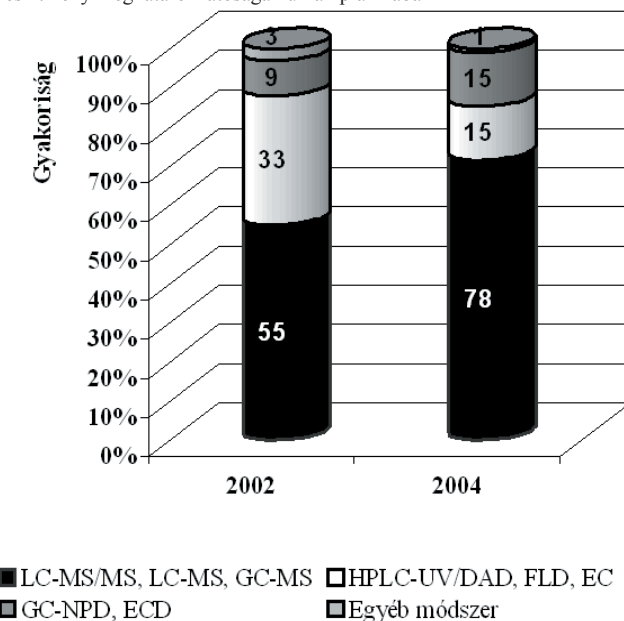
- Nagy farmakológiai hatékonyság (alacsony dózis)
- Alacsony biológiai hasznosíthatóság (F)
- Intenzív metabolizáció (First-pass metabolizmus)
- Jelentős szöveti kötődés (V_d)
- Igen erős kötődés a plazmafehérjékhez (albumin, α_1 -AGP, globulin)

Gyógyszer-technológiai aspektus:

- Programozott hatóanyagleadású retard készítmények



3. Ábra. A világon törzskönyvezett legjelentősebb 500 gyógyszer-készítmény meghatározhatósága humán plazmában



4. Ábra. A humán farmakokinetikai gyakorlatban alkalmazott humán bioanalitikai módszerek megoszlása

A mai farmakokinetikai gyakorlatban a különböző GC/MS, de elsősorban az LC/MS/MS technika már „elsőprő” gyakoriságú tendenciát mutat. A „CRO”-k jelen vizsgálati gyakorlata mutatja, hogy az LC/MS/MS technikát különböző ionizációs módjaival (ESI, APCI és APPI), már nem csak az extrém érzékenységgű (fg/ml, pg/ml) metodikáknál alkalmazzák, hanem az ng/ml és µg/ml nagyságrendű koncentráció tartományban is, mivel relatíve érzékeny, szelektív, gyors és olcsóbb a hagyományos GC és HPLC technikákhoz képest.

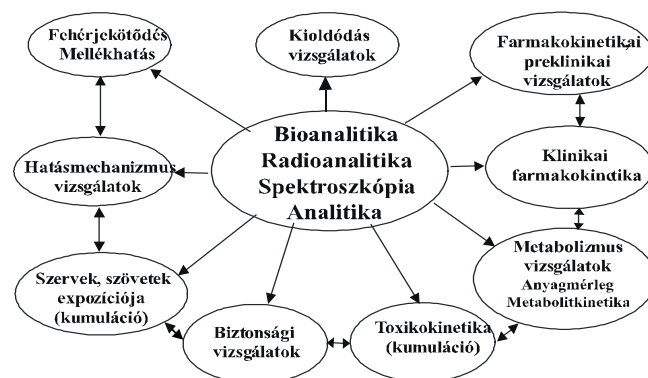
A 3. és 4. Ábra jól demonstrálja, hogy a XXI. század első évtizedének elején két év alatt a HPLC-MS/MS technika 42%-ról 58%-ra „drámaian” előretört az alkalmazásban. Ha az összes MS kapcsolt technikákat szemléljük a változás még szembetűnőbb, két év alatt 55%-ról 78%-ra emelkedett a farmakokinetikai gyakorlatban alkalmazott gyakoriságuk.

Az utóbbi években újra felértékelődött a radiokémiai on-line többféle detektálású kapcsolt technika (HPLC-RD; GC-RD; OPLC-RD), amely komplex képet ad az anyavegyület és a metabolit(ok) farmakokinetikai, metabolitkinetikai viselkedéséről, továbbá az off-line TLC/OPLC-DAR/ Foszfor imaging kapcsolt technikák, amelyek esszenciálisak a metabolit izolálás és tisztítás területén. A teljes test autoradiográfiás, valamint az off-line OPLC-RD vizsgálatok napjainkban szinte kizárólagosan csak a radioluminográfia (PIT) és/vagy a DAR technikával végezhetőek^{9,10}.

A metabolit kutatásban az alkalmazott metodikák változása még szembetűnőbb. A ma ismert összes „kapcsolt technikát” alkalmazzák a metabolit izolációban, tisztításban és a metabolit szerkezetazonosításában (2. Táblázat).

3. Összefoglalás

Az originális gyógyszerek igen sokrétű, komplex preklinikai és klinikai aspektusai bizonyítják, hogy a teljes innovációs időszak alatt (K + F) szükséges a különböző típusú farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatok végzése¹¹⁻¹³, amihez a bioanalitikai és spektroszkópiai módszerek egész tárházát kell alkalmazni¹⁴. A farmakokinetika és gyógyszermetabolizmus kutatása tipikusan multidiszciplináris területet ölel fel, ami az originális gyógyszervegyületek esetében csak igen jelentős szellemi, valamint anyagi ráfordítással lehetséges.



5. Ábra. Bioanalitikai módszerek és a gyógyszerkutatás kapcsolata

Összefoglalásképpen a 4. táblázat bemutatja, hogy egy originális gyógyszervegyülettel végzett preklinikai és klinikai farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatok a törzskönyvezést milyen alapvető információval segítik.

A bemutatott bioanalitikai, spektroszkópai módszerek nélkül az alábbi esszenciális információk (ADME, biztonsági, terápiás, hatásmechanizmus, mellékhatás, stb.) nem lennének elérhetőek.

4. Táblázat. Bioanalitikai módszerek által kapott farmakokinetikai és metabolizmus információk, amelyek hozzájárulnak a törzskönyvezéshez

- Gyógyszer sorsának kvalitatív és kvantitatív nyomon követése a szervezetben: ADME, ADME_{TOX}
- Dózis - hatás kapcsolat megismerése
- Dózis kiválasztás segítése
- Inter- és intra- individuális különbségek bizonyítása
- Gyógyszer interakciók feltérképezésének segítése: gyógyszer-gyógyszer, gyógyszer-étel, -alkohol, -nikotin, -drog, stb.
- Mellékhatások megismerésének segítése
- Farmakológiai aktív metabolitok és farmakokinetikájuk megismerése
- Metabolitok esetleges sztereoizomériájának bizonyítása

Mindez alátámasztja a farmakokinetikai és gyógyszermetabolizmus vizsgálatok¹⁵⁻¹⁷ évek óta tartó jelentős szakmai felértékelődését, súlyát és ezzel párhuzamosan egyre növekvő költség- és idő-igényét.

Hivatkozások

1. Meibohm, B.; Derendorf, H. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 18-31.
2. Bertrand, M.; Jackson, P.; Walter, B. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *Suppl. 2*, S61-S72.
3. CDER/FDA. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method*

New bioanalytical investigation trends in pharmacokinetics and drug metabolism research

Complex and comprehensive preclinical and clinical aspects of new chemical entities (original drugs), prove that different types of pharmacokinetic and metabolism studies are essential in the course of the whole innovation period (research and development), and for these purposes the application of bioanalytical and spectroscopic methods are of great importance. **ADME** (Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination) processes of organs can be exclusively described by qualitative (structure identification) and quantitative bioanalytical information (pharmacokinetic parameters determined from concentration vs. time) derived from different species and their various biological matrices (plasma, serum, saliva, bile, feces, tissue, mother milk, microsome, hepatocytes...) where the chemical signal/noise ratio could be significantly different. The investigation of pharmacokinetics and drug metabolism is a typical multidisciplinary field of drug research. Since more and more efficient drugs are marketing authorized, the applied doses decreased and consequently the concentration of actives and the resulting metabolites is considerably decreasing.

Validation, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, **2001**.

4. Evans, G. Ed.; *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*, CRC Press, Boca Raton, **2004**.
5. Korfmacher, W.A., Ed.; *Using mass spectrometry for drug metabolism studies*, CRC Press, Boca Raton, **2005**.
6. Cazes, J., Ed.; *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker: New York, **2001**.
7. Script adatai alapján, **2000, 2002, 2004, 2005**.
8. USA és Kanadai vezető CRO-k adatai alapján, **2000, 2002, 2004**.
9. Klebovich, I. *Application of planar chromatography and digital autoradiography in metabolism research*. In: Nyiredy, Sz., Ed.; *Planar Chromatography – A Retrospective View for the Third Millennium*, Springer Scientific Publisher: Budapest, **2001**; pp 293-311.
10. Hazai, I.; Klebovich, I. *Thin-Layer Radiochromatography*, In: Sherma, J.; Fried, B., Eds.; *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, 3rd Edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 2003; pp 339-360.
11. Gachályi B.; Lakner G.; Borvendég J., Eds.; *Klinikai farmakológia a gyakorlatban. A humán gyógyszerfejlesztés módszertana*, Springer Scientific Publisher: Budapest, **2003**.
12. Klebovich I. *Gyógyszer sorsa a szervezetben: Farmakokinetika és gyógyszermetabolizmus*, In: Dinya E. Ed.; *Klinikai gyógyszerfejlesztés. A molekulatervezéstől a betegágyig*, Medicina Könyvkiadó: Budapest, **2005**. pp.265-300.
13. Broker, M.; Kreuter, J. *Pharmaceutics, Modern Drugs*, CRC Press, Boca Raton, **2005**.
14. Poole, C.F. *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, **2002**.
15. Schoenwald, R.D. *Pharmacokinetics in drug discovery and development*, CRC Press, Boca Raton, **2002**.
16. Worsfold, P.J.; Townshend, A.; Poole, C.F. *Encyclopedia of Analytical Science, Volume 10, Second Edition*, Elsevier, Amsterdam, **2004**.
17. CDER/FDA. *Exposure response relationship: Guidance for industry*, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, MD, **2003**.

These tendencies inspired the experts dealing with pharmacokinetic and metabolism investigations, to develop more sensitive and specific bioanalytical, separation techniques, radioanalytical (³H-, ¹⁴C-) (LSC, GC-RD, HPLC-RD, on-line-OPLC-RD, Digital Autoradiography DAR, Phosphor Imaging Technique PIT / Radioluminography) and structural investigation methods. The latter was enabled with the intensive spreading of hyphenated techniques (LC-MS/MS, LC-NMR, OPLC-RD...), which resulted in great achievements in the field of bioanalytics, radioanalytics and consequently in pharmacokinetics and metabolism research. In the everyday pharmacokinetic practice, GC/MS, and principally the LC/MS/MS techniques are the most frequently applied methods. According to up-to-date CRO investigations, the LC/MS/MS technique with its different ionization methods (ESI, APCI and APPI) is used not only for determination of extreme sensitive concentrations (fg/ml, pg/ml), but in ng/ml and µg/ml concentration range, as well.

Új irányok a biomolekuláris felismerés detektálásában

GYURCSÁNYI E. Róbert^{a*}

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Általános és Analitikai Kémiai Tanszék, Szt. Gellért tér 4, 1111 Budapest

1. Bevezetés

A biológiai eredetű, illetve jelentőségű molekulák meghatározása a huszadik század analitikai kémiájának egyik legfontosabb, kiemelkedő nehézségű feladata volt. Tekintettel az élettudományok előtt álló kihívásokra várhatóan a bioanalitika nemcsak megőrző kiemelt fontosságát az elkövetkezendő években, hanem jelentősége továbbra is nőni fog. Sokáig sorolhatnánk a bioanalitika alkalmazási területeit, de talán néhány címszó is meggyőző lehet fontosságának megítéléséhez. Többek között meghatározóan hozzájárult az élővilág biokémiai folyamatainak megértéséhez, az orvostudomány és a biotechnológia fejlődéséhez. Ugyanakkor az analitikai meghatározásokkal társuló nehézségeket is könnyű átlátni, ha figyelembe vesszük a biomolekulák szerkezeti komplexitását, változatosságát, számát, időben változó koncentrációját és nem utolsósorban a biológiai minták összetettségét, amelyből a biomolekulákat szelektív azonosításuk után legtöbbször mennyiségileg is meg kell határozni. A biomolekulák szelektív felismerése érdekében az analitika gyakran a természetben fellelhető tág értelemben vett bioreceptor-ligandum kölcsönhatásokra támaszkodik. A biomolekuláris felismerés biokatalitikus reakciókon vagy affinitási kölcsönhatásokon keresztül valósul meg. Ennek megfelelően megkülönböztethetünk *katalitikus aktivitású* (enzimek, mikroorganizmusok, szövetek, sejtek, stb.), illetve *bioaffinitású felismerő komponenseket* (antitestek, lektinek, nukleinsavak, protein receptorok, stb.), amelyeket az esetek döntő többségében szilárd hordozó felületen immobilizálnak és az analitikai eszköz/rendszer részét képezik. Mindkét típusú molekuláris kölcsönhatást sikeresen alkalmazták bioanalitikai célokra. A rendkívül szelektív, esetenként specifikus biomolekuláris kölcsönhatások alkalmazása jelentősen befolyásolta az analitika metodológiát és műszerezettséget. Bevezetésük a bioanalitikába sok esetben lehetővé tette a mintaelőkészítési eljárások és az analitikai műszerezettség egyszerűsítését és ezáltal bioszenzorok kialakítását. A kémiai szenzorok alcsoportját képező *bioszenzorok* a *molekuláris felismerést* biztosító biológiai eredetű felismerő részből és a *fizikai-kémiai* jelátvivő egységből állnak, amelyek egy analitikai eszközben vannak integrálva. Jellemző példaként említhető a vércukormérő bioszenzor, amely alkalmas a glükóz vérből történő közvetlen, mintaelőkészítés nélküli meghatározására. Emellett a szelektív biomolekuláris felismerés kihasználása lehetőséget nyújtott, az adott minta több komponensének egyidejű meghatározására alkalmas analitikai eszközök és módszerek kifejlesztésére is. Ez forradalmi változásnak tekinthető az analitikai kémiában, amely a *biochip* technológia és a *nagy áteresztő képességű bioanalizátorok* kifejlesztéséhez vezetett. Ezekben a rendszerekben a szelektív molekuláris felismerést bioaffinitási kölcsönhatások biztosítják és ennek megfelelően nagyszámú, különböző komponensekre

szelektív felismerő molekulákat alkalmaznak, amelyeket ismert és kontrollált térelosztásban immobilizálnak egy szilárd hordozó felületén. A bioaffinitási kölcsönhatásokon keresztül (pl. antigén-antitest, receptor-ligandum, nukleinsav hibridizáció) rendkívül nagyszámú és a bioanalitika területén kiemelt fontosságú komponens határozható meg. Ezek között említhetők a biológiai eredetű makromolekulák (fehérjék, DNS szálak, stb.), viszonylag kis molekulatömegű komponensek (gyógyszermolekulák, hormonok, stb.) és mikroorganizmusok (vírusok, baktériumok, stb.). Jelen közlemény elsődleges célja, hogy a fehérjék és nukleinsavak affinitáson alapuló felismerésének detektálásában kialakult általános irányvonalakat és újabb eredményeket röviden szemléltesse. Az újabb és újabb detektálási módszerek fejlesztésének hajtóereje a legtöbb esetben a szelektivitás és érzékenység növelése. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy az affinitási kölcsönhatásokon alapuló rendszerekben a műszeres detektálás csak egyike azon tényezőknek amely a kimutatási határt és a szelektivitást meghatározza. Emellett, és a jelen közleményben nincs erre mód részletesen kitérni, a nem-specifikus kötődések és az affinitási kölcsönhatás során kialakult receptor-ligandum komplex stabilitási állandója is alapvetően befolyásolja az analitikai módszer teljesítmény paramétereit.

2. Bioaffinitású felismerő komponensek

A legnagyobb alkalmazási területtel rendelkező bioaffinitású felismerő komponensek az antitestek és nukleinsavak, de a biotechnológia fejlődésének köszönhetően folyamatosan új felismerő molekulák is alkalmazásra kerülnek a bioanalitikai rendszerekben. Ilyenek az aptamerek, peptid-nukleinsavak, illetve a genetikailag módosított proteinek és receptorok.

Antitestek Az antitestek az immunrendszer elsőként azonosított elemei voltak. A ma antitest néven ismert specifikus szérumproteineket, amelyek feladata a különböző fertőző ágensek hatástalanítása, az 1800-as évek végén felfedezték fel.¹ Az antitestek fehérjemolekulák, amelyeket az immunrendszer egy adott antigén hatására termel. Tekintettel arra, hogy az antitestaktivitás általában a szérumfehérjék γ -globulin frakciójával társítható, immunglobulinoknak nevezik őket. Az emberi és állati immunglobulinok diszulfidhidakkal és nem kovalens kötésekkel összekapcsolt polipeptid láncokból, két "nehéz" és két "könnyű" peptidláncból állnak. A peptidláncok N-terminális szakaszán található változó, primer szerkezetet variábilis szakasznak hívjuk és ez a szakasz felelős az antigén és az antitest közötti kötődés létrejöttéért (FAB - fragment antigen binding). Ezzel szemben a peptidláncok C- terminális fele állandó primer szerkezetű (FC-fragment

* Főszerző. Tel.: 463 1592 ; fax: 463 3408 ; e-mail: robertgy@mail.bme.hu

crystalline). Az antitest-antigén kötődés több nem kovalens jellegű kölcsönhatás kialakulásán alapul (hidrogén hidak, elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások). A megfelelő funkcionalitások mellett, a szelektív kölcsönhatást a FAB és az antigén térbeli illeszkedése (komplementaritása) határozza meg. Az antitestek azon jellemző tulajdonsága, hogy a megfelelő antigéneket nagy szelektivitással képesek megkötni (immunreakció) az immunanalitika kifejlődését tette lehetővé. Az immunanalitika tehát azoknak a módszereknek a gyűjtőneve, amelyek specifikus antitest-antigén reakciókon keresztül szolgáltatnak analitikai információt egy adott minta komponenseiről.

Nukleinsavak A nukleinsavak természetben fellelhető két fő csoportját a ribonukleinsavak (RNS) és dezoxiribonukleinsavak (DNS) alkotják. A nukleinsavak polimer makromolekulák, melynek monomerjei, a nukleotidok, purin- illetve pirimidinszármazékok glikozidjainak foszforsav észterei. A DNS szálak szerkezetében előforduló pirimidin bázisok a citozin és timin, míg purin bázisok a guanin és adenin. Az RNS szálakban is hasonló bázisok fordulnak elő de a timin helyett uracil található. A nukleinsavak elsődleges szerkezetét a nukleotidok sorrendje (szekvencia) határozza meg. A nukleinsavak szerkezetében található bázisok funkció csoportjai alkalmasak hidrogén hidak kialakítására és ez képezi a két nukleinsav szál közötti affinitási kölcsönhatás alapját. Hidrogén hidak két nukleinsav lánc között azonban, csak a donor, illetve akceptor csoportok megfelelő térbeli elhelyezkedése esetében alakulnak ki, amely a két lánc szekvenciájától függ. A kettős DNS-szál termodinamikailag legstabilabb helikális szerkezetében a guanin a citozinnal, és az adenin a timinnel kapcsolódik hidrogén-hidak által. Amennyiben a két szál elsődleges szerkezete egymással komplementer, azaz a guanin és citozin, illetve adenin és timin bázisok egymással szemben helyezkednek el a két láncban, kialakul a DNS-DNS duplex (kettős csavar). A nukleinsavak esetében tehát a szelektív molekuláris felismerést a két komplementer szekvenciájú lánc hibridizációja biztosítja.

Aptamerek Az aptamer név a latin *aptus* szóból képződött, amelynek jelentése illeszkedés. Az aptamer olyan DNS vagy RNS oligonukleotid molekula, amely képes olyan másodlagos térbeli szerkezetet felvenni, amely nem kovalens jelegű kölcsönhatásokon keresztül egy adott célvegyület szelektív megkötésére alkalmas. A célvegyületek lehetnek makromolekulák (pl. fehérjék), de kis molekulatömegű vegyületek is (pl. metabolitok, toxinok). Az a tény, hogy DNS vagy RNS a komplementer szekvenciájú nukleinsavakon kívül egyéb molekulákhoz is kötődhetnek ismert volt. Ugyanakkor itt nem lehet előre megállapítani, hogy egy adott molekulának a felismeréséhez milyen elsődleges szerkezettel rendelkező nukleinsav szükséges. Erre az alapvető kérdésre adott választ az 1990-ben bevezetett *SELEX* módszer (*Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) azaz ligandumok exponenciális kinyerése *in-vitro* evolúcióval.^{2,3} A következőkben ennek az aptamer előállítási folyamatnak a leegyszerűsített elvét ismertetjük. A módszer során a célvegyületet egy szilárd hordozóra immobilizálják, majd nagyszámú (tipikusan 10^{15}) random szekvenciájú, 30-70 nukleotid hosszú oligonukleotidok kötődését tesztelik. A célvegyülethez gyengébben kötődött

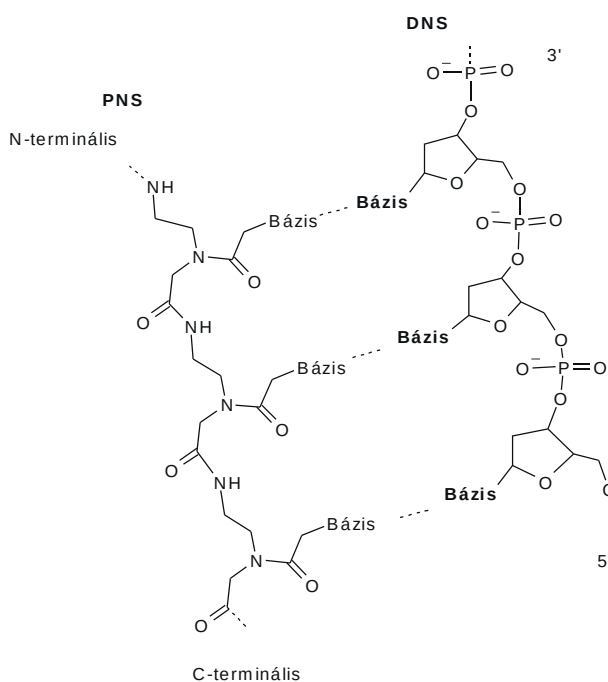
oligonukleotidokat megfelelő szelekciós mosási lépéssel választják el a rögzített célvegyülettől. Ezt követően a többi, erősebben kötődött oligonukleotidot kinyerik és polimeráz láncreakcióval sokszorozítják. Ezeket újból reagáltatják a célvegyülettel és az előbb leírt folyamatot 3-5 cikluson keresztül megismétlik a végleges szekvenciák kinyerése előtt. A végleges szekvenciák lesznek a célvegyülethez szelektíven és erősen kötődő, úgynevezett aptamerek. Összehasonlítva az antitestekkel az aptamerek alkalmazása a következő előnyökkel jár: *in-vitro* előállítás (nem igényelnek aktív immunizációt); nagy tisztaságú preparátum kinyerés; stabilabbak a fehérjékénél; irányított kémiai szintézissel a molekula kémiai stabilitása és affinitása tovább javítható; kisebb molekulatömegükből kifolyólag szilárd hordozókon nagyobb receptor sűrűséget lehet biztosítani; elvileg bármilyen molekulára szintetizálható aptamer. Hátrányuk a kiindulási oligonukleotid könyvtár szintézisének igénye.

Peptid-nukleinsavak A peptid-nukleinsavak (PNS, PNA-peptide nucleic acid) szintetikus molekulák, amelyek abban különböznek a DNS molekulától, hogy a dezoxiribóz foszfátészter lánc helyett a bázisok N-(2-aminoetil)glicin vázon vannak.⁴ Ez a váz a DNS láncokhoz hasonló helyezkedést biztosít a bázisoknak és ezáltal a PNS, a DNS molekulákhoz hasonló hibridizációs tulajdonságokkal bír.⁵ Ami viszont lényeges, hogy a PNS szálak semleges töltésűek, míg a DNS molekulák a foszfát csoportok miatt negatív töltéssel rendelkeznek és ennek fontos következményei vannak. Így míg a DNS-DNS duplexben a szálak közötti elektrosztatikus kölcsönhatások a duplex kialakulását gátolják, amelynek kiküszöbölésére nagy ionerősségű közeg szükséges, addig a PNS-DNS duplex esetében ilyen jellegű kölcsönhatás nincs és a duplex kialakulását az ionerősség gyakorlatilag nem befolyásolja. A PNS molekulák alkalmazása DNS analízisre⁶ nemcsak nagyobb érzékenységre és specifitásra nyújtanak lehetőséget, hanem a PNS szálak kiváló hőmérséklet, pH és biológiai stabilitással is rendelkeznek (ellenállnak nukleázok és proteázok hatásának). Alkalmazásuk többek közt a pontmutációk vizsgálatában lehet nagyon előnyös.

Receptorok A biológiai receptorok biomolekulák specifikus megkötésére alkalmas peptidek, fehérjék. A receptor-ligandum közötti kölcsönhatás olyan konformációs átalakulásokat eredményez a receptor szerkezetében, amely bizonyos sejtválaszt indukál, mint például egy ionszarnak megnyitását vagy egy bizonyos enzim aktiválását, illetve az intracelluláris receptorok esetén génaktivációs-profil változását. Jelenleg a receptorok (ionszarnak, G-protein kapcsolt receptorok, stb.) analitikai célokra való alkalmazása toxinok, agonisták illetve antagonisták meghatározására jelenleg rendkívül korlátozott.⁷ Ennek okai között említhető a viszonylag kis stabilitásuk, estenként a megfelelően érzékeny jelátalakítás hiánya és magas előállítási költségük. Ugyanakkor a gyógyszerfejlesztésben való fontosságuk miatt a jövőben nagyobb mértékű alkalmazásuk várható.

3. Affinitáson alapuló biomolekuláris felismerés detektálása. Rövid történeti áttekintés

A bioaffinitáson alapuló analitikai módszerek fejlődését több tudományágban elért eredmények együttesen határozták meg. Ezek között említhető a biokémia, biotechnológia,



1 Ábra. PNS-DNS szálak szerkezete és hibridizációjának sematikus ábrája

immunológia, molekuláris biológia és analitikai kémia. A bioaffinitási felismerés nyilvánvalóan csak akkor detektálható ha ez a reakcióközegben megfelelő fizikai-kémiai változásokat okoz. Kezdetben a módszerek többsége a kötődés során kialakult komplex valamilyen belső tulajdonságának vizuális vagy rendkívül egyszerű műszerezettségű (pl. turbidimetriás) detektálásán alapult. Jellemző példa az 1897-ben⁸ Kraus által leírt specifikus agglutináción alapuló tífuszteszt. Az agglutináción alapuló immunanalitikai tesztek közül érdemes még kiemelni a Coombs-tesztet, amely a szervezet vörösvérsejtjei elleni autoimmunválasz diagnosztikájára szolgál és a hemolízis eredetére ad információt⁹. A direkt Coombs-teszt esetében a páciens vörösvérsejtjeihez poliklonális anti-humán globulin szérumot adnak és pozitív válasz esetén agglutináció lép fel. Az 1940-es években kifejlesztett immundiffúzió¹⁰ és az immunsapadékképzésen (immunprecipitáció) alapuló módszerek, majd az 1953-ban bevezetett immunoelektroforézis¹¹ is még csak elsősorban minőségi illetve félmennyiségi eredményeket szolgáltattak. Az analitikai teljesítményparaméterek szempontjából forradalmi előrelépést a különböző jelöléses módszerek bevezetése jelentett. Ilyen az 1960-as évek elején, a Berson és Yalow által bevezetett radioimmunoassay, amelyet a plazma inzulin tartalmának meghatározására dolgoztak ki.¹² A módszer későbbi népszerűségét és elterjedését részben annak is köszönheti, hogy az első radioimmunoassay módszerek hormonok meghatározását szolgálták¹²⁻¹⁴. A hormonokat, melyek a belső elválasztású mirigyek termékei, rendszerint nagyon kis mennyiségben kell meghatározni, ráadásul hatásuk és szerkezetük között rendkívül szoros összefüggés van, ezért a legesekélyebb szerkezeti változás is változtathat az élettani hatáson. Az immunoassay bevezetése előtt a hormonok meghatározása rendkívül nehézkes volt, a fehérje természetű hormonok meghatározására, mint például az inzulin, gyakorlatilag nem létezett megfelelő analitikai módszer. Nagy jelentőségű az 1960-as évek közepén Wide¹⁵ illetve Miles

és Hales¹⁶ által kidolgozott eljárás az antitestek radioaktív izotópokkal való jelölésére, amely az immunradiometrikus assay (immunoradiometric assay, IRMA) módszer kialakulásához vezetett. A radioimmunoassay módszerek viszonylag könnyű automatizálhatóságuknak és széleskörű alkalmazhatóságuknak köszönhetően lehetőséget teremtettek nagyszámú, rutin analízis elvégzésére. Az 1970-es évek elején a kereskedelmi forgalomban már több száz radioimmunoassay állt a felhasználók rendelkezésére, elsősorban klinikai analízisre, de környezeti, élelmiszer-analitikai célokra is. A radioimmunoassay bevezetése után gyorsan megjelentek a nem-izotópos jelölésen alapuló immunoassay módszerek. Így már 1961-ben Dandliker és Feigen¹⁷ a Coons által bevezetett fluoreszcens jelölést használva, fluoreszcencia polarizáción alapuló immunoassay módszert dolgozott ki, míg 1969-ben Avrameas¹⁸ az immunreagensek enzimekkel való jelölését írta le. Az utóbbi munka az 1970-es évek elején bevezetett enzim immunoassay technikák alapját képezte^{19,20}. A későbbiekben az enzim és fluoreszcens jelölést alkalmazó immunoassay módszerek gyors fejlődésének korszaka következett. A DNS analízisben forradalmi előrelépést a *polimeráz láncreakció* (PCR-polymerase chain reaction) bevezetése jelentette az 1980-as években²¹⁻²⁴.

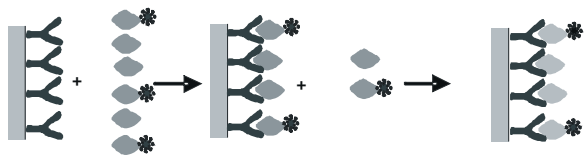
4. Affinitáson alapuló biomolekuláris felismerés detektálása. Általános irányelvek

Az affinitáson alapuló biomolekuláris felismerés esetében, egy bioreceptor-ligandum komplex alakul ki. A komplex kialakulása általában csak nagyon kismértékben változtatja meg a közeg fizikai-kémiai tulajdonságát és ezért, ahogy azt a rövid történeti áttekintésben említettem az első kvantitatív nagyérzékenységű analitikai módszerek esetében jelölő anyagokat kellett alkalmazni. Ugyanakkor ma már olyan érzékeny módszerek is rendelkezésre állnak, amelyekkel akár jelölés nélkül is nyomunkkövethető a receptor-ligandum komplex kialakulása. Ennek megfelelően a detektálás szempontjából a bioaffinitáson alapuló analitikai módszerek két csoportra oszthatóak: jelöléses, illetve jelölés nélküli módszerek. A jelölést alkalmazó módszerek esetében az affinitási kölcsönhatás egyik reakciópartnerére olyan komponenssel van megjelölve, amely műszeres analitikai módszerrel nagy érzékenységgel detektálható. A jelölő anyag lehet: fluoreszcens molekula, enzim, radioaktív izotóp, kemilumineszcenciás reagens, fém karbonilok, szilárd részecskék, stb. A jelölést alkalmazó módszereket is két csoportba oszthatjuk. Amennyiben a detektálási technika különbséget tud tenni a kötött és nem kötött reagens által szolgáltatott analitikai jel között, akkor ezek elválasztása nem szükséges és homogén módszerekről beszélünk. Ezeknél sokkal elterjedtebbek az ún. heterogén módszerek, ahol az affinitási reakció végeztével, de még a detektálás előtt a szabad és kötött reagens-frakciókat elválasztják. Az elválasztást jelentősen megkönnyíti, hogy a felismerő molekulákat általában egy szilárd hordozó felületére immobilizálják. A heterogén módszerek esetében két alapvető eljárást különböztethetünk meg. A vetélkedésen alapuló (kompetitív) módszerek esetén (2. ábra), az antitest mennyisége korlátozott és versengés alakul ki a kötőhelyekért a meghatározandó antigén és konstans mennyiségű jelzett antigén között. Az immunkomplex kialakulása után a kötött és szabad antigéneket elválasztják.

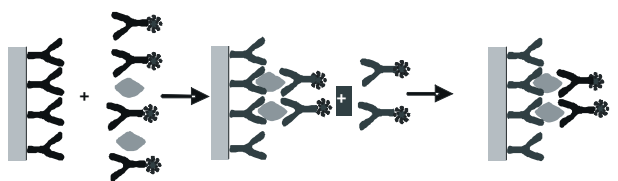
Általában az antitesthez kötődött jelzett antigénmennyiséget határozzák meg és ekkor az analitikai jel ellentétes módon változik a minta antigéntartalmával. A nem vetélkedő módszerek legismertebb változata a szendvics eljárás (lásd 2. ábra), amely nukleinsavak és legalább két kötőhellyel rendelkező antigének meghatározására alkalmazható. Ebben az esetben a felismerő antitestet a meghatározandó antigénhez viszonyítva feleslegben immobilizálják egy szilárd hordozóra. A mintában levő antigén és az immobilizált antitest közötti immunkomplex kialakulása után egy második jelzett antitestet adnak a reakció közeghez. A felismerő és jelzett antitestek "szendvicsszerűen" zárják közre az antigént. A jelzett antitest feleslegének eltávolítása után meghatározzák a szendvicskomplex mennyiségét, amely a minta antigénkoncentrációjával egyenesen arányos.

Vetélkedésen alapuló módszer

Összekeverés és inkubáció Elválasztás Mennyiségi meghatározás



Nem vetélkedésen alapuló módszer, Szendvics eljárás



● Meghatározandó antigén Szilárd hordozóhoz kötött antitest
● Jelzett antigén Jelzett antitest

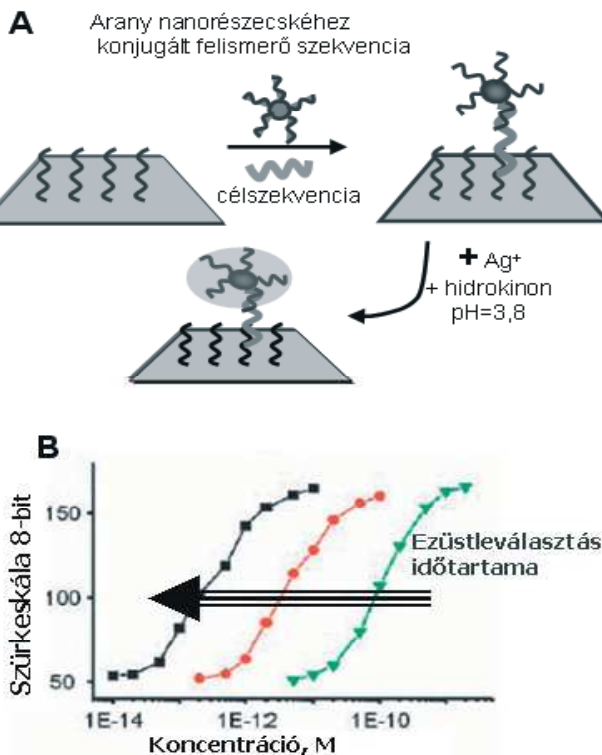
2. Ábra. A vetélkedésen és a nem vetélkedésen alapuló (esetünkben szendvics) immuneljárások schematikus ábrája

5. Új irányzatok a biomolekuláris kölcsönhatások jelölésen alapuló detektálásában

Nyilvánvalóan a jelölésen alapuló detektálások egyik meghatározó kutatási irányvonala az új típusú jelölő anyagok és eljárások fejlesztése. Az utóbbi időszakra elsősorban a nanoszerkezetű jelölő anyagok bevezetése és alkalmazása a meghatározó.

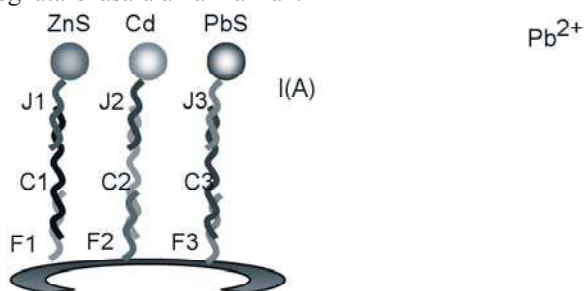
Arany nanorészecskék Az arany nanorészecskék bioanalitikai célú alkalmazása nem új keletű. Öt és ötven nanométer átmérőjű arany nanorészecskéket nagy elektronsűrűségük miatt már az 1970-es években széleskörben alkalmaztak pásztázó elektronmikroszkópiás méréseknél jelölő anyagként és ezáltal lehetőséget nyújtottak nagy térfelbontású immunocitokémiai vizsgálatok elvégzésére.²⁵ Ennek megfelelően az immunanalitikai területén az arany nanorészecskék alkalmazása ma már rutinszerűnek tekinthető.²⁶ Ugyanakkor a DNS analízisben való bevezetésük és a megfelelő oligonukleotid-arany nanorészecske konjugátumok előállítására csak az 1990-es évek második felében történt meg.^{27,28} Jellemző példa az arany nanorészecskéken alapuló nagyérzékenységű eljárásokra a Mirkin csoportja által kidolgozott szendvics módszer az anthrax-specifikus szekvencia meghatározására (3. ábra). Ennek során a szilárd hordozóra immobilizált

oligonukleotid felismerő szál, a célszekvencia és az arany nanorészecskehez konjugált második felismerő szekvencia szendvics komplexet alkot. A célszekvencia 100 pM feletti koncentrációja esetében, a nagy optikai sűrűségű arany jelölésnek köszönhetően, a szendvics komplex kialakulása akár vizuálisan is detektálható. A kimutatási határ további csökkentése érdekében a szerzők kihasználták az arany nanorészecskék azon tulajdonságát, hogy megfelelő redukálószer jelenlétében az ezüst ionok leválását katalizálják. Az ún. ezüst-amplifikációs technika öt nagyságrenddel csökkentette a kimutatási határt, ráadásul a dinamikus koncentrációtartomány az ezüstleválasztás idejével szabályozhatóan bizonyult.²⁹ Érdekes módon a fluorofór jelzéssel összehasonlítva az arany nanorészecskékkel konjugált oligonukleotidok alkalmazása nagymértékben megnövelte az analízis szelektivitását, amely alkalmasnak bizonyult a tökéletesen komplementer és pontmutációs szálak megkülönböztetésére (SNP analízis). A módszer érzékenysége továbbnövelhető az ún. oligonukleotid bio-vonalkódok alkalmazásával. Ebben az esetben az arany nanorészecskék felületén a felismerő szál mellett nagy feleslegben immobilizálnak egy másik DNS szálakat, amely a vele komplementer szekvenciájú bio-vonalkód oligonukleotiddal duplexet képez. Az eljárás hasonló módon zajlik le, viszont a szendvics komplex kialakulása után az említett duplexet dehidridizálják és az oldatba kerülő bio-vonalkód oligonukleotidokat határozzák meg az ezüst-amplifikációs módszerrel. Tekintettel arra, hogy minden egyes célvegyület bekötődése esetén száz-ezerszeres számú bio-vonalkód szabadul fel a módszer kimutatási határa eléri az 500 zM koncentrációt.³⁰ Megfelelő módosítással és immunreagens alkalmazásával ez a rendkívül érzékeny eljárás proteinek, pl. prosztata specifikus antigén, meghatározására is alkalmazható.³¹



3. Ábra. Ezüst-amplifikációs módszer anthrax-specifikus DNS szekvencia meghatározására. (A) működési elv (B) kalibrációs görbék különböző ezüstleválasztási idők esetében

Kvantum pontok A kvantum pontok (quantum dots) olyan félvezető *nanokristályok* amelyeknek mindhárom karakterisztikus dimenziója az 1-10 nanométeres tartományba esik. Kvantum pontok előállítására alkalmas szerves félvezető anyagok között említhetők a GaN, GaP, GaAs, InP, InAs, ZnO, ZnS, ZnSe, CdS, CdSe és CdTe.³² Ezek a nanokristályok fluoreszcenciás tulajdonsággal rendelkeznek. Rendkívül fontos, hogy a fluoreszcenciás emisszió hullámhosszát a félvezető nanokristály átmérője határozza meg. A kvantum pontok megfelelő biológiai eredetű felismerő molekulákhoz köthetők és ezáltal jelölő anyagként alkalmazhatók bioaffinitási reakciókban. Annak ellenére, hogy a kvantum pontok fluoreszcenciás kvantum hatásfoka nem feltétlenül nagyobb a szerves fluoreszcenciás vegyületekéénél, a fotostabilitásuk jelentősen jobb és ez megkönnyíti gyakorlati alkalmazásukat. Összehasonlításképpen míg egy 0,5 mW teljesítményű Ag^+ lézer gerjesztés esetében a rodamin 6G molekula fluoreszcenciája kb. 10 perc alatt a felére csökkent, addig a CdSe kvantum pont emissziója 4 óra alatt semmit nem változott.³³ A nanokristályok további előnyös tulajdonsága, hogy a méretük változtatásával egyszerűen szabályozható az emissziós hullámhossz. Ezt a tulajdonságot kombinálva a monodiszperz kvantum pontok keskeny emissziós spektrumával (mindössze 30 nm körüli felérték-szélesség) lehetőség nyílik több célvegyület egyidejű meghatározására különböző színű jelzőmolekulák alkalmazásával. Mindezek mellett a kvantum pontok nemcsak optikai hanem elektrokémiai detektálásra is lehetőséget nyújtanak (4. ábra). Ebben az esetben szendvics eljárást alkalmaznak ahol a második felismerő DNS szál kvantum ponttal jelölt. A szendvics komplex kialakulása után a nanokristályokat kis térfogatban feloldják majd a fémionokat inverz voltammetriával meghatározzák. Ezek a módszerek rendkívül nagy érzékenységgel rendelkeznek hiszen minden egyes szendvics komplex kialakulásához mérettől függően pár száztól pár ezer fématomot tartalmazó kvantum pont tartozik.³⁴ Emellett különböző anyagból készült kvantum pontok alkalmazásával több célvegyület egyidejű meghatározása is lehetséges. Ilyen meghatározás elvét mutatja be a 4. ábra ahol három felismerő oligonukleotid szál (F1-F3) három különböző célvegyület (C1-C3) meghatározására alkalmaznak.³⁵

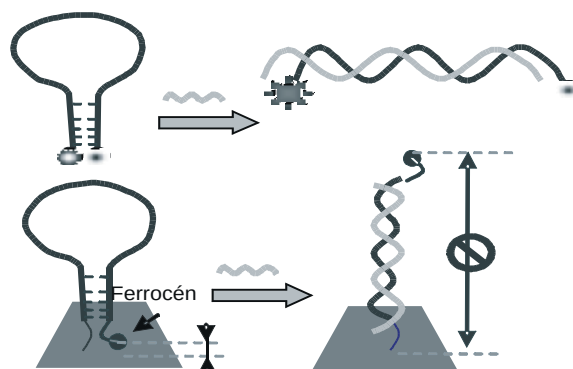


4. Ábra. Több DNS szekvencia egymásmelletti meghatározására alkalmas elektrokémiai detektáláson alapuló szendvics eljárás működési elve. A diagram a szendvics komplex kialakulása után, kis térfogatban feloldott félvezető nanokristályok fémionjainak inverz voltammetriás válaszgörbéjét mutatja be.³⁵

Donor-akceptor közötti távolság modulálásán alapuló detektálási módszerek

Mint ismeretes az elektron és energia átadás hatékonysága

egy donor és egy akceptor csoport vagy molekula között távolságfüggő. A Förster típusú *rezonancia energiatranszfer* hatékonysága a távolság hatodik hatványával csökken, míg az elektronátlépés sebessége állandója exponenciálisan csökken a távolság függvényében. Ennek megfelelően donor-akceptor közötti távolság modulálása rendkívül érzékeny bioérzékelési eljárások alapját képezik.³⁶ Példaként említhetők a proteáz és egyéb enzimek meghatározására alkalmas módszerek. A módszer leegyszerűsített elve, hogy kezdetben a fluoreszcenciát kioltó molekula egy megfelelő peptid láncon keresztül fluoreszcenciás hordozó felületére van rögzítve és ezért a hordozó fluoreszcenciás intenzitása kicsi. A proteáz enzim a peptid láncot felszakítva a kioltó molekula eltávolítását eredményezi és ennek következtében enzimaktivitás függő fluoreszcencia intenzitásnövekedést okoz.³⁷ A rezonancia energiatranszfer jelenségen alapul az ún. *molekuláris villogók* (molecular beacon) működése is.³⁸⁻⁴⁰ A molekuláris villogó egy olyan önmagához hibridizáló oligonukleotid, amelynek egyik vége általában egy fluoreszcens (5'-vég), a másik pedig egy fluoreszcenciát kioltó (3'-vég) molekulával módosított. Az önhibridizáció miatt a kialakult hurok konformáció a két molekula közelségét és ezáltal a fluoreszcencia kioltását eredményezi. A komplementer célvegyület hibridizációja során kialakult duplex a hurok konformációt felnyitja. Ezáltal a jelölt oligonukleotid két vége eltávolodik egymástól és a fluoreszcencia intenzitása megnő. A molekuláris villogók elektronikus analógjai esetében az oligonukleotid lánc egyik vége az elektród felületén rögzített míg a másik vége elektroaktív molekulával (pl. ferrocén) jelzett.⁴¹ A hurok konformáció esetében a legkisebb az elektroaktív molekula és az elektródfelület közötti távolság és legnagyobb az elektronátlépés sebessége. Hibridizáció esetén az elektroaktív komponens eltávolodik az elektródfelülettől ami az elektrokémiai jel (áramerősség) csökkenését eredményezi.



5. Ábra. Molekuláris villogók és elektronikus analógjaik működési elve

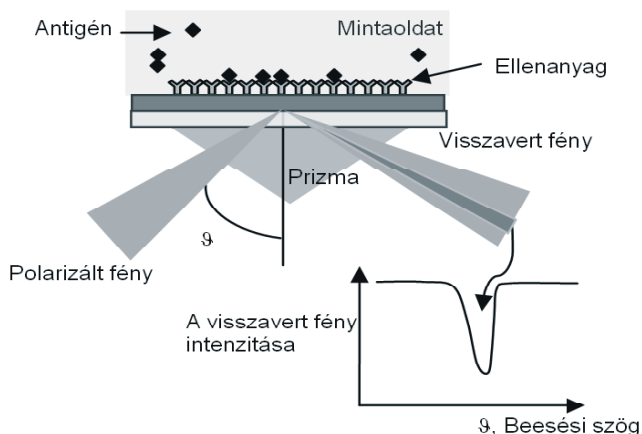
Rezonancia energiatranszferen alapuló módszerek protein analízisre is alkalmazhatók. Ebben az esetben a megfelelő aptamer lánc két végét jelölik meg az energia donor és akceptor molekulákkal. Az aptamerek oldatbeli konformációja átrendeződik a fehérjéhez való specifikus kötődés során. Ez az akceptor-donor közötti távolság és ezáltal a fluoreszcencia intenzitás megváltozását eredményezi.⁴² Fontos megjegyezni, hogy a molekuláris villogókon alapuló eljárások homogén bioanalitikai módszernek tekinthetők, azaz itt nem szükséges a kötött és nem kötött reagens frakciók egymástól való elválasztása.

6. Irányzatok a biomolekuláris kölcsönhatások jelölés nélküli detektálásában

A nagyérzékenységgel detektálható jelölő anyagok bioanalitikai célú alkalmazásának előnyei nem szorulnak külön magyarázatra. Mindazonáltal több lépéses eljárásokat és költséges jelölő anyagok alkalmazását igénylik. Emellett az esetek többségében nincs lehetőség a biomolekuláris kölcsönhatás valós időben történő nyomonkövetésére, amely lehetővé tenné a kötődési reakció kinetikájának meghatározását. Ezért a bioanalitikai rendszerek fejlesztési irányzatain belül a jelölés nélküli, de nagyérzékenységet biztosító módszerek kialakítása rendkívüli fontossággal bír.

Felületi plazmonrezonancia elvén alapuló bioérzékelés

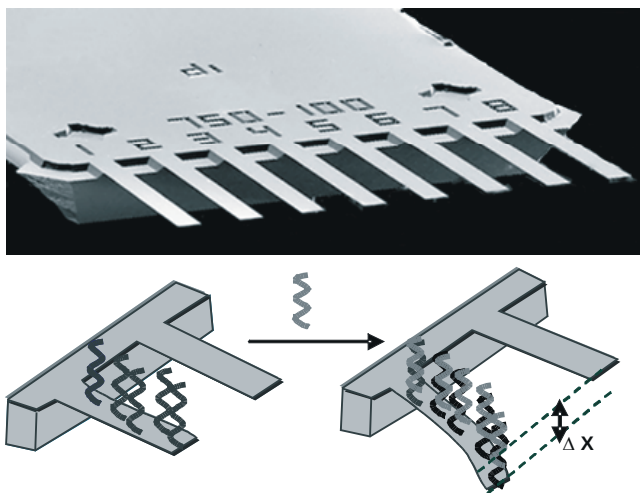
A bioanalitikában 1980-as évek elején Liedberg és munkatársai^{43,44} által bevezetett analitikai módszer, a felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance, SPR) sikere három tényezővel magyarázható: a) az SPR spektroszkópiával valós időben meghatározható a biomolekuláris kölcsönhatások kinetikája, b) a biomolekulák kötődése jelölés nélkül nyomonkövethető c) az SPR technika a felületi tulajdonságokra mutatott nagy érzékenysége lehetővé teszi akár relatív gyenge felületi kölcsönhatások vizsgálatát is. A felületi plazmonok egy fém (az esetek többségében arany)-dielektrikum határfelületen a vezetési elektronok mozgásához kapcsolódó elektronsűrűség-hullámok. A plazmonok fénnyel való gerjesztéséhez a fény impulzusának felülettel párhuzamos komponense meg kell egyezzen az azonos energiájú felületi plazmon impulzusával.⁴⁵ Ebben az esetben a fény energiája átadódik az elektronsűrűség hullámnak és egy rezonancia jellegű csatolás történik. A felületi plazmonok kialakításához leggyakrabban használt konfiguráció esetében a fényt egy prizma (Kretschmann elrendezés) segítségével csatolják be a tipikusan 50 nm vastag fémrétegbe. A plazmon-gerjesztés a fény egy adott beesési szögénél történik meg és ilyenkor a fém felületről visszavert fény intenzitásában egy minimum észlelhető (6. ábra). A rezonanciának megfelelő beesési szög értéke érzékenyen függ a megvilágított fémréteg másik oldalával érintkező közeg törésmutatójától. A generált evanescens hullámok intenzitása a fém/dielektrikum határfelületen maximális. Az intenzitás a határfelülettől távolodva exponenciálisan csökken és pár száz nanométeres behatolási mélységben biztosítja a felületi detektálást. A biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálatakor az affinitási reakció egyik komponense a fém felületén immobilizált, míg a másik komponens a fémmel érintkező mintaoldatban található. A bekötődés megváltoztatja a felülettel közvetlenül érintkező réteg (ahol az evanescens hullám intenzitása a legnagyobb) törésmutatóját amit a készülék a rezonancia szög eltolódásán keresztül érzékenyen detektál. Az analitikai és kinetikai információt a rezonancia szög időbeli változásának nyomonkövetése szolgáltatja. A meghatározás érzékenységét elsődlegesen a biomolekuláris kölcsönhatás során kialakult komplex stabilitása és a vizsgált komponens molekulatömege határozza meg. Az SPR alkalmazása rendkívül széles körű.^{46,47} Kiterjedten használható ellenanyag-antigén, DNS hibridizáció, protein-protein, receptor - biomolekula, stb. közötti kölcsönhatások vizsgálatára. Az SPR mérések a kinetikai állandók és molekuláris kölcsönhatások specificitásának meghatározásán túl alkalmasak nyomanalitikai meghatározásokra is.⁴⁸



6. Ábra. Az SPR rendszer detektálási elvének sematikus diagramja.

Mikrokonzol (mikromechanikai) szenzorok

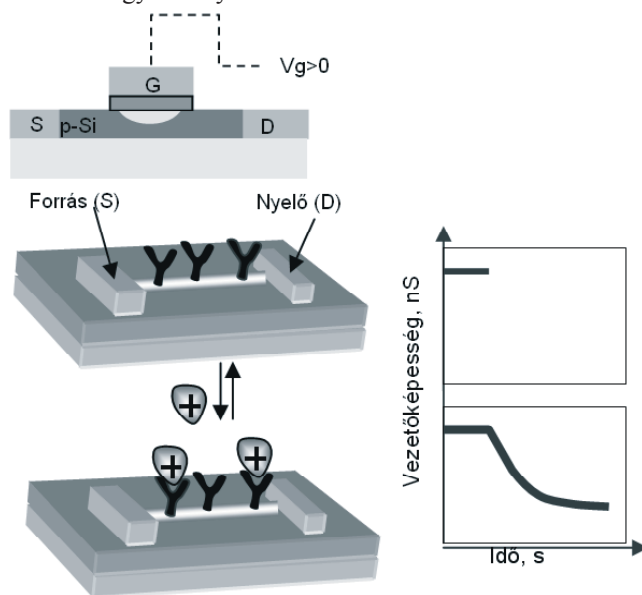
A mikrokonzol szenzorok az atomerő és más mérőszondás mikroszkópiákban alkalmazott mikrokonzolok megfelelő kémiai érzékenyítéssel kialakított változatain alapulnak. A mikrokonzolok szenzorokba való átültetése az 1990-es évek elejére tehető. Ekkor alkalmazták önálló detektorokként femtojoule felbontású fototermikus spektroszkópiás mérésekhez⁴⁹, illetve hőmérséklet, nedvességtartalom és higanykoncentráció meghatározására.⁵⁰ A mikrokonzolok tipikusan 0,2-1 μm vastag, 20-100 μm széles és 100-500 μm hosszú rugalmas lapkák, amelynek egyik vége egy szilárd tartóhoz van rögzítve. Általában a mikrokonzol elhajlását a lapka végére irányított lézersugár visszaverődésén keresztül optikai detektorral követik nyomon. A mért paraméter, elhajlás vagy rezonancia frekvencia, szerint megkülönböztetünk statikus és dinamikus mikrokonzol szenzorokat. Dinamikus üzemmódban a mikrokonzolok mikromechanikai oszcillátorokként működnek és a mikrokonzol tömegváltozása a rezonanciafrekvencia változásán keresztül határozható meg. A kvarckristály mikromérlegen^{51,52} alapuló bioszenzorokkal analóg módon ha a felület megfelelő bioaffinitású reagenssel módosított akkor a ligandum bekötődése megváltoztatja a mikrokonzol tömegét és ez a tömegváltozás valós időben nyomonkövethető a rezonanciafrekvencia változásán keresztül. A statikus mikrokonzol szenzorok a receptor-ligandum kölcsönhatás energiáját mechanikai energiává alakítják át. Ennek megfelelően többretegű mikrokonzolok esetében a molekulák adszorpciója/kötődése differenciált felületi feszültség változást okoz ami a mikrokonzol elhajlását eredményezi. A mikrokonzol szenzorok rendkívül érzékenyek a hőmérsékletre (a rétegek különböző lineáris hőtágulási együtthatója miatt) és a konvektív hatásokra. Ezért a mikrokonzol szenzorokat szinte kizárólag csak differenciális felépítésben alkalmazzák. Ebben az esetben mikrokonzol sorokat használnak amelyek egy része szelektív felismerő molekulákkal módosított, a másik részét pedig a nem specifikus adszorpciónak ellenálló réteggel vonják be. Mint ahogy a 7. ábrán látható rendszer is mutatja, az analitikai jelet a DNS-el módosított és a referencia mikrokonzol elhajlásának különbsége adja. A komplementer DNS bekötődése mind az elektrosztatikus mind pedig a sztérikus taszítást növeli a felismerő rétegben ezért a megfelelő mikrokonzol elhajlását okozza.⁵³ Aptamerekkel⁵⁴, illetve antitestekkel⁵⁵ módosított mikrokonzol szenzorokat sikeresen alkalmaztak különböző fehérjék meghatározására is.



7. Ábra. Többkonzolos mikromechanikai szenzor ábrája és alkalmazása DNS hibridizáció detektálására

Nanohuzalokon alapuló térvezérlésű tranzisztorok alkalmazása bioérzékelésre

A félvezető nanohuzalok kontrollált előállításában elért eredmények⁵⁶ lehetővé tették ezek térvezérlésű tranzisztorokon alapuló kémiai szenzorokba (CHEMFET) való integrálását. Mint ismeretes a térvezérlésű tranzisztorok esetében a forrás- és nyelő-elektrodok között található félvezető csatorna vezetőképességét (a töltéshordozók koncentrációját) egy vékony szigetelő rétegen keresztül kapacitíven csatolt vezérlőelektróddal modulálják. A CHEMFET szenzorok esetében a csatorna vezetőképességének változását a kémiaileg érzékenyített vezérlőelektroda és mintaoldat határfelületén lejátszódó kémiai folyamat befolyásolja. Ugyanezt az elvet követik a nanohuzal típusú térvezérlésű kémiai szenzorok itt azonban a félvezető csatorna kialakítására általában bórral adalékolt szilícium egykristály nanohuzalt alkalmaznak.⁵⁷



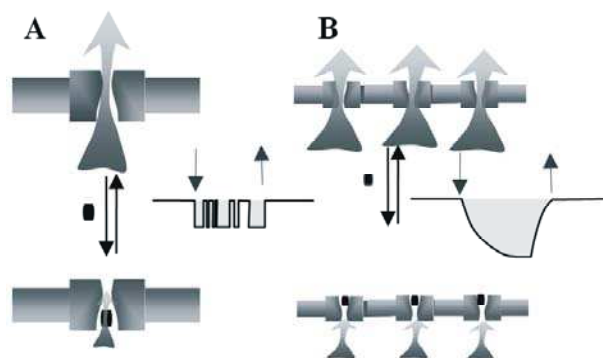
8. Ábra. A nanohuzal térvezérlésű tranzisztorokon alapuló bioérzékelés működési elve.

Az erre a célra alkalmazott nanohuzalok tipikusan 10-20 nm átmérőjűek és 2-6 mikrométer hosszúak. Itt a töltéshordozók

koncentrációja a planáris felépítésű térvezérlésű tranzisztoroktól eltérően a nanohuzal "teljes tömegében változik" amely az érzékenység jelentős növekedését, akár egy molekula kimutatásának elvi lehetőségét is magában hordozza. A szelektív felismerést a nanohuzal felületére immobilizált biomolekulákkal biztosítják. Tekintettel arra, hogy a csatornán átfolyó áram megváltozásához a nanohuzal felületi töltéssűrűség változása szükséges, ezért a bekötődő ligandumnak mindenképpen elektromos töltéssel kell rendelkeznie. Az első bioanalitikai jellegű alkalmazás során Lieber és munkatársai a nanohuzal felületét biotinnal módosították és sztreptavidin illetve monoklonális anti-biotin antitest szelektív detektálásának lehetőségét vizsgálták.⁵⁷ Az általuk alkalmazott pH-n a sztreptavidin negatív, míg az anti-biotin pozitív töltéssel rendelkezett és ennek megfelelően bekötődésük a p-típusú félvezető nanohuzal vezetőképességének növelését illetve csökkentését okozták. Jelenleg megfelelő biomolekulákkal módosított nanohuzalokat fehérjék mellett már DNS szálak⁵⁸ sőt vírusok⁵⁹ meghatározására is sikeresen alkalmazták. A kimutatási határ proteinek esetében legfeljebb 10 pM, a DNS szálak esetében 10 fM, míg az influenza A vírus esetében 80 aM (50 vírus/ μ l) volt.⁶⁰

Ioncsatorna típusú bioszenzorok

Az ioncsatorna típusú bioérzékelés rendkívül érzékeny analitikai módszer, amely akár egy molekula detektálására is lehetőséget nyújt. Az ioncsatorna típusú érzékelők esetében megfelelő receptorok/nanopórusok vannak egy elektromosan szigetelő membránban integrálva. A receptorok/pórusok szelektív kölcsönhatása a meghatározandó komponenssel megváltoztatja a membrán áteresztőképességét a detektált marker ionok számára és ez a fluxus változás szolgáltatja az analitikai jelet. A módszer érzékenysége azzal magyarázható, hogy a meghatározandó komponens már rendkívül kis mennyiségének bekötődése is jelentős modulációt okozhat a nagy koncentrációban alkalmazott marker ionok fluxusában. Az ioncsatorna típusú szenzorok esetében megkülönböztetünk egycsatornájú és többcsatornájú szenzorokat.



9. Ábra. Egy – és többcsatornás ioncsatorna típusú szenzorok működési elvének és az ionáram-idő válaszgörbéinek sematikus vázlata. A meghatározandó komponenssel való kölcsönhatás során az effektív pórusátmérő lecsökken, ami együtt jár a membránon keresztül mért áramerősség csökkenésével.⁶¹

Az egycsatornás szenzorok esetében az egyedi pórus és a meghatározandó komponensek kölcsönhatása bonyolult, újlényomatszerű áramtranzienst eredményez. A csatorna

blokkolása egy olyan sztochasztikus esemény, amelynek előfordulási frekvenciája a meghatározandó molekulák koncentrációjától függ. Ugyanakkor a jel amplitúdója, illetve a csatorna nyitott és zárt állapotainak időtartama a vizsgálandó komponens anyagi minőségétől függ. A többcsatornás szenzorok esetében ezek az egyedi kölcsönhatások időben nem bonthatók fel és csak az öszionáram változása detektálható. A gyakorlati megvalósítás során leggyakrabban α -haemolysin proteint alkalmaznak, amely a lipid kettősréteg membránban önrendeződéssel egy 100 Å hosszú és legszűkebb részén kb. 15 Å átmérőjű pórust képez. A membránt két elektrolitot tartalmazó félcella között alakítják ki, majd általában 100 mV körüli feszültség alkalmazása mellett mérik a membránon keresztül átfolyó áram erősségét (pA).

Egyszálú DNS illetve RNS molekulák elongált konformációban át tudnak hatolni az α -haemolysin póruson és ennek megfelelően kísérletet tettek ezek szekvenálására az egyedi láncok áthatolása során regisztrált áramtranziensek alapján.^{62,63} Ennek ellenére proteinek és nukleinsavak szelektív meghatározását valójában csak a géntechnológia segítségével módosított α -haemolysin pórusok tették lehetővé. Így egyszálú oligonukleotid kovalens rögzítése a pórus belsejében nemcsak a komplementer szál szelektív felismerésére adott lehetőséget,⁶⁴ hanem a duplexképződés kinetikájáról is információt szolgáltatott.⁶⁵ A protein meghatározás során, tekintettel arra, hogy a proteinek nem férnek be az α -haemolysin nanopórusba a receptort polimer távtartón keresztül kötik a pórus belső falára. Ebben az esetben a póruson kívüli szelektív ligandum-receptor kötődés a polimer távtartó konformációját változtatja meg és ezáltal modulálja a csatornán keresztüli ionáramot.⁶⁶ A biológiai nanopórusokon alapuló szenzorok alkalmazását elsősorban a lipid kettősréteg stabilitása és a megfelelő receptorokkal módosított pórusok elérhetősége korlátozza.^{67,68} Erre a problémára megoldást jelenthet a szintetikus pórusok és receptorok mint például a kémiaiilag módosított nanocsövek alkalmazása.⁶⁹

Összefoglalás

A biomolekuláris kölcsönhatások analitikai célú alkalmazása egy dinamikus fejlődő interdiszciplináris terület. Az utóbbi időszakban kifejlesztett rendkívül érzékeny detektálási eljárások az analitika, anyag- és élettudományok együttes alkalmazásának köszönhető. Különböző biológiai, kémiai vagy fizikai jellegű jelfelerősítési sémák külön vagy együttes alkalmazása megközelíti és egyes esetekben eléri az analitikai detektálás elvi kimutatási határát. A jelöléses módszerekre az új típusú nanoszerkezetű anyagok és szintetikus receptorok bevezetése és alkalmazása jellemző. Ugyanakkor az affinitási kölcsönhatások valós idejű nyomkövetésének igénye, új jelölésmentes jelátvivők és detektálási elvek kifejlesztéséhez vezetett.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom az OTKA (F037977, M041969) és az MTA Bolyai János Kutatói Ösztöndíj támogatásáért.

Hivatkozások

1. Ehrlich, P.; Morgenroth, J. *Dritte Mitteilung, Berl. Klin. Wochschr.* **1900**, 37, 453.
2. Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, 346, 818-822.
3. Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, 249, 505-510.
4. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science* **1991**, 254, 1497-1500.
5. Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. *Nature* **1993**, 365, 566-568.
6. Wang, J. *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, 13, 757-762.
7. Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A.; Turner, A. P. F. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 3942-3951.
8. Kraus, R. *Wien. Klin. Wochenschr.* **1897**, 10, 736.
9. Coombs, R. R. A.; Mourant, A. E.; Race, R. R. *Lancet* **1945**, 249, 15-16.
10. Oudin, J. *C.R. Acad. Sci.* **1946**, 222, 115.
11. Grabar, P.; Williams, C. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1953**, 10, 193.
12. Yalow, R. S.; Berson, S. A. *Journal of Clinical Investigation* **1960**, 39, 1157-1175.
13. Ekins, R. P. *Clinica Chimica Acta* **1960**, 5, 453-459.
14. Ekins, R.; Samols, E. *Lancet* **1963**, 2, 202-&.
15. Wide, L.; Bennich, H.; Johansson, S. G. *Lancet* **1967**, 2, 1105-&.
16. Miles, L. E. M.; Hales, C. N. *Nature* **1968**, 219, 186-&.
17. Dandliker, W.; Feigen, G. A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1961**, 5, 299-&.
18. Avrameas, S. *Immunochemistry* **1969**, 6, 43-&.
19. Rubenstein, K. E.; Schneider, R. S.; Ullman, E. F. *Biochem Biophys Res Commun* **1972**, 47, 846-51.
20. Vanweemen, B. K. *Journal of Virological Methods* **1985**, 10, 371-378.
21. Mullis, K. B.; Faloona, F. A. *Methods In Enzymology* **1987**, 155, 335-350.
22. Erlich, H. A.; Gelfand, D. H.; Saiki, R. K. *Nature* **1988**, 331, 461-462.
23. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. *Science* **1988**, 239, 487-491.
24. Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. *Science* **1985**, 230, 1350-1354.
25. Seydack, M. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, 20, 2454-2469.
26. Hayat, M. A. *Colloidal gold: principles, methods, and applications*; Academic Press: San Diego, **1989**.
27. Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature* **1996**, 382, 607-609.
28. Alivisatos, A. P.; Johnsson, K. P.; Peng, X. G.; Wilson, T. E.; Loweth, C. J.; Bruchez, M. P.; Schultz, P. G. *Nature* **1996**, 382, 609-611.
29. Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science* **2000**, 289, 1757-1760.
30. Nam, J. M.; Stoeva, S. I.; Mirkin, C. A. *Journal Of The American Chemical Society* **2004**, 126, 5932-5933.

31. Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. *Science* **2003**, *301*, 1884-1886.
32. Murphy, C. J. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 520A-526A.
33. Gerion, D.; Pinaud, F.; Williams, S. C.; Parak, W. J.; Zanchet, D.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Journal Of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 8861-8871.
34. Merkoci, A.; Aldavert, M.; Marin, S.; Alegret, S. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2005**, *24*, 341.
35. Wang, J.; Liu, G. D.; Merkoci, A. *Journal Of The American Chemical Society* **2003**, *125*, 3214-3215.
36. Fan, C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Trends in Biotechnology* **2005**, *23*, 186.
37. Kumaraswamy, S.; Bergstedt, T.; Shi, X.; Rininsland, F.; Kushon, S.; Xia, W.; Ley, K.; Achyuthan, K.; McBranch, D.; Whitten, D. *PNAS* **2004**, *101*, 7511-7515.
38. Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 303-308.
39. Tan, W. H.; Wang, K. M.; Drake, T. J. *Current Opinion In Chemical Biology* **2004**, *8*, 547-553.
40. Drake, T. J.; Tan, W. H. *Applied Spectroscopy* **2004**, *58*, 269A-280A.
41. Fan, C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *PNAS* **2003**, *100*, 9134-9137.
42. Li, J. W. J.; Fang, X. H.; Tan, W. H. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **2002**, *292*, 31-40.
43. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I. *Biosensors & Bioelectronics* **1995**, *10*, R1-R9.
44. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I. *Sensors And Actuators* **1983**, *4*, 299-304.
45. Kroó, N. *Magyar Tudomány* **2003**, *9*, 1096-1099.
46. Homola, J. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 528-539.
47. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. *Sensors And Actuators B-Chemical* **1999**, *54*, 3-15.
48. Mullett, W. M.; Lai, E. P. C.; Yeung, J. M. *Methods* **2000**, *22*, 77-91.
49. Barnes, J. R.; Stephenson, R. J.; Welland, M. E.; Gerber, C.; Gimzewski, J. K. *Nature* **1994**, *372*, 79-81.
50. Thundat, T.; Warmack, R. J.; Chen, G. Y.; Allison, D. P. *Applied Physics Letters* **1994**, *64*, 2894-2896.
51. O'Sullivan, C. K.; Vaughan, R.; Guilbault, G. G. *Analytical Letters* **1999**, *32*, 2353-2377.
52. Buck, R. P.; Lindner, E.; Kutner, W.; Inzelt, G. *Pure And Applied Chemistry* **2004**, *76*, 1139-1160.
53. Fritz, J.; Baller, M. K.; Lang, H. P.; Rothuizen, H.; Vettiger, P.; Meyer, E.; J. G.; uuml; ntherodt, H.; Gerber, C.; Gimzewski, J. K. *Science* **2000**, *288*, 316-318.
54. Savran, C. A.; Knudsen, S. M.; Ellington, A. D.; Manalis, S. R. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 3194-3198.
55. Wu, G. H.; Datar, R. H.; Hansen, K. M.; Thundat, T.; Cote, R. J.; Majumdar, A. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 856-860.
56. Morales, A. M.; Lieber, C. M. *Science* **1998**, *279*, 208-211.
57. Cui, Y.; Wei, Q. Q.; Park, H. K.; Lieber, C. M. *Science* **2001**, *293*, 1289-1292.
58. Hahm, J.; Lieber, C. M. *Nano Letters* **2004**, *4*, 51-54.
59. Patolsky, F.; Zheng, G. F.; Hayden, O.; Lakadamyali, M.; Zhuang, X. W.; Lieber, C. M. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **2004**, *101*, 14017-14022.
60. Patolsky, F.; Lieber, C. M. *Materials Today* **2005**, *8*, 20.
61. Bayley, H.; Braha, O.; Gu, L. Q. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 139-142.
62. Ashkenasy, N.; Sanchez-Quesada, J.; Bayley, H.; Ghadiri, M. R. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 1401-1404.
63. Deamer, D. W.; Akeson, M. *Trends in Biotechnology* **2000**, *18*, 147.
64. Howorka, S.; Cheley, S.; Bayley, H. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 636-639.
65. Howorka, S.; Movileanu, L.; Braha, O.; Bayley, H. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **2001**, *98*, 12996-13001.
66. Movileanu, L.; Howorka, S.; Braha, O.; Bayley, H. *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 1091-1095.
67. Schmidt, J. *Journal Of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 831-840.
68. Bayley, H.; Cremer, P. S. *Nature* **2001**, *413*, 226-230.
69. Gyurcsányi, R. E.; Vigassy, T.; Pretsch, E. *Chemical Communications* **2003**, 2560-2561.

Trends in the analytical transduction of bioaffinity based molecular recognition events

The quantitative determination of biologically relevant compounds is clearly a major goal of the analytical sciences. Bioanalysis had much to gain from the analytical use of biomolecular recognition events. The exquisite selectivity of biomolecular interactions made not only possible the implementation of miniature biosensing devices suitable for on-site measurements, but also the development of high throughput analyzers and biochips allowing the simultaneous detection and screening of large numbers of analytes. While biomolecular recognition can be either biocatalytic or bioaffinity based, this review article focuses only on the analytical transduction of bioaffinity type interactions. Bioanalytical systems based on bioaffinity interactions involve high selectivity non-covalent binding of a ligand to a receptor (antibody-antigen, DNA hybridization, etc.) with subsequent detection of the binding event. Since the formation of the ligand-receptor complex typically does not engage large changes in the physical-chemical parameters of the reaction media, the first high sensitivity detection

methods of affinity interactions were based on the use of different labels, such as enzymes, nanoparticles, fluorophores, etc.. In the recent years the implementation of novel nanostructures such as quantum dots, nanoparticle-receptor conjugates as well as different biological and chemical type amplification schemes are pushing to the limits the analytical performance parameters. The application of nanostructures for sensing and biosensing is especially a quickly emerging area, gaining popularity from the intimate molecular level control of the detection process. It has been shown by several groups the tremendous amplification with which nanoparticle labels can assist the analysis of proteins and DNA strands. The high optical density of metal nanoparticles in certain cases made possible the visualization of target concentrations down to 100 pM with the naked eye. The catalytic effect of metal nanoparticles can also be used to induce electroless deposition of silver, which improves with another five orders of magnitude the detection limit of analytical techniques based on gold nanoparticle labels.

Moreover, since each individual molecular binding event is associated with the presence of a nanoparticle consisting of thousands of atoms, their dissolution and detection with stripping voltammetry in minute volumes provides another route for the high sensitivity detection of bioaffinity interactions. However, the use of labels can often result in laborious multi-step detection procedures and most often prohibit the real time monitoring of the affinity interactions. Therefore, there is a considerable effort directed towards the development of novel label-free, but sensitive

approaches for biosensing. Well established label-free techniques such as quartz crystal microbalance and surface plasmon resonance are providing means not only for the trace analysis of biomolecules, but also to follow binding events in real time and by that to determine the kinetic parameters of the affinity reactions. Recently emerging biosensing technologies such as microcantilever sensors, nanowire based field effect transistors and stochastic sensors have demonstrated the tremendous potential of biological and synthetic nanostructures for label-free bionalysis.

Chiptechnológia a gyógyszerkutatásban

PUSKÁS László G.

MTA, Szegedi Biológiai Központ, Funkcionális Genomika Laboratórium, Szeged, Temesvári krt. 62.

Összefoglalás

A gyógyszerkutatások során olyan gyógyszer-jellegű kismolekulákat próbálnak azonosítani, amelyek specifikus kölcsönhatásba lépnek különböző, betegséget meghatározó célfehérjékkel. A hagyományos megközelítések mellett egyre fontosabbak az olyan új módszerek, amelyek átfogó globális szűrőmódszerekkel dolgoznak, mint amilyen a kismolekula-, DNS- és fehérje-chip technológia. Ezekkel a módszerekkel nem csak a hatóanyagok nagy áteresztőképességű szűrésére nyílik mód, hanem a hatóanyagok mechanizmusának, esetleges mellékhatásainak korai azonosítására is felhasználhatók. Gyógyszerhatóanyagok hatásának felderítésére a DNS- és fehérje-chip technika olyan esetekben lehet nagyon hasznos, amikor a potenciális gyógyszermolekula hatásmechanizmusát vagy molekuláris célpontjait nem ismerjük. A chipmódszereknél nagy előny, hogy néhány kísérletben nem csak néhány, gyanúsítható célmolekula mennyiségi vagy minőségi változása határozható meg, hanem elvileg lehetőség van több ezer fehérje vagy akár a teljes génállomány változásainak detektálása is. Így olyan információ halmazhoz jutunk, amely az eddigi módszerekkel nem volt lehetséges. Ennek a forradalmi technológiának a létrejöttét a miniatürizálás, a robot-technika és az informatika fejlődése tette lehetővé.

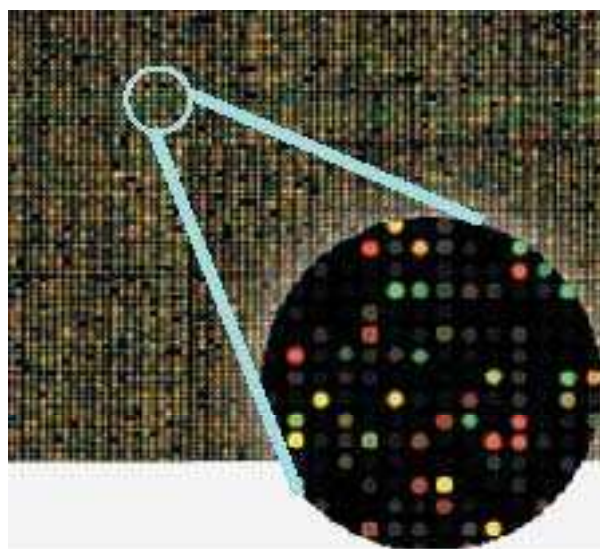
Ebben a cikkben röviden megemlíti a DNS- és fehérje-chip technológia lényegi elemeit. Az egyik legmodernebb módszerről, a kémiai-chiptechnológiáról is beszámolunk, elsősorban a gyógyszerkutatásban betöltött és a jövőben betöltendő szerepéről.

I. DNS-chip technológia

A humán genom projekt keretében ma már korlátlan hozzáférési lehetőség van a gének szekvenciáit és lokalizációját tartalmazó adatbázisokhoz, nagyban segítve ezzel a kromoszóma rendellenességek felderítését, a génexpressziós mintázat szisztematikus meghatározását, mely nemcsak a sejtek normális működésének megértése szempontjából nagyon fontos, hanem hozzájárul olyan új gének azonosításához, melyek adott betegségszempontból potenciális gyógyszer-célpontok lehetnek. A huszadik század második feléig a gének funkciójának és szabályozásának tanulmányozása egyedi gének lépésről lépésre történő vizsgálatán alapult. Tekintve, hogy egyre több organizmus genomjának szekvenciája vált és válik teljesen vagy részlegesen ismertté, számos új technika fejlődött ki, melyek a génfunkciók szisztematikus analizisét teszik lehetővé. A technikák közül egyik nagykapacitású, könnyen automatizálható módszere a DNS-chip technológia, mely forradalmasította a molekuláris biológiát, a funkcionális

genomikát és napjainkban a klinikai diagnosztikai módszereket is [1-3].

A DNS-chip egy olyan meghatározott mintázatban felvitt és kihorgonyozott nagy számú (100-1.000.000) kölcsönható DNS mintát tartalmazó szilárd hordozó (legtöbbször üveg, de lehet arany, vagy speciális műanyag felület is), amely a hibridizálás során (az egyszálú DNS komplementer szakaszok specifikus kölcsönhatásából adódó kettős szál képződés) alkalmas adott biológiai mintából kinyert DNS vagy RNS mennyiségi jellemzésére (1. ábra). Minden egyes kölcsönható minta egy génre vagy DNS szakaszra specifikus, amelynek pozícióját ismerjük a szilárd felületen.



1. Ábra. A DNS-chipen több ezer (akár százezer) különböző gén aktivitását is nyomon tudjuk követni. Minden egyes pont egy génre jellemző szekvenciát tartalmaz. A biológiai mintából kinyert, majd fluoreszcensen megjelölt RNS a gén aktivitásával arányos fluoreszcens jelet ad.

Két (gyógyszerrel kezelt illetve kezeletlen kontroll) mintából származó RNS két spektrális tulajdonságaiban eltérő fluoreszcens festékkel jelölhető, amelyeket egy DNS-chipen hibridizálva, majd egy nagyfelbontású lézerszkenneres leolvasás után meghatározhatók az egyes gének relatív kifejeződése. A gén aktivitása az adott pontban detektálható fluoreszcens jel intenzitásával arányos. Ha egy pontban a kezelt mintából származó fluoreszcens jel erősebb, az azt jelenti, hogy a kezelés hatására az adott gén aktivitása megemelkedett. Ha történetesen az a gén egy olyan májban kifejeződő gén, amely a toxikus anyagok lebontásáért felelős fehérjét kódol, akkor nagy valószínűség szerint a gyógyszerhatóanyag toxikus mellékhatása is.

II. Fehérje-chip technológia

Az emberi genomot alkotó mintegy 30.000 fehérjét expresszálo gén közül csak egy relatíve kisebb alcsoport jöhet számításba terápiás alkalmazás céljából. A hatóanyagokkal megcélózható géntermékek számos esetben nem várt és kivételes lehetőséget nyújtanak a kutatóknak betegségek kiváltó okainak tanulmányozására. Ebben az alcsoportba kb. 3000 olyan fehérje tartozik, amelyek gyógyszerhatóanyagszerű kismolekulákkal (molekulatömeg < 500, közepesen lipofil) kölcsönhatásba képesek lépni. Másfelől, nagyszámú "knock-out" egereken végzett kísérletek alapján jelenleg kb. 3000-re becsüljük az olyan gének számát, amelyek valamilyen káros folyamat kialakulásával hozhatók kapcsolatba [4]. A két csoport közös része képviseli azt a körülbelül 600-1500 fehérjéből álló csoportot, amely gyógyszerhatóanyagok számára célpont lehet, azaz célfehérjének (targetnek) tekinthető. Egy közelmúltban közzétett felmérés szerint a mostanáig azonosított célfehérjék száma mindössze 500-ra tehető [5].

A DNS-chip technológiával hasonló módon készülnek el a fehérje-chipek, azzal a különbséggel, hogy a lecseppentett pontokban nem kölcsönható DNS molekulák, hanem fehérjékkel specifikus kölcsönhatásba lépő (általában) antitestek vannak kihorgonyozva. A biológiai mintából nem RNS-t vagy DNS-t vonunk ki, hanem fehérjét, amelyet szintén fluoreszcens festékkel jelölünk, majd a fehérje-chip felületén inkubáljuk a jelölt fehérjék elegyét. A detektálás szintén a DNS-chipeknél már említett lézerszenkerezés leolvasása, amelyet az intenzitásértékek meghatározása és kezelt és kezletlen minták relatív fehérje mennyiségének meghatározása követ. Ezzel a módszerrel egy kísérletben több száz vagy akár ezer fehérje mennyisége határozható meg, így azonosíthatók olyan fehérjék, amelyeknek mennyisége egy gyógyszeres kezelés során megváltozott.

III. Genomikai farmakológia, kémiai genomika

Amíg a megfejtett génszekvenciák száma évek során gyorsan nőtt, addig funkcióik legtöbb esetben ismeretlenek maradtak. E nem várt mennyiségű információ kezelése a posztgenomika korszakának egyik legfőbb kihívása.

A posztgenomikai farmakológiában az olyan több irányú megközelítést, amelyekben kismolekula kezeléssel kiváltott sejtválaszt mérünk genomikai (génexpressziós mintázat) illetve proteomikai (fehérje expressziós változások) módszerekkel összefoglaló néven kémiai genomikának nevezzük. A kémiai genomika többnyire azokat a kölcsönhatásokat vizsgálja, amely egy változatos kismolekulasúlyú kémiai molekulakönyvtár és a humán genom összes génterméke között fennállhat. Szűkebb értelemben a kémiai genomika gyógyszer-jellegű kismolekulák tesztelését jelenti, annak érdekében, hogy a kevésbé jellemzett, betegséggel kapcsolatos fehérjék felhasználhatóságát a gyógyszerfejlesztés szempontjából meghatározza.

Kisméretű molekulákkal azonosíthatjuk a gyógyszerkölcsönhatásra és -fejlesztésre alkalmas célfehérjéket és igazolhatjuk első szinten a sejt szintű funkcióikat, ugyanakkor a fehérjeszintű kölcsönhatásból

visszakövetkeztethetünk a kismolekulák biológiai aktivitására, aminek ismerete a hatóanyag-tervezéshez nyújt segítséget. Így pl. az első szűrővizsgálat alkalmával kiválasztott hatást mutató molekulákkal (un. "hit"-vegyületekkel) nyert sejt ill. genom-szintű ismeretanyag lehetővé teszi a gyógyszeripar számára új hatóanyagok hatékonyabb kifejlesztését.

Laboratóriumunkban egy olyan új megközelítést fejlesztettünk ki, mely egy változatos molekulakönyvtár egyes elemeiből adott fehérjével történő kölcsönhatást kémiai-chip felhasználásával oldja meg [6]. A kémiai-chip segítségével több ezer kémiai vegyület gyors, egy lépésben történő tesztelését tudjuk megvalósítani, így egy előszelektált kisebb könyvtár szolgálhat további szűrésre vagy kémiai genomikai alkalmazásra [7-9].

A sejt állapotának változásait gyakran komplex hatások sora idézi elő. A sejteken végzett kémiai genomikai vizsgálatokkal a kismolekula kölcsönhatásait több ponton (valójában egy adott jelátviteli útvonalhoz a membrántól a sejtmembránig tartozó összes fehérjén) teszteljük, amely nem korlátozódik egyetlen sejt felszíni receptor vagy rekombináns géntermék kötődéséhez, mint a tisztán fehérje szintű biológiai szűrés esetén [8, 9]. Itt valójában sejtválaszt mérünk a jelátviteli útvonal kismolekula által kiváltott gátlása vagy aktiválása révén. A sejtválaszok fenotípusos, funkcionális vagy génexpressziós (génkifejeződéses) változások szintjén jönnek létre.

A kémiai genetikával ellentétben, amely egyedi gének megfigyelését célozza, a kémiai genomika a teljes genomot tanulmányozza gyakran felhasználva a funkcionális genomika eszköztárát is [7].

IV. Kismolekula v. Kémiai chipek

A kémiai chipek létrehozása valójában gyógyszer illetve gyógyszerjelölt vegyületek felületi immobilizálását jelenti oly módon, hogy azok a biológiai aktivitásukat és a kötőhely szelektivitásukat megtartsák.

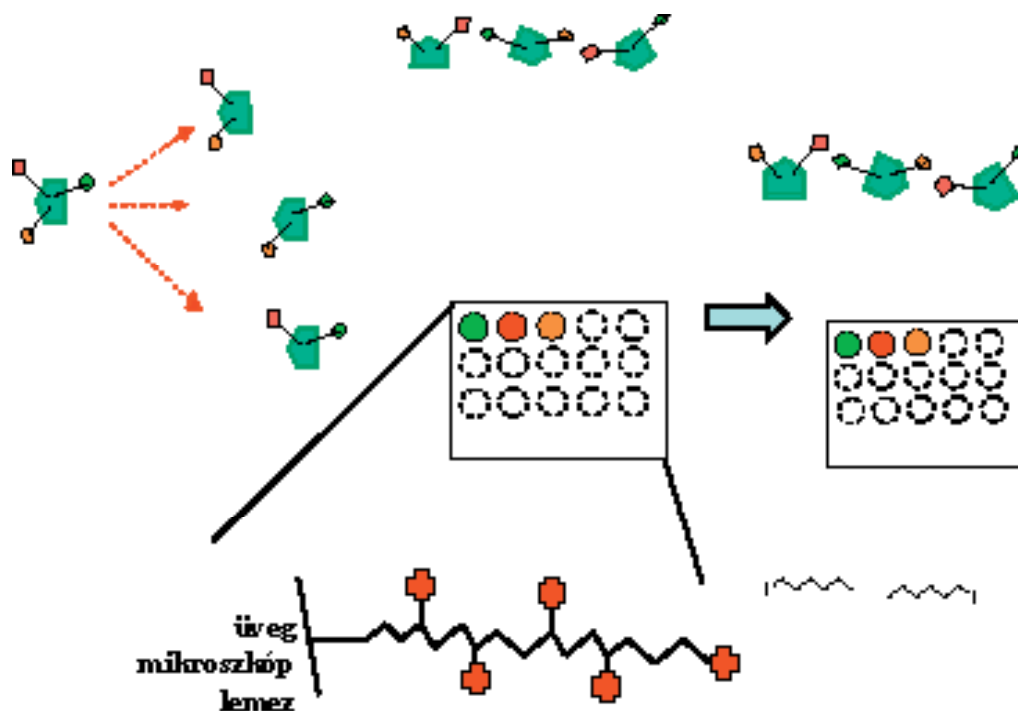
A kémiai-chip egy általunk szabadalmaztatott kémiailag módosított üveg felületre nagy sűrűségben felcseppentett és felkötött molekulakönyvtárat tartalmaz [7, 9]. A minták felcseppentése előtt mind a molekulakönyvtárat alkotó vegyületeket mind az alkalmazott üveg felületet módosítani kell az állandó felületi mintamennyiség biztosítása érdekében. A minták módosítása a szintézis után hozzájuk kapcsolt távtartó kar (linker) létrehozásával jár, amely egyben tartalmazza a módosított üvegfelülettel kovalens kapcsolatot létrehozó funkciók csoportját is (amino csoport). Kémiai chipek létrehozására szilárd hordozóként üveg mikroszkóp lemezek alkalmazhatók. Az általunk alkalmazott üveg felületeket több lépéses kémiai reakciók során módosítottuk. Így a felületen egy elágazó láncú, fa-szerű rendszert alakítottunk ki, melyen a láncok végén aktivált funkciók csoportok találhatók, melyek a kikötőni kívánt molekulák megfelelő részeivel kémiai kötések hozhatnak létre. Az ilyen típusú szerkezetek előnye, hogy az elágazások következtében nő a felület kapacitása (nagyobb mennyiségű minta köthető a felületre), illetve megfelelő távolságot képez a felvitt molekula és az üveg felülete között, ami a molekulák hozzáférhetőségét biztosítja.

Az általunk módosított felületre 500 linkerrel ellátott kismolekulatömegű vegyületet vittünk fel egy nagy pontosságú chip készítő robot segítségével. (Az 500 linkerrel előállított vegyület CMT [10] nagykapacitású párhuzamos szintézistechnológiával a ComGenex laboratóriumában készült egy 240,000 vegyületből álló molekulatár felhasználásával) (2. ábra).

A kémiai-chip segítségével kémiai vegyületek gyors, egy lépésben történő tesztelését tudjuk megvalósítani, ahol meghatározhatjuk adott fluoreszcensen jelölt fehérjékkel kölcsönható molekulákat.

Laboratóriumunkban az általunk gyártott kémiai-chipeket

melanómából és melanocitából nyert jelölt fehérjék vizsgálatára használtuk fel. A jelölt fehérjék a kémiai-chipen történő inkubálása után intenzív fehérje specifikus fluoreszcens jeleket kaptunk a megfelelő felületre kötött kölcsönható molekulák helyén. Azokra a pontokra összpontosítottunk (és így azokra a kémiai anyagokra), amelyek erősebb jelet adtak a melanóma mintával, mint a melanocita esetében. Ezek közül egy anyagot melanóma sejtvonalon (A375) is kipróbáltunk, ahol erős citotoxikus hatást tapasztaltunk. Humán májkarcinóma sejtvonalakon specifikus fenotípust és sejtelhalást detektáltunk. További kísérleteinkben a molekula fehérjecélpontját kívánjuk meghatározni és további in vitro és in vivo kísérleteket tervezünk.



2. Ábra Kémiai-chip létrehozása előre megszintetizált linkerrel ellátott molekulakönyvtárból. A vegyületek egyenként kis foltokban vannak kihorgonyozva egy speciálisan aktivált üveg felületen.

Összefoglalva, az emberi géntérkép befejezésével, egy kérdéses betegség megértéséhez és gyógyításához szükség van a genomika, proteomika, és újabban a kis molekulákból álló könyvtárak korai alkalmazásának integrálására abból a célból, hogy sokkal hatásosabb hatóanyag-felfedezési megközelítést építsünk fel. A posztgenomikai felfedezés fő feladata a célfehérjék növekvő száma és a kis molekulák közötti szinergizmus számos szempont figyelembevételével történő megalapozása. Az új célpontok a hagyományos és az újabban felmerülő betegségekre specifikusabb, hatékonyabb és biztonságosabb kismolekulákkal történő, új terápiás beavatkozásokat biztosítanak, míg a hatóanyag-felfedezésre fordított idő jelentősen lecsökken és megnövekszik a felfedezési folyamat valószínűségének sikere.

Köszönetnyilvánítás

A közlemény P.L.G. az MTA Kémiai Tudományok Osztálya 2005. évi májusi közgyűléséhez kapcsolódó tudományos ülésen elhangzott előadás anyagából állt össze (Budapest, 2005. május 4). A cikkben bemutatott saját eredmények

az Oktatásiügyi Minisztérium Biotechnológia 2002 pályázat (BIO-0006/2002) és a GVOP (3.1.1-2004-05-0280/3.0) támogatásával valósultak meg. Köszönettel tartozok a Funkcionális Genomikai Laboratóriumában dolgozó dr. Hackler Lászlónak és Fehér Liliánának, a ComGenex vezetőinek, dr. Darvas Ferencnek és dr. Ürge Lászlónak a pályázat létrehozása és végrehajtása során nyújtott támogatásukért, dr. Dormán György tudományos igazgatónak, valamint a Pharmatest munkatársai által nyújtott szakmai segítségért.

Irodalomjegyzék

1. Nguyen, D.V.; Arpat, A.B.; Wang, N.; Carroll, R.J. DNA microarray experiments: biological and technological aspects. *Biometrics* **2002**, *58*, 701-717.
2. Zvara, A.; Hackler L.Jr.; Nagy, Z.B.; Micsik, T.; Puskas, L.G. New molecular methods for classification, diagnosis and therapy prediction of hematological malignancies. *Pathol Oncol Res.* **2003**, *8*, 231-240.
3. Raetz, E.A.; Moos, P.J. Impact of microarray technology in clinical oncology. *Cancer Invest.* **2004**, *22*, 312-320.

4. Hopkins, A.L.; Groom, C.R. The druggable genome. *Nature Reviews Drug Disc.* **2002**, *1*, 727.
5. Terstappen, G.C.; Reggiani, A. In silico research in drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 23.
6. Hackler, L.Jr.; Dormán, G.; Kele, Z.; Ürge, L.; Darvas, F.; Puskás, L.G. Development of chemically modified glass surfaces for nucleic acid, protein and small molecule microarrays. *Mol. Divers.* **2004**, *7*, 25-36.
7. Darvas, F.; Dormán, G.; Krajcsi, P.; Puskás, L.G.; Kovári, Z.; Ambrus G.; Ürge, L. Recent Advances in Chemical Genomics *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3119-3145.
8. Stockwell, B.R. Frontiers in chemical genetics. *Trends in Biotechnology* **2000**, *18*, 449.
9. Puskás, L.; ifj. Hackler, L.; Dormán, G. Kismolekulachipek a kémiai genomikában. *Biokémia* **2004**, *28*, 61-67.
10. Darvas, F.; Dorman, G.; Ürge, L.; Szabó, I.; Rónai, Z.; Sasváry-Székely, M. Combinatorial Chemistry. Facing the Challenge of Chemical Genomics. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1487-1498.

Chip technology in drug discovery

Identification and selection of disease-specific targets is one of the most critical steps in post-genomic drug-discovery. Altered expression of genes and their protein products is often the best starting point for dissecting the pathways that are responsible for the development of specific diseases. In this article I review those technologies, which enable us to perform global monitoring at the genome, transcriptome and proteome level. Microarray technology is capable of screening the expression of thousands of gene products or proteins in a parallel way. Here I describe the technical background of production and application of DNA- and protein-microarrays. Chemical genomic studies intend to identify small, drug-like molecules, which specifically interact with different

protein targets. By using complex molecular biological tools (like chemical- or DNA-microarrays) it studies those interactions, which are among the specific gene products of the human genome and a diverse chemical library. We used chemical-microarray technology to reveal the mechanisms of action of potential drugs by monitoring protein expression changes caused in melanoma cell cultures. A novel approach by using chemical-microarrays, where a hit molecule (interacting with a specific protein) can be selected from a complex library with one step has been developed. Identification of new compounds by these novel approaches and application of microarrays in pharmacological studies serve for more effective drug development strategies.

Antus Sándor, Mátyus Péter: Szerves Kémia I-III

Nemzeti Tankönyvkiadó

Az Antus-Mátyus szerzőpáros „Szerves kémia” tankönyve hiánypótló munka. Bár egyetemi jegyzetből és ábragyűjteményekből az elmúlt negyed-században nem volt hiány, magyar nyelvű tankönyv írására kevesen vállalkoztak. Furka Árpád „Szerves kémia” című könyve (1. kiadás, 910 oldal) 1988-ban jelent meg. Novák Lajos és Nyitrai József „Szerves kémia” tankönyve (541 oldal) pedig 1998-ban. Utóbbi meglehetősen tömör, a műegyetemi vegyészmérnök képzés igényeihez igazodó munka. Így recenzor érthető módon nagy érdeklődéssel vette kézbe a nemrég megjelent könyvet. A három kötetes munka 566 oldal terjedelmű, de a betűméretet és a táblázatok többségének méretét figyelembe véve ez 800-1000 „normál” oldalnak felel meg. (A kis betűméret a Nemzeti Tankönyvkiadó szokásává vált az elmúlt években, jó szemekkel még türethetően olvasható, de a táblázatcímek és ábraalírások már bántóan apró betűvel lettek szedve.)

Az első kötet lényegében egyetlen fejezet („Szerves kémiai alapismeretek”, ezt egészíti ki a „Szerves vegyületek nevezéktana” és a „Gyógyszerek nevének képzése” rész, összesen 120 oldal). Minden megtalálható benne, ami a szerves kémia megértéséhez szükséges, a Lewis-elmélettől kezdve a Nobel-díjas Oláh György szupersavainak rövid tárgyalásán át egészen a sztereokémia alapjáiig és a szerves vegyületek összetételének és szerkezetének meghatározásáig. Bár a munka alaptankönyvnek számít, színvonala vetekszik a kiváló és gyakran sztárolt amerikai vagy angol kiadók gondozásában megjelent angol nyelvű „basic” szerves kémia tankönyvekével.

A II. kötet (2-12. fejezet, 137-443. oldal) a szerves vegyületeket tárgyalja hagyományos, funkciós csoportok szerinti csoportosításban, de szempontként megjelenik a természetben való előfordulás és az élettani hatás is. Ugyanebben a kötetben kerül sor a szerves reakciók tárgyalására is. Itt a hangsúly nem a reakciók végtelen hosszú felsorolásán van hanem az elektron- és térszerkezetből következő reakciókészség értelmezésén. Említés történik „modern” reakciókról és reagensekről is (pl. Net-reakció). Szerzők tömören, de érthető módon kezelik a reakciómechanizmusokat. A példák között gyakran találunk biomolekuláris reakciót is, pl. a 4. fejezetben szerepel a cisztein oxidációja cisztinné.

Az 5. fejezet („Éterek és kéntartalmú analógjaik”) az egyszerű éterektől a gyűrűs éterekig terjedő vonulat. Lényegesen rövidebb a 6. fejezet („Nitrovegyületek”), dicsérendő módon itt példaként felbukkan a klórámfenikol és a metronidazol gyógyszerek képlete. A 7. fejezet („Aminok, diazo-diazónium- és azovegyületek”) ismét rövid, a példák között megjelennek az ingerületátvivő acetilkolin és más biomolekulák, valamint gyógyszerek

sőt kábítószer is (pl. amfetamin). A 8. fejezet („Oxovegyületek”) és a 9. fejezet („Karbonsavak és származékaik”) tárgyalása megfelel a szokásoknak, a reakciómechanizmusok kellő súllyal szerepelnek, a képletek jól tükrözik az elemi történéseket. A 9. fejezet részletesen ismerteti a savszármazékok elnevezésének szabályait. A 10. fejezet („Helyettesített karbonsavak”) a biokémia tárgyat alapozza meg. Hasznosnak tartom a „Szénsavszármazékok” külön fejezetben (11.) való tárgyalását. A „Heterociklusos vegyületek” (12. fejezet, 389-443. oldal) fontos része a könyvnek, foglalkozik a vegyületek elektronszerkezetével, előállításával és reakcióival is, de nem feledkeznek meg a szerzők a nevezéktanról sem. A példák között szép számmal található gyógyszerek és természetesen biomolekulák. A diazinok alfejezetben felbukkan három vitamin (B₁, B₂-vitamin és a folsav). Összességében elmondható, hogy a II. kötetben tárgyalt leíró, illetve reakció-orientált szerves kémia arányos, szerepel benne minden, ami egy alapozó-tankönyvben szükséges – a terjedelmi korlátok figyelembevételével – kellő részletességgel.

A III. kötet recenzióban vegyes érzéseket váltott ki. A „Szénhidrátok” alfejezettel nincs semmi probléma, minden szerepel ami alapszinten fontos. Az „Izoprénvázas vegyületek” alfejezetet (513-522. oldal) célszerűbb lett volna a lipidek vegyületcsoportjába egyik tagjaként tárgyalni. A „Flavonoidok” alfejezet túlzott súlya (522-538. oldal) érthető, (az egyik szerző által művelt kutatási terület), de nem indokolt. Kellő terjedelmű alfejezetek az „Alkaloidok” (538-546. oldal) és a „Porfinvázas vegyületek” (555-559. oldal), kicsit hosszúnak tűnik az „Antibiotikumok” rész (546-555. oldal). Két terület szenvedte meg a III. kötet terjedelmi korlátokból is adódó „szűkmarkúságát”. Az egyik az „Aminosavak, peptidok, fehérjék” alfejezet (557-576. oldal), amelyben dicséretes módon említés történik a kombinatórikus kémiáról, de nem sok szó esik a fehérjéről. A másik a „Nukleinsavak, nukleotidok, nukleozid” alfejezet (500-513. oldal). A genomika és proteomika korszakában mindkettő több figyelmet érdemelt volna.

E recenzió írója nem foglalkozott szisztematikus „hibavadászattal”. A szűrőpróba jellegű ellenőrzések azt mutatták, hogy alig akad hiba a szöveges részekben, a képletek, egyenletek is jók és könnyen érthetők. Ez elsősorban a szerzőket, de a lektorokat is dicséri.

Szerzők a könyvet elsősorban a gyógyszerészeti karok hallgatóinak szánták, de recensens meg van győződve arról, hogy a munka a természettudományi karok, orvoskarok és műszaki egyetemek szerves kémia oktatásának is alaptankönyve lehet. Sőt, fontos szerepet játszhat a B.Sc. képzésben is a bolognai rendszer beindulása után.

Hollósi Miklós
tanszékvezető egyetemi tanár

Antus Sándor, Mátyus Péter: Szerves Kémia I-III

Nemzeti Tankönyvkiadó

Merész vállalkozás, ha manapság valaki szerves kémia tárgyú tankönyv írására adja a fejét, hiszen nem könnyű a nagynevű elődök (pl. Bruckner Győző, Lempert Károly, Szántay Csaba és Kajtár Márton) nyomdokába lépni, másrészt a közelmúltban Novák Lajos és Nyitrai József jelentetett meg szerves kémia tankönyvet, igaz vegyészmérnök hallgatók számára és a Műszaki Egyetemi Tankönyvkiadó gondozásában.

Antus Sándor és Mátyus Péter professzorok Szerves Kémia I, II és III című könyvsorozatát kézbe véve és betekintve a tartalomjegyzékbe rögtön kiderül, hogy a szerzőpárosnak sikerült valami nagyszerűt alkotnia, ugyanis a szokásos szerves kémiai ismeretanyagot egyedi módon, a gyógyszerészek szempontjából „kihelyezve” és az újabb ismeretekkel aktualizálva tárgyalja. A háromrészes mű igen értékes része az I. kötet. Az általános ismeretanyagot véleményem szerint jól válogatták össze és – a tömörség miatt – a tárgyalás is kiváló. Az ábrák érthetően és színvonalasan szemléltetik a leírtakat. A spektroszkópiai és nevezéktani összefoglaló beiktatása szintén jó ötlet volt. A II. kötet a különféle szénhidrogénektől indulva, a helyettesített származékokon, az étereken, aminokon és karbonsavak valamint származékain és a szénsavszármazékokon át a heterociklusos vegyületekig szisztematikusan tárgyalja az

adott családhoz tartozó vegyületek szerkezetét, előállítását és reakcióit. A III. kötet a természetes vegyületek legfontosabb csoportjait, így az aminosavakat, peptidket/fehérjéket, szénhidrátokat, nukleinsavakat, alkaloidokat, flavanoidokat, antibiotikumokat és egyéb fontos, de kisebb vegyületcsoportokat tárgyalja. A szóbanforgó kötet értékét növeli az egyedi és színes tárgyalásmód. Külön megemlítendő az alkotó szerkesztő, Antusné Dr Ercsényi Ágnes színvonalas munkája, amellyel összefésülte és egységesítette a két szerző fejezeteit.

Az esztétikus megjelenést a külső és belső borítólappal biztosítja. A hallgatóság számára a Név- és tárgymutatón kívül (amelyet Dr Wölfling János készített) hasznos segítség a „Szakkifejezések magyarázata” c. rész is.

Nyugodt lelkiismerettel lehet állítani, hogy az Antus-Mátyus szerzőpáros által írt háromrészes szerves kémiai tankönyv nemcsak gyógyszerész-, hanem vegyész-, vegyészmérnök- és biomérnök hallgatók, valamint kémia szakos tanárjelöltek számára is hasznos segítség lehet a szerves kémiai ismeretanyag elsajátításában, de a kémiával foglalkozó szakemberek számára is érdekfeszítő és hasznos olvasmány.

Keglevich György
egyetemi tanár, tanszékvezető
BME, Szerves Kémiai Technológia Tanszék