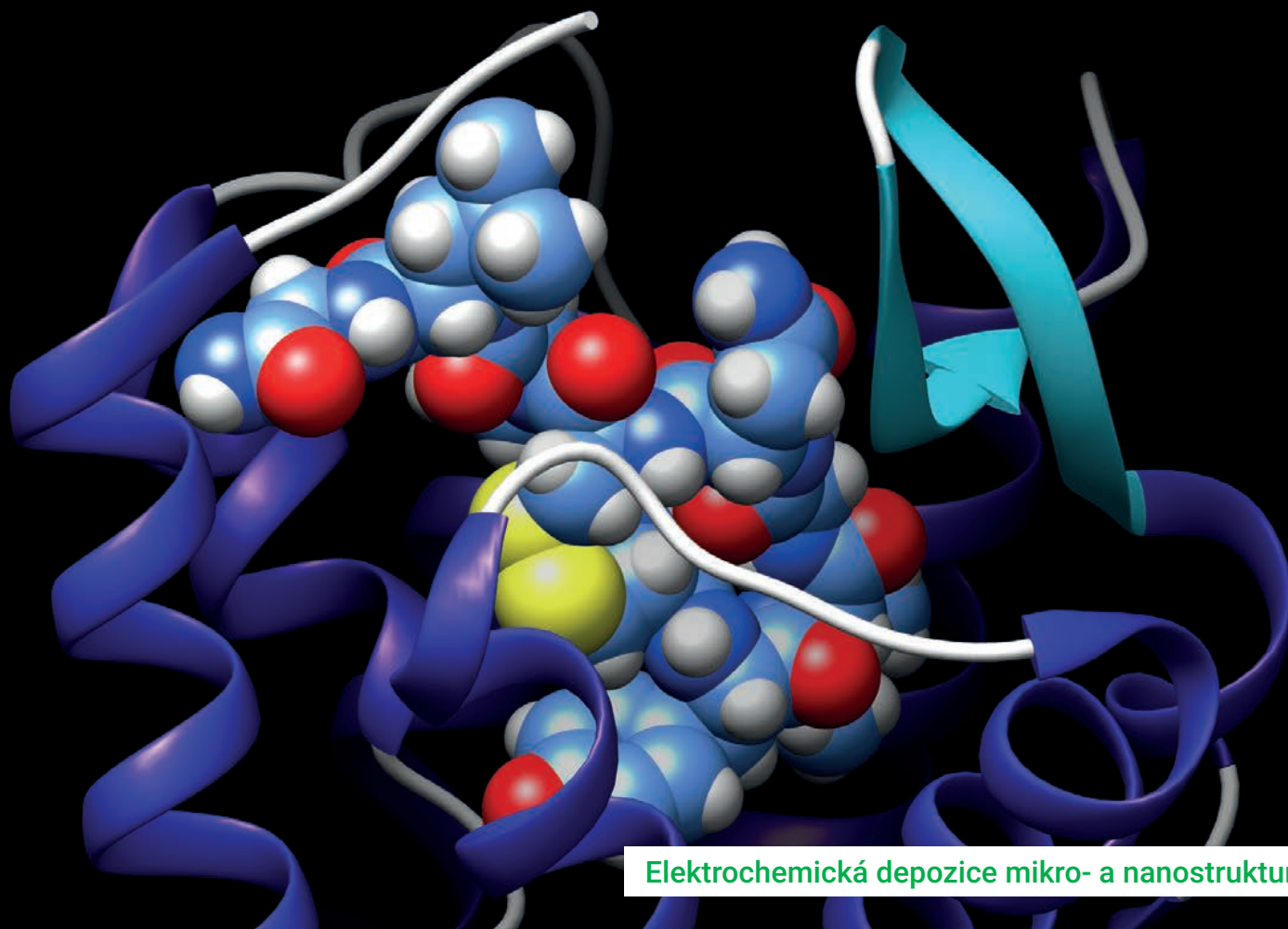


Chemické Listy

9

ročník • 117



Elektrochemická depozice mikro- a nanostruktur

Paňdžábský asfalt

Elektroanalýza insulínu

Názvosloví huminových látek



Excellence in Chemistry Research



Announcing our new flagship journal

- Gold Open Access
- Publishing charges waived
- Preprints welcome
- Edited by active scientists

Meet the Editors of *ChemistryEurope*



Luisa De Cola

Università degli Studi
di Milano Statale, Italy



Ive Hermans

University of
Wisconsin-Madison, USA



Ken Tanaka

Tokyo Institute of
Technology, Japan

Konečně září, konečně chemie

Tak je tady zase září! Léto se dostává do své poslední fáze, aby v září definitivně skončilo a začal podzim. Listy (kromě listů Chemických) začínají měnit barvu a slunce, už ne tak spalující, umí zalít krajinu světlem, že vše kolem nás krásně září. Ten pocit je až takový, že právě díky této skutečnosti mohlo září získat své jméno, byť tak tomu, možná až bohužel, není – původ názvu měsíce spíše tkví ve staročeském slovní spojení „za řuje“, tedy dnešními slovy „za řevu“ či „během řevu“, jako označení pro období, kdy páříci se zvěř řve. Září ale není jen měsícem krajiny zalité sluncem, ale také měsícem vzrušujícího očekávání. Prvního září totiž začíná škola a spousta nastávajících prvňáčků už je na konci srpna nedočkavých, až konečně usednou do školních lavic. Těší se, že se tam dozví mnoho nového a zajímavého a naučí se číst, psát a počítat. A pro některé žáky základního vzdělávání přijde také jedna novinka. Do jejich rozvrhu jim přibude nový předmět – chemie. Je září, svět je zalitý sluncem, ovoce chutná sladce, ale co se týká chemie jako předmětu, nemožu se ubránit určité pachuti. Proč? Přiznám se, trochu mě trápí, že ze všech přírodních věd totiž výuka chemie začíná nejpозději, obvykle až v 8. třídě základní školy (tedy přibližně ve 13 letech věku dítěte). Pokud dítě navštěvuje víceleté gymnázium, má velmi slušnou šanci, že tomu bude o rok dříve¹. To ale nemění nic na tom, že to bude později, než začíná výuka fyziky, matematiky nebo biologie. A z humanitních předmětů např. dějepisu nebo zeměpisu. Snažil jsem se dopátrat v řadě diskusí, co by mohlo stát za

tím, že chemie se v porovnání s jinými předměty začíná vyučovat tak pozdě. Odpovědi mi vesměs bylo, že chemie je předmět veskrze abstraktní a příliš náročný na pochopení a potřebu, ba dokonce nutnost, abstraktního myšlení. Tento argument se mi ale nezdá být příliš relevantní, vždyť v čem je změna barvy extraktu červeného zelí po přidání uhličitanu sodného abstraktnější než oděv používaný prvními Slovany nebo pozice řeky Ob na slepé mapě? Či proč by výroba železa měla být abstraktní, zatímco pohyb planet po eliptické dráze nikoliv? V tomto pohledu přece chemie nabízí značné množství zcela konkrétních podnětů, které by bylo možné ve výuce dobře využít. A platí to i opačně. Dovolím si tvrdit, že řada předmětů, které se vyučují na prvním stupni základní školy, rovněž pracuje s mnoha pojmy natolik abstraktními, že nezařazení chemie do nižších ročníků z důvodu její abstraktnosti jen těžko obstojí. Přičemž se ukazuje, že bez pojmů a poznatků bezpochyby patřících do chemie se ostatní předměty jen těžko obejdou. Příkladem může být exkurze do tématu struktury atomu, realizovaná převážně v 6. třídě základní školy v rámci výuky fyziky, či do tématu skupenských stavů a přeměn látek. V biologii se zase běžně hovoří o fotosyntéze či genetice. Vzhledem k tomu se žáci s chemickými pojmy jako například sloučenina, prvek, atom, elektron či molekula beztak musí setkat podstatně dříve než v 8. třídě základní školy. A pokud se nesetkají, ani to



nebude dobře – tyto pojmy a jejich pochopení jim bude chybět v ostatních předmětech. Z chemie a jejich poznatků totiž vychází a tyto poznatky jsou organicky propojeny, jak bylo naznačeno, s řadou témat v biologii a fyzice, ale také s dějepisem nebo zeměpisem. Významné události dějin by se totiž neobešly bez chemických prvků a sloučenin, jako jsou měď, cín, železo, olovo, soda, ledky, amoniak a mnoho dalších. A obchodní cesty se zbožím, jako byly hedvábní či koření, nebo naleziště a průmysl významných chemických sloučenin a směsí, jako jsou ropa nebo zemní plyn, jsou důležitou součástí výuky zeměpisu. A to nemluvíme o potravinářství a oblasti Výchova ke zdraví. Bez znalostí chemie se přece těžko vysvětluje, proč a kdy je třeba ve stravě dostatečného množství bílkovin. Zkrátka, začínat s výukou chemie až v 8. třídě základní školy a ve 13 letech je prostě pozdě a těžko budeme hledat rozumné argumenty, proč by tomu tak mělo být. A kromě zmíněných důsledků pedagogických jsou tu i neblahé důsledky společenské. Jak je dobře známo, chemie patří již delší dobu mezi předměty nejméně oblíbené². Jistě, tradiční pojetí její výuky, která začíná obecnou chemií a názvoslovím, chemickými výpočty a někdy i elektronovou strukturou atomu a kvantovými čísly, k oblíbenosti předmětu příliš nepřispívá. A když přijdou na řadu zajímavější témata, jsou žáci již v 9. třídě. Základní školu tak začínají pozvolna opouštět a přecházejí na gymnázia nebo odborné školy a známka z chemie je obvykle to poslední, co žáky zajímá. Minimálně poslední půlrok výuky tak mnoho žáků spíše „přežívá“ poslední okamžiky na základní škole a obecně vzdělávání se jen málokdy u nich setkává s potřebnou odezvou. U ostatních předmětů to s ohledem na délku jejich předchozí výuky takový problém není, ale u chemie už času na reálnou a smysluplnou výuku nezbyvá vskutku mnoho. Ale zmíněné možná není nakonec ten největší problém pozdější výuky chemie. S ohledem na vývojovou psychologii dětí se hlavní zájem o konkrétní obor, téma či oblast začíná formovat zhruba na konci mladšího školního věku a počátku staršího školního věku (což zhruba odpovídá 2. stupni základní školy). Právě toto období je tak mnohdy klíčové pro to, co bude dítě v budoucnu dělat, co bude jeho životním posláním. Pokud děti chemii, jako předmět, vůbec nemají, je samozřejmě obtížné vzbudit v nich zájem o něco, co nijak nepoznají. A ve chvíli, kdy krásu chemie mohou žáci poznat, bývá už příliš pozdě. Pole zájmu žáka obsadily jiné obory. A důsledky jsou bohužel celospolečensky neblahé –

malý zájem o chemii u žáků a následně nedostatek dostatečně kvalifikovaných pracovníků pro chemii i průmysl. Dílo zkázy pak dokonají některé sdělovací prostředky, které podporují celkovou chemofobii ve společnosti³, což na dítě nezřídka přenesou. Dítě tak mnohdy ve chvíli, kdy ještě neví o chemii vůbec nic a vůbec nic neví o úžasných objevech, jevech a metodách, které nám všem chemie přináší, získá zkreslenou a negativní představu o chemii jako oboru nebezpečnému zdraví i životu na zemi. I sebelepší učitel pak jen těžko na tomto poli osázeném plevellem negativních emocí zaseje semínko zájmu a radosti z oboru. A pak jen těžko se chemie „prokope“ žebříčkem předmětů alespoň o dvě místa výše, přičemž dle mého na jejím chvostu je neprávem a díky nepochopení.

Snad nejsem na začátku zří, a začátku školního roku, příliš negativní. Ale myslím, že pro měsíc, kdy začíná škola, se tato úvaha celkem hodí. Věřím totiž, že pro pozdější začátek výuky chemie oproti ostatním předmětům není žádný důvod a jeho posunutí do ročníků nižších by nepochybně bylo prospěšné pro všechny. Přirozeně, neočekávám, že by se tak stalo již toto zří, ale třeba tento úvodník poslouží jako odrazový můstek k diskusi, která povede k tomu, že v některém z dalších zářijových úvodníků budu s nadšením komentovat zařazení chemie do výuky v 5. ročníku a Chemické listy si bude moci užít více nadšených chemiků. A vy si užijte toto zářijové číslo – věříme, že vás bude bavit a bude se vám líbit.

Petr Šmejkal

LITERATURA

1. Wilhelm L.: *Výuka chemie v nižších ročnicích nižšího gymnázia v ČR. Bakalářská práce*. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha 2021.
2. Höfer G., Svoboda E.: *Sborník příspěvků konference Moderní trendy v přípravě učitelů fyziky 2: Některé výsledky celostátního výzkumu „Vztah žáků ZŠ a SŠ k výuce obecně a zvláště pak k výuce fyziky“*. Online, 28. 4.–30. 4. 2005, Srní, Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň 2005. Dostupné z: www.kof.zcu.cz/ak/trendy/2/sbornik/svoboda_e/srni.doc, staženo 14. 8. 2023.
3. Chalupa R., Nesměrák K.: *Chem. Listy 108*, 993 (2014).

ELEKTROCHEMICKÁ DEPOZÍCIA MIKRO- A NANOŠTRUKTÚR ĽUBOVOLENÉHO TVARU

DÁVID HALUŠKA, OLEKSIY LYUTAKOV a VÁCLAV ŠVORČÍK

Ústav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha, Česká republika
haluskad@vscht.cz

Došlo 5.4.23, prijaté 29.5.23.

Elektrochemická depozícia ohraničená meniskom (MCED) je sľubná metóda na prípravu mikro- a nanoštruktúr s vysokou presnosťou a rozlíšením. Úspech MCED závisí od optimalizácie niekoľkých parametrov, vrátane pracovného cyklu, napätia, frekvencie, koncentrácie elektrolytu, rýchlosti pohybu anódy, tvaru anódy, cirkulácie elektrolytu a prísad. Pórovitosť, štruktúra, tvrdosť, medza klzu a zloženie sú kritickými faktormi, ktoré určujú kvalitu uložených štruktúr. Tento článok sumarizuje účinky rôznych faktorov na výsledok procesu MCED, ktorý zahŕňa riadené nanášanie „voxelov“ na vytvorenie uloženého objektu. Optimalizácia týchto parametrov môže viesť k vysokokvalitným štruktúram s dobrým rozlíšením a veľkosťou. Článok poukazuje na vzťah medzi týmito faktormi a výslednými vlastnosťami deponovaného predmetu, ktoré môžu byť užitočné pre budúci výskum v tejto oblasti. Rovnako poukazuje aj na rôzne typy prístupov prípravy týchto štruktúr prostredníctvom elektrochemickej aditívnej prípravy (ECAM) a jej podrobný mechanizmus.

Kľúčové slová: 3D tlač, mikro- a nanoštruktúry, elektrodepozícia, aditívna príprava, MCED

Obsah

1. Úvod
2. Mechanizmus lokalizovanej elektrochemickej aditívnej prípravy (ECAM) mikro- a nanoštruktúr
3. Porovnanie metód elektrochemickej aditívnej prípravy s klasickými metódami aditívnej prípravy mikro- a nanoobjektov
4. Rôzne prístupy elektrochemickej aditívnej výroby
 - 4.1. Meniskom ohraničená elektrochemická depozícia (MCED)
 - 4.2. Aplikácia techniky MCED
5. Účinky rôznych faktorov na výsledok MCED procesu
 - 5.1. Vplyv faktorov na pórovitosť
 - 5.2. Vplyv faktorov na štruktúrne ovládanie
 - 5.3. Vplyv faktorov na tvrdosť a medzu klzu
 - 5.4. Vplyv faktorov na zloženie
6. Záver

1. Úvod

Aditívna výroba (AM – Additive Manufacturing), ktorá je tiež bežne známa ako 3D tlač, pripravuje zložité 3D geometrie postupným spájaním materiálu vrstva po vrstve¹. Vďaka flexibilitě samotného „návrhu“, ktorú AM ponúka, došlo k jej širokému využitiu v rôznych priemyselných oblastiach, napr. automobilový priemysel^{1,2}, letectvo^{3,4}, zdravotníctvo⁵⁻⁷, životné prostredie⁸ a energetika⁹⁻¹¹. Skoré aplikácie AM sa zamerali na použitie polymérov

kvôli ich jednoduchému použitiu prostredníctvom tepelného procesu (modelovanie tavenej depozície (FDM – Fused Deposition Modeling)^{12,13} alebo fotopolymeráciou (stereolitografia)^{14,15}).

Postupne došlo k väčšiemu využitiu AM na báze kovu, pretože táto technológia prechádza z jej primárneho používania na prípravu prototypových nástrojov na prípravu (výrobu) konečných produktov¹⁶. Medzi hlavné technológie prípravy objektov na báze kovu patrí FDM s použitím polymérneho vlákna s integrovanými časticami kovu¹⁷, nanášaním usmernenou energiou^{18,19}, tavením elektrónovým zväzkom^{20,21} alebo priamym spekaním kovov laserovým zväzkom²²⁻²⁴.

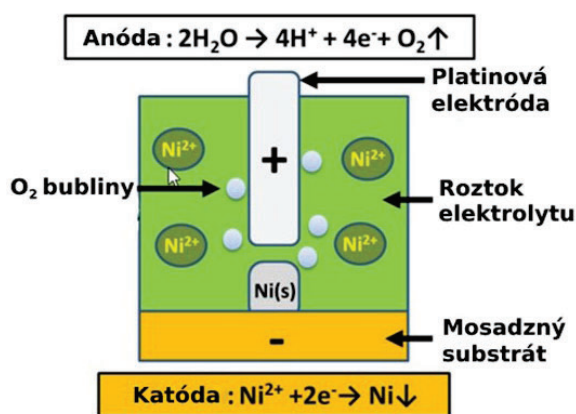
Vo väčšine týchto prípadov sa používa iba obmedzené množstvo jednotlivých typov materiálu, ktorý je možné aplikácie využiť. V súčasnosti výskumné úsilie bádateľov smeruje k širšiemu využitiu „kovovej“ 3D tlače, ktoré by sa využívalo na tvorbu objektov kombináciou rôznych materiálov. „Mikro- a nano-3D tlač“ prináša oproti klasickému prístupu pri mikrovýrobe štruktúr, ako je napr. litografia²⁵⁻²⁸, možnosť prípravy štruktúr v trojrozmernom priestore. Okrem tvaru štruktúry je zásadnou výhodou 3D tlače to, že nevyžaduje žiadne zložité nástroje aj zdĺhavé procesné úpravy pri príprave štruktúr. Na dosiahnutie čo najlepších výsledkov v rámci 3D mikrovýroby na tejto úrovni zostáva najväčšou výzvou dosiahnutie čo najvyššieho rozlíšenia a veľkosti objektov²⁹.

Elektrochemická aditívna príprava (ECAM – Electrochemical Additive Manufacturing) je relatívne nový spôsob AM, ktorý využíva lokalizované elektrochemické

ukladanie kovových iónov z roztokov elektrolytov na vytváranie kovových štruktúr. Výhodou tohto procesu je, že na prípravu štruktúr nie sú potrebné žiadne tepelné procesy, čo umožňuje, že celý postup je lacnejší a bezpečnejší. Momentálne najväčším problémom zostáva prekonať problémy týkajúce sa pomalosti nanášania materiálu^{30–34}. V súčasnosti je väčšina AM aplikácií zameraná na konkrétny typ materiálu. Rastie výskumný a predovšetkým aplikačný záujem o multimateriálovú tlač, ktorá môže poskytnúť výrazne väčšie aplikačné možnosti.

2. Mechanizmus lokalizovanej elektrochemickej aditívnej prípravy mikro- a nanoštruktúr

Mechanizmus procesu ECAM je založený na princípe elektrolytického nanášania medzi katódou a anódou ponorenou do elektrolytu. ECAM kombinuje princípy lokalizovanej elektrochemickej depozície³⁵ a AM a využíva výhody oboch týchto procesov. Na rozdiel od procesov, ktoré sú zamerané na plošnú elektrodepozíciu (napr. galvanické pokovovanie alebo galvanoplastika)^{36–39}, je nanášanie zámerne lokalizované medzi kapilárnym hrotom (anóda) a plochým substrátom (katóda). Aplikované napätové predpätie spôsobuje, že ióny v roztoku migrujú do substrátu, znižujú náboj a vytvárajú na substráte pevný nános (obr. 1). Celý proces prebieha pri izbovej teplote, čím sa predchádza rôznym tepelným defektom, ktoré sa vyskytujú pri klasických konvenčných procesoch ako napr. pri tavení prášku^{40,41}. Pri „spájaní“ práškov môže dôjsť ku vzniku mikrodutín, drsného povrchu a taktiež ku komplikáciám s tepelným namáhaním. U ECAM nedochádza k takým komplikáciám, pretože je objekt pripravený „atóm po atóme“, čoho výsledkom sú objekty s vysokou hustotou a veľmi „dobrou“ povrchovou štruktúrou. Brant a spol. vo svojej práci ukázali, že zvyškové napätie v objektoch takto pripravenými procesmi bolo rádovo väčšie



Obr. 1. Princíp lokalizovaného elektrochemického deponovania niklu⁷². (Farebná verzia obrázka je dostupná na webových stránkach časopisu Chemické listy).

ako pri objektoch pripravených ECAM (cit.⁴²). Ďalšou zásadnou výhodou z hľadiska prípravy objektov o rôznej geometrii u aditívnych techník je riadenie celkového postupu. Proces je riadený počítačom, ktorý zaisťuje presné ovládanie celého postupu. Z hľadiska nanášaných materiálov je ECAM schopný zvládnuť nanášať väčšinu vodivých materiálov vrátane kovov⁴³, kovových zliatin⁴⁴, vodivých polymérov⁴⁵ a dokonca aj niektorých polovodičov^{46,47}.

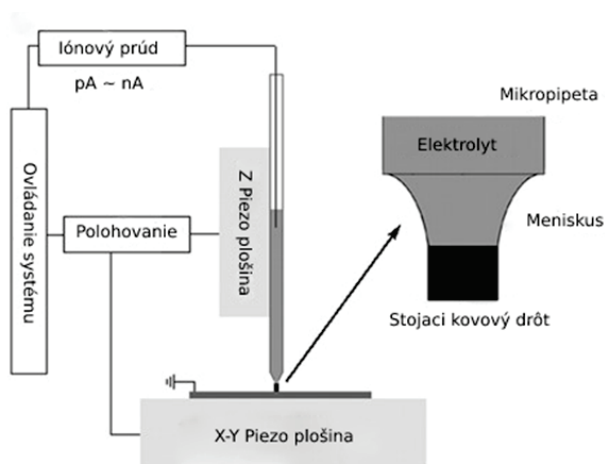
3. Porovnanie elektrochemickej aditívnej prípravy s klasickou aditívnou prípravou mikro- a nanoobjektov

Súčasný proces prípravy kovových objektov z kovových práškov využitím laserových aditívnych techník majú rozsiahle obmedzenia vznikajúce v dôsledku veľkosti prášku, čo vedie k minimálnej šírke depozitovaných línií 50 μm (cit.⁴⁸). Tieto výsledky viedli k vývoju rôznych nových aditívnych techník, ako je elektrohydrodynamická tlač (tlač EHD – Electrohydrodynamic Printing)^{49,50}, „priame písanie“ (DIW – Direct Ink Writing)^{51,52}, lokálna elektroforetická depozícia⁵³, laserom indukovaný prenos (LIFT – Laser-Induced Forward Transfer)^{54,55} a laserom indukovaná fotoredukcia^{56,57}, ktoré sa používajú pri príprave objektov s veľkosťou < 10 μm . Všetky tieto procesy sú stále v počiatočnom štádiu vývoja a stretávajú sa s niekoľkými problémami, ako je škálovateľnosť, nízka integrita materiálu, obmedzenosť prípravy objektov z rôznych materiálov a vysokých výrobných nákladov⁵⁸.

Na základe týchto poznatkov je na mieste určiť, že aj napriek aktuálnym nedostatkom týchto techník bolo preukázané, že sú schopné úspešne pripraviť objekty na mikro- a nanoúrovni. V prípade prípravy mikroobjektov pomocou klasických metód AM, ktoré sú poháňané vysokoenergetickým lúčom, dochádza k veľkej tepelnej/napätovej deformácii tvaru a k vzniku veľkého počtu rôznych defektov a nežiaducich dutín. Je to spôsobené tým, že takto formujúce sa objekty musia pri príprave prejsť drastickými tepelnými zmenami a fázovými prechodmi v krátkom časovom úseku. Z tohoto dôvodu sú klasické metódy AM nedostatočné a sú požadované nízkoteplotné techniky elektrochemickej aditívnej prípravy.

4. Rôzne prístupy elektrochemickej aditívnej výroby

Doteraz bolo vyvinutých niekoľko techník ECAM pre rôzne aplikácie. Medzi typické techniky patrí najmä meniskom ohraničená elektrochemická depozícia (MCED – Meniscus-Confined Electrodeposition), prúdová elektrochemická depozícia (Jet ECD – Electrochemical Deposition), už spomínaná technika EHD a elektrodepozícia mikroskopom fluidnej sily (FluidFM – Fluidic Force Microscopy)^{59,60}. Keďže metóda MCED bola v mnohých štúdiách^{61–63} označená ako vysoko konkurencie schopná me-



Obr. 2. Schematický diagram galvanického pokovovania v „obmedzenom“ menisku⁶³

tóda na prípravu komplexných a presných nanoobjektov. Z tohoto dôvodu sa v nasledujúcej podkapitole zameriame na špecifikovaný opis.

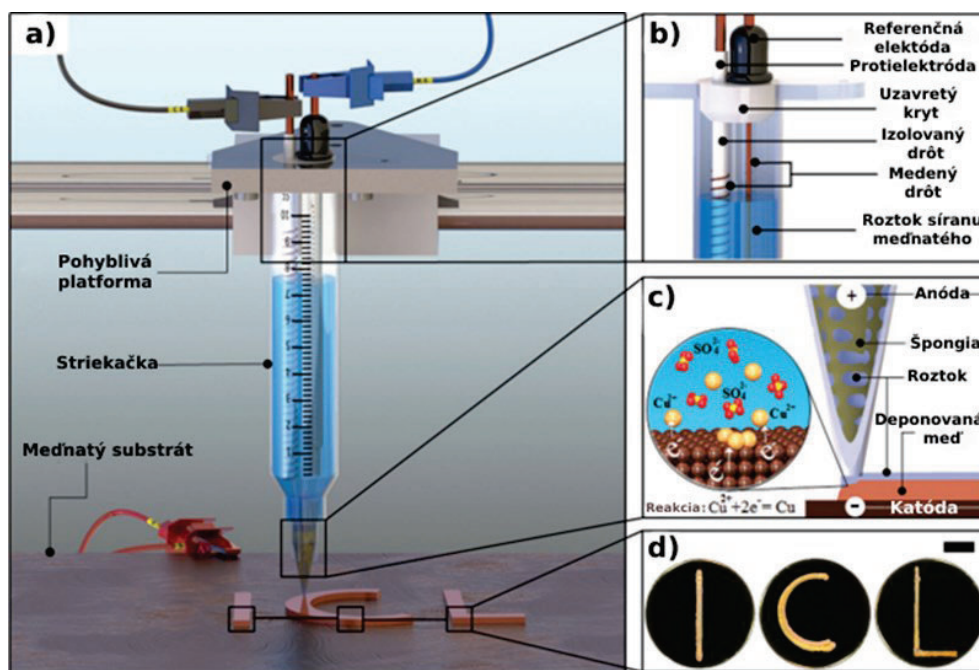
4.1. Meniskom ohraničená elektrochemická depozícia (MCED)

Podstata tejto techniky spočíva v priblížení anódy (jemnej kapiláry obsahujúcej elektrolyt) „dostatočne blíz-

ko“ ku katóde (vodivému substrátu) takým spôsobom, že sa vytvorí mikro- alebo nanorozmerný meniskusovitý elektrolytický mostík vytvorený v „extrémne úzkej“ medzere medzi ultrajemným anódovým hrotom a katódovým substrátom. V tomto prípade bude substrát slúžiť ako pracovná elektróda a bude predopnutý vzhľadom ku kvázi referenčnej elektróde (kovový drôt) umiestnenej v kapiláre s elektrolytom. Pri aplikácii rozdielu potenciálov sa spustí prenos elektrónov na rozhraní meniskus-substrát, čo má za následok elektrodepozíciu ohraničenú na oblasť pokrývajúcu meniskom (obr. 2). Na riadenie dráhy pohybu kapiláry sa používajú piezo plošiny, ktoré zabezpečia presnú kontrolu danej elektrodepozície. Hnacia sila tohto procesu je riadená odparovaním vody z elektrolytu v rámci vytvoreného elektrolytického mostíka v tvare menisku a spotreby iónov v dôsledku elektrolytickej depozície. Veľkosť takto vzniknutého objektu bude „veľmi“ závislá od tvaru a veľkosti menisku. Tvorba a následné udržiavanie samotného menisku je ovplyvnená niekoľkými faktormi ako sú veľkosť kapiláry, rýchlosti ovládania pohybu kapiláry v danom smere, rýchlosti depozície, vlastností elektrolytu a iné⁵⁹.

4.2. Aplikácia techniky MCED

Chen a spol.³² navrhli zariadenie pracujúce na princípe MCED (obr. 3), kde bolo v tomto prípade nanášanie elektrolytu kontrolované umiestnenou špongiou s otvorenými pórami na spodnej časti striekačky s elektrolytom. Po aplikácii pozitívneho potenciálu medzi medený substrát



Obr. 3. Schematické znázornenie 3D tlačiarne s elektrochemickým procesom. Zahrňuje nastavenie tlačovej hlavy (a), usporiadanie elektród (b), nanášanie medi a umiestnenie špongie do tlačovej trysky (c) a vytlačené medené štruktúry s písmenami "ICL"³² (d). (Farebná verzia obrázka je dostupná na webových stránkach časopisu Chemické listy).

a referenčnú elektródu došlo k postupnej redukcii Cu^{2+} iónov a k ich depozícii na povrch substrátu. Týmto spôsobom sa vykonala príprava bodiek a línií pri rôznom aplikovanom napätí za účelom analýzy vzniknutej morfológie pri stúpajúcom potenciáli. Rýchlosť depozície sa prirodzene zvyšuje s vyšším potenciálom. Je potrebné sledovať morfológiu deponovanej štruktúry vzhľadom na obmedzený prenos hmoty, aby bola pripravená rozmerovo presná štruktúra. Narozdiel od pripravených bodiek nedošlo pri depozícii línií k vzniku dendritických štruktúr, čo má za následok možnosť relatívneho polohovania tlačovej hlavy, ktorá napomáha pri transporte iónov Cu. Analýza mechanických a elektrických vlastností takto pripravených štruktúr ukazuje, že tvrdosť a elektrický odpor sú vyššie ako v prípade spracovania Cu za studena a to vďaka jemnozrnnej štruktúre.

Hengsteler a spol.³⁴ zlepšili proces použitím zariadenia, ktoré umožnilo lepšiu kontrolu na úrovni nanometrov a využívalo integrovaný systém mikro- a nanopolohovania, ktorý kombinuje mikromotory zabezpečujúce pohyb a piezoelektrické ovládače určené na jemný posun kapiláry (obr. 4). Takto vzniknutý objekt sa skladá zo základných stavebných blokov, ktoré sa nazývajú „voxely“. Najväčšia komplikácia pri príprave objektov na „nanoúrovni“ je upchatie otvoru použitej kapiláry s elektrolytom. Preto bol zavedený automatizovaný mechanizmus spätnej väzby, ktorý tento problém eliminuje. Na obr. 4b je zobrazený postup, kde sa tryska pomaly približuje k predpätému substrátu, zatiaľ čo elektrický prúd je monitorovaný zosilňovačom prúdu. Po priblížení sa vytvorí tekutý meniskus

a začne sa elektrolytické nanášanie. Veľkosť prúdu postupne narastá a po prekročení definovanej prahovej hodnoty dôjde k pohybu pipety smerom od substrátu až kým neklesne hodnota prúdu pod definovanú hodnotu. Týmto spôsobom sa celý proces opakuje niekoľkokrát, kým sa nevytvorí požadovaný objekt.

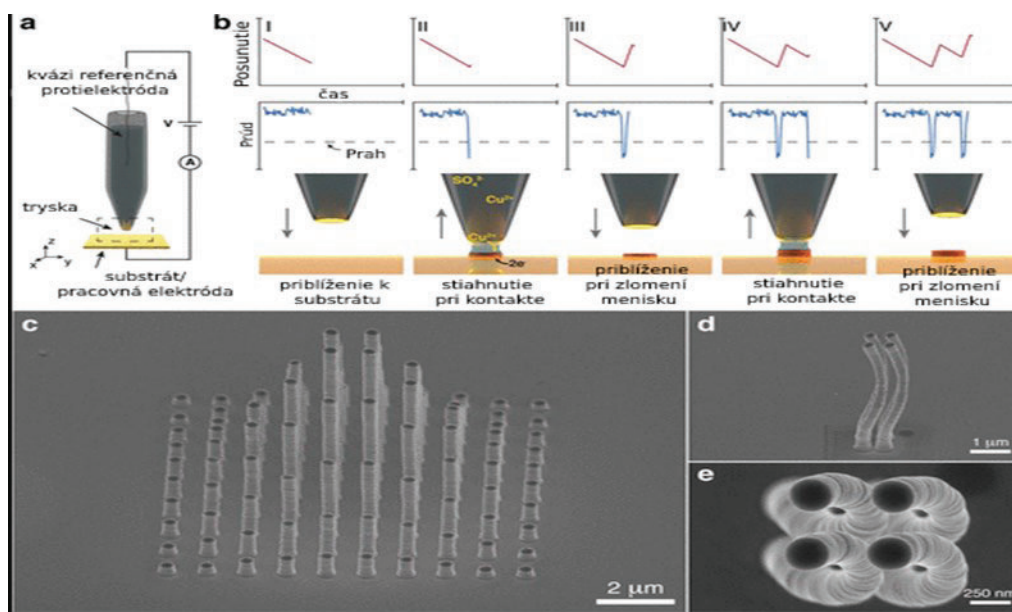
Ďalším zaujímavým prístupom bola štúdia, kde Lin a spol. študovali sekvenčnú tlač ako s jednou, tak aj viacerými kapilármi⁶⁴.

5. Účinky rôznych faktorov na výsledok MCED procesu

Veľkosť a vlastnosti „voxelov“ sú programovo riadené relatívnou polohou medzi nástrojom a substrátom a parametrami použitého napätia (amplitúda, pracovný cyklus, frekvencia) v procese prípravy objektu. Zo štruktúrneho hľadiska sú dôležitými vlastnosťami pripravených blokov jeho materiálové zloženie, mikroštruktúra (pórovitosť), tvrdosť a medza klzu. Pri optimalizácii týchto vlastností sa pripraví stabilná štruktúra. Ďalšími dôležitými faktormi sú: perióda impulzu, koncentrácia elektrolytu, rýchlosť pohybu anódy, tvar anódy, cirkulácia elektrolytu a prísady v elektrolyte⁴⁷.

5.1. Vplyv faktorov na pórovitosť

Lin a spol.⁶⁵ vo svojej štúdii uvádzajú použitie pulznej energie pre lokalizovanú elektrochemickú depozíciu.



Obr. 4. Schéma tlače stavebnej jednotky (voxelu) elektrochemickým procesom. Kapilára obsahujúca roztok elektrolytu a kvázireferenčnú protielektródu aplikuje elektrolyt na vodivý substrát, kde sa katióny medi redukujú na meď. Postup sa opakuje kým sa nedosiahne určitá výška „voxelu“ (a-b). Obrázky vytlačených štruktúr sú zobrazené elektrónovým mikroskopom (c-e)³⁴. (Farebná verzia obrázka je dostupná na webových stránkach časopisu Chemické listy).

Pracovný cyklus impulzného výkonu ovplyvňuje pórovitosť a povrchovú úpravu nanosennej štruktúry. Pracovný cyklus je definovaný ako „percento doby“, počas ktorej je impulzné napájanie zapnuté k celkovej dobe trvania impulzu. Kratšie pracovné cykly majú za následok menšie póry a hladší povrch. Tento záver sa vysvetľuje na základe hromadného transportu iónov počas doby „neaktivity“ pulzu, čo vedie k doplneniu iónov⁶⁵. Iná štúdia uvádza, že existuje optimálny rozsah pracovného cyklu (0,4–0,5 V), ktorý vedie k vysokej hustote depozície⁶⁶. Kamaraj a spol. analyzovali distribúciu veľkosti pórov pomocou obrázkov SEM a špecializovaného algoritmu. Zistili, že pórovitosť predmetov sa pohybovala od 20 do 70 % a vyššie napätie počas pracovného cyklu malo za následok hustejšie objekty s najmenšou pórovitosťou (obr. 5). Optimalizáciou napätia a pracovného cyklu možno vytvárať objekty s najmenšou pórovitosťou (najväčšia kompaktnosť)⁶⁷.

5.2. Vplyv faktorov na štruktúrne ovládanie

Bolo zistené, že pri aplikácii ultravysokofrekvenčného pulzného prúdu, môžu byť z nanášaného materiálu pripravené objekty s menšou veľkosťou, ako majú nástrojové elektródy. Rýchlosť depozície (tj. výšky pripravených štruktúr) sa zvyšovala s rastúcou frekvenciou impulzov a napätím pri pracovnom cykle. Z obr. 6 je zrejmé, že boli nanosené štruktúry s rozmermi v rozmedzí niekoľko stoviek μm , čo je až $5\times$ menšie ako rozmer nástrojovej elektródy⁶⁸. Táto skutočnosť otvára možnosť pre vysokolokali-

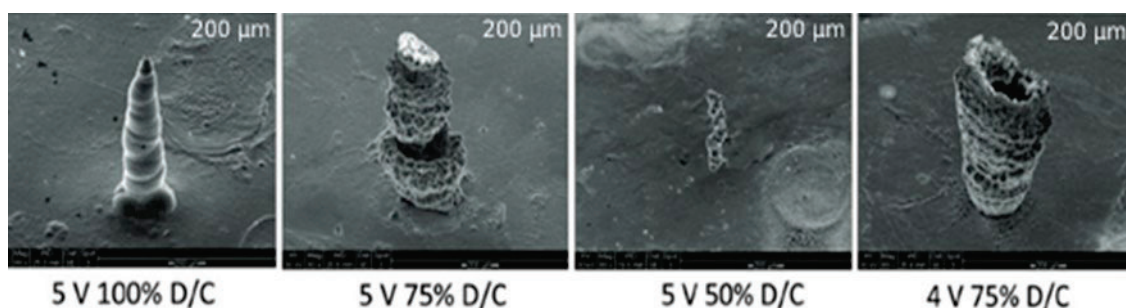
zovanú depozíciu aj u väčších nástrojoch pri použití ultravysokofrekvenčných impulzov.

5.3. Vplyv faktorov na tvrdosť a medzu klzu

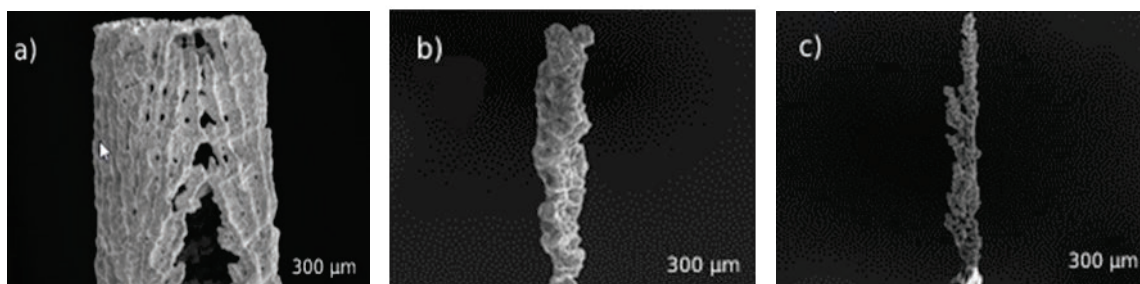
Uvádza sa, že objekty nanosené prostredníctvom aplikovaných impulzov pri lokalizovanej depozícii majú vyššiu pevnosť ako tie, ktoré boli pripravené pri aplikácii jednosmerného prúdu. Na základe týchto poznatkov mali nanokryštalické medené objekty medzu klzu viac ako 960 MPa, čo je až o 47 % viac ako pri príprave obdobnej štruktúry pri použití jednosmerného prúdu. Dôvodom bola mikroštruktúra so zrnami, ktoré obsahujú vysokú hustotu vrstvených nanokryštálov⁶⁹. Tvrdosť a medza klzu boli rovnako študované pomocou matematického modelu, ako aj experimentálneho porovnania dvoch rôznych substrátov, mosadze a hliníka, s rovnakými parametrami depozície. Výsledky neukázali žiadny významný rozdiel v tvrdosti medzi substrátmi, čo umožňuje presné určenie medze klzu⁷⁰.

5.4. Vplyv faktorov na zloženie

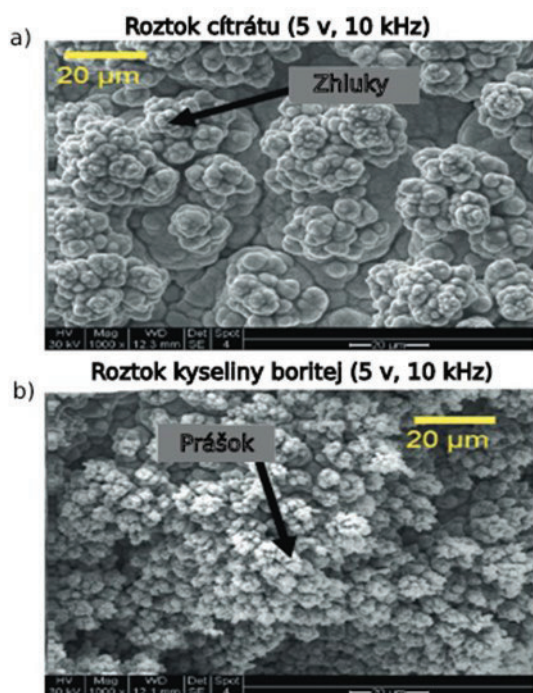
Na výsledné zloženie nanosených objektov na substrát má vplyv niekoľko faktorov, ako sú napätie, typ použitého elektrolytu a frekvencia depozície^{71,72}. Pri depozícii zliatiny Ni-Cu sa použil roztok citrátu, čo malo za následok vyššie množstvo deponovaného Ni ako v prípade roztoku kyseliny boritej. Vysoké napätie viedlo k vyššie-



Obr. 5. Bol sledovaný rast kryštálov niklu a uskutočnené boli experimenty pre štúdium pórovitosti nánosov. Objekty boli zachytené pomocou SEM za rôznych podmienok procesu (napätie a pracovný cyklus)⁶⁷



Obr. 6. Nánosy objektov vytvorených za rôznych podmienok prívodu pulznej frekvencie s použitím rovnakej veľkosti nástrojovej elektródy. (a) frekvencia 10 kHz; (b) 100 kHz; (c) 1 MHz (cit.⁶⁸)



Obr. 7. Porovnanie povrchovej štruktúry pri použití roztoku: a) citrátu b) kyseliny boritej⁷³. (Farebná verzia obrázka je dostupná na webových stránkach časopisu Chemické listy).

mu percentuálnemu zastúpeniu Ni, zatiaľ čo ultravysokofrekvenčné impulzy viedli k vyššiemu zastúpeniu Cu, najmä v roztoku kyseliny boritej. Štruktúry pripravené s použitím kyseliny citrónovej mali lepšiu povrchovú homogenitu napriek tomu, že boli pokryté rôznymi hrudkovitými tvarmi. Na druhej strane štruktúry pripravené kyselinou boritou mali práškovú formu, čo naznačuje nižšiu hustotu a celkovú kvalitu (obr. 7)⁷³.

Príprava štruktúr technikou MCED naráža na rôzne prekážky súvisiace s jednotlivými faktormi ovplyvňujúcimi proces. Optimalizácia všetkých dôležitých parametrov zaisťuje vysokokvalitné deponované štruktúry s dobrým rozlíšením a veľkosťou.

6. Záver

Technika MCED ponúka všestrannú metódu pre presné a lokalizované elektrochemické nanášanie materiálov. Vlastnosti nanosených predmetov môžu byť prispôsobené riadením rôznych faktorov, ako je napätie, pracovný cyklus, perióda impulzu, koncentrácia elektrolytu, rýchlosť pohybu anódy, tvar anódy, cirkulácia elektrolytu a prísady v elektrolyte. Pórovitosť, štruktúru, tvrdosť, medzu kľzu a zloženie nanosených predmetov je možné kontrolovať a optimalizovať na dosiahnutie požadovaných vlastností. MCED ukazuje potenciál pre aplikácie v rôznych oblas-

tiach, ako je mikrovýroba a mikroelektronika, kde je nevyhnutné vysoko lokalizované a presné nanášanie materiálov. Na preskúmanie plného potenciálu tejto techniky a jej obmedzení v praktických aplikáciách je potrebný ďalší výskum.

Autori ďakujú za finančnú podporu pre svoju vedeckú prácu Grantovej agentúre ČR v projekte č. 23-05197S.

LITERATÚRA

1. Wong K. V., Hernandez A.: *ISRN Mech. Eng.* 2012, 208760 (2012).
2. Leal R., Barreiros F. M., Alves L., Romeiro F., Vasco J. C., Santos M., Marto C.: *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 92, 1671 (2017).
3. Segonds F.: *Virt. Phys. Protot.* 13, 237 (2018).
4. Goh G. D., Agarwala S., Goh G. L., Dikshit V., Sing S. L., Yeong W. Y.: *Aerosp. Sci. Technol.* 63, 140 (2017).
5. Zhu Z., Guo S-Z., Hirdler T., Eide C., Fan X., Tolar J., McAlpine M. C.: *Adv. Mater.* 30, 1707495 (2018).
6. Celik H. K., Kose O., Ulmeanu M-E., Rennie A. E. W., Abram T. N., Akinci I.: *Int. J. Bioprinting* 6, 286 (2020).
7. Gioumouxouzis C. I., Karavasili Ch., Fatouros D. G.: *Drug Discov. Today* 24, 636 (2019).
8. Huang S. H., Liu P., Mokasdar A., Hou Y.: *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 67, 1191 (2013).
9. Pang Y., Sun Y., Zhang Y.: *Adv. Funct. Mater.* 30, 1906244 (2020).
10. Liu X., Zhang Y., Li C.: *Adv. Mater. Technol.* 1, 1600167 (2016).
11. Chen N., He C., Pang S.: *J. Mater. Sci. Technol.* 127, 29 (2022).
12. Vyavahare S., Teraiya S., Panghal D., Kumar S.: *Rapid Prototyp. J.* 26, 176 (2020).
13. Cano-Vicent A., Tambuwala M. M., Hassan S. S., Barh D., Aljabali A. A. A., Birkett M., Arjunan A., Serrano-Aroca Á.: *Addit. Manuf.* 47, 102378 (2021).
14. Bagheri A., Jin J.: *ACS Appl. Polym. Mater.* 1, 593 (2019).
15. Kaur M., Srivastava A. K.: *J. Macromol. Sci. C* 42, 461 (2002).
16. Frazier W. E.: *J. Mater. Eng. Perform.* 23, 1917 (2014).
17. Çevik Ü., Kam M.: *J. Nanomater.* 2020, 6187149 (2020).
18. Ahn D. G.: *Int. J. of Precis. Eng. and Manuf. Green Technol.* 8, 703 (2021).
19. Tang Z. J., Liu W. W., Wang Y. W., Saleheen K. M., Liu Z. C., Peng S. T., Zhang Z., Zhang H. C.: *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 108, 3437 (2020).
20. Murr L. E., Gaytan S. M., Ramirez D. A., Martinez E., Hernandez J., Amato K. N., Shindo P. W., Medina F. R., Wicker R. B.: *J. Mater. Sci. Technol.* 28, 1 (2012).
21. Körner C.: *Int. Mater. Rev.* 61, 361 (2016).

22. Venkatesh K. V., Nandini V. V.: *J. Indian Prosthodont. Soc.* 13, 389 (2013).
23. Khaing M. W., Fuh J. Y. H., Lu L.: *J. Mater. Process. Technol.* 113, 269 (2001).
24. Nandy J., Sarangi H., Sahoo S.: *Lasers Manuf. Mater. Process.* 6, 280 (2019).
25. Burtsev V., Marchuk V., Kugaevskiy A., Guselnikova O., Elashnikov R., Miliutina E., Postnikov P., Svorcik V., Lyutakov O.: *Appl. Surf. Sci.* 433, 443 (2018).
26. Miliutina E., Guselnikova O., Marchuk V., Elashnikov R., Burtsev V., Postnikov P., Svorcik V., Lyutakov O.: *Langmuir* 34, 12861 (2018).
27. Švanda J., Kalachyova Y., Ajami A., Husinsky W., Siegel J., Kolská Z., Slepíčka P., Švorčík V., Lyutakov O.: *Opt. Mater.* 112, 110695 (2021).
28. Švanda J., Kalachyova Y., Mareš D., Slepíčka P., Kolská Z., Macháč P., Michna S., Švorčík V., Lyutakov O.: *Nanomaterials* 12, 3366 (2022).
29. Vaezi M., Seitz H., Yang S.: *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 67, 1721 (2013).
30. Chen X., Liu X., Ouyang M., Chen J., Taiwo O., Xia Y., Childs P. R. N., Brandon N. P., Wu B.: *Sci. Rep.* 9, 3973 (2019).
31. Hengsteler J., Lau G. P. S., Zambelli T., Momotenko D.: *Electrochem. Sci. Adv.* 2, e2100123 (2022).
32. Chen X., Liu X., Childs P., Brandon N., Wu B.: *Adv. Mater. Technol.* 2, 1700148 (2017).
33. Siddiqui H., Singh N., Katiyar D., Naidu P., Mishra S., Prasad H. C., Khan M. A., Ashiq M., Sathish N., Kumar S.: *Adv. Chem. Eng. Sci.* 72, 2741 (2023).
34. Hengsteler J., Mandal B., van Nisselroy C., Lau G. P. S., Schlotter T., Zambelli T., Momotenko D.: *Nano Lett.* 21, 9093 (2021).
35. Kamaraj A. B., Sundaram M.: *Procedia Manuf.* 48, 181 (2020).
36. Zhang H., Dar M. I., Li G., Xu F., Guo N., Grätzel M., Zhao Y.: *Sci. Adv.* 3, 1700302 (2017).
37. Sridhar T. M., Eliaz N., Gileadi E.: *Grips: Electrochem. Solid-State Lett.* 8, C58 (2005).
38. McGeough J. A., Leu M. C., Rajurkar K. P., De Silva A. K. M., Liu Q.: *CIRP Ann.* 50, 499 (2001).
39. Silaimani S. M., John S.: *Bull. Electrochem.* 17, 553 (2001).
40. Sutton A. T., Kriewall C. S., Leu M. C., Newkirk J. W.: *Virt. Phys. Proto.* 12, 3 (2017).
41. Gibson I., v knihe: *Additive Manufacturing Technologies* (Gibson I., Rosen D., Stucker B., Khorasani M., ed. 3), kap. 5, str. 125. Springer Nature, Switzerland 2020.
42. Shunmugam M S., v knihe: *Advances in Additive Manufacturing and Joining: Proceedings of AIMTDR 2018* (Brant A., Kamaraj A., Sundaram M., ed. 1), kap. 9, str. 115. Springer Nature, Singapore 2019.
43. Siddiqui H., Singh N., Katiyar D., Naidu P., Mishra S., Prasad H. C., Khan M. A., Ashiq M., Sathish N., Kumar S.: *Mater. Today: Proc.* 72, 2741 (2023).
44. Yamasaki T., Schloßmacher P., Ehrlich K., Ogino Y.: *Nanostruct. Mater.* 10, 375 (1998).
45. Kim S., Jang L. K., Park H. S., Lee J. Y.: *Scientific Reports* 6, 30475 (2016).
46. Kamaraj A. B., Sundaram M.: *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 102, 2367 (2019).
47. Said R. A.: *Nanotechnology* 15, S649 (2004).
48. Vaezi M., Seitz H., Yang S.: *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 67, 1721 (2013).
49. Onses M. S., Sutanto E., Ferreira P. M., Alleyne A. G., Rogers J. A.: *Small* 11, 4237 (2015).
50. Zhang B., He J., Li X., Xu F., Li D.: *Nanoscale* 8, 15376 (2016).
51. Ahn B. Y., Duoss E. B., Motala M. J., Guo X., Park S.-I., Xiong Y., Yoon J., Nuzzo R. G., Rogers J. A., Lewis J. A.: *Science* 323, 1590 (2009).
52. Skylar-Scott M. A., Gunasekaran S., Lewis J. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 6137 (2016).
53. Takai T., Nakao H., Iwata F.: *Opt. Express* 22, 28109 (2014).
54. Wang J., Auyeung R. C. Y., Kim H., Charipar N. A., Piqué A.: *Adv. Mater.* 22, 4462 (2010).
55. Zenou M., Sa'ar A., Kotler Z.: *Small* 11, 4082 (2015).
56. Blasco E., Müller J., Müller P., Trouillet V., Schön M., Scherer T., Barner-Kowollik C., Wegener M.: *Adv. Mater.* 28, 3592 (2016).
57. Focsan M., Craciun A. M., Astilean S.: *Opt. Mater. Express* 6, 1587 (2016).
58. Hirt L., Reiser A., Spolenak R., Zambelli T.: *Adv. Mater.* 29, 1604211 (2017).
59. Li X., Ming P., Ao S., Wang W.: *Int. J. Machine Tools Manufact.* 173, 103848 (2021).
60. Hengsteler J., Lau G. P. S., Zambelli T., Momotenko D.: *Electrochem. Sci. Adv.* 2, e2100123 (2022).
61. Suryavanshi A. P., Yu M.-F.: *Appl. Phys. Lett.* 88, 083103 (2006).
62. Suryavanshi A. P., Yu M. F.: *Nanotechnology* 18, 105305 (2007).
63. Hu J., Yu M.-F.: *Science* 329, 313 (2010).
64. Lin Y., Zhang Y., Yu M.: *Adv. Mater. Technol.* 4, 1800393 (2019).
65. Lin J. C., Chang T. K., Yang J. H., Chen Y. S., Chuang C. L.: *Electrochim. Acta* 55, 1888 (2010).
66. Habib M. A., Gan S. W., Rahman M.: *J. Mater. Process. Technol.* 209, 4453 (2009).
67. Kamaraj A. B., Shrestha H., Speck E., Sundaram M.: *45th Sme North American Manufacturing Research Conference (NAMRC 45)*, 478 (2017). DOI: 10.1016/j.promfg.2017.07.032
68. Manukyan N., Kamaraj A., Sundaram M.: *47th Sme North American Manufacturing Research Conference (NAMRC 47)*, str. 197 (2019). DOI: 10.1016/j.promfg.2019.06.139.
69. Daryadel S., Behroozfar A., Morsali S. R., Moreno S., Baniyasi M., Bykova J., Bernal R. A., Minary-Jolandan M.: *Nano Lett.* 18, 208 (2018).
70. Kumar V. S., Sundaram M.: *Proc. Inst. Mech. Eng., Part E* 232, 23 (2018).
71. Sundaram M., Kamaraj A. B., Lillie G.: *19th CIRP Conference on Electro Physical and Chemical Machi-*

- ning, str. 227 (2018). DOI: 10.1016/j.procir.2017.12.053
72. Arenholz E., Švorčík V., Kefer T., Heitz J., Bauerle D.: *Appl. Phys. A* 53, 330 (1991).
73. Kamaraj A. B.: *PhD. práce. Study of Localized Electrochemical Deposition for Metal Additive Manufacturing*. University of Cincinnati, USA 2018.

D. Haluška, O. Lyutakov, and V. Švorčík
(*Department of Solid State Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*):
Electrochemical Deposition of Micro- and Nanostructures of Any Shape

Meniscus-confined electrochemical deposition (MCED) is a promising method for the fabrication of micro- and nanostructures with high precision and resolution. The success of MCED depends on the optimization of several parameters, including duty cycle, voltage, frequency, electrolyte concentration, anode movement speed,

anode shape, electrolyte circulation, and additives. Porosity, structure, hardness, yield strength, and composition are the critical factors that determine the quality of deposited structures. This article summarizes the effects of various factors on the outcome of the MCED process, which involves controlled deposition of voxels to create an object. Optimizing these parameters can lead to high-quality structures with good resolution and size. The article points out the relationship between these factors and the resulting properties of the deposited object, which may be useful for future research in this area. It also points to different types of approaches for the preparation of these structures through electrochemical additive manufacturing (ECAM) and its detailed mechanism.

Keywords: 3D printing, micro- and nanostructures, electrodeposition, additive preparation, MCED

Acknowledgements

The authors thank the GA CR for the financial support for their scientific work in project no. 23-05197S.

O SÍLE PAŇDŽÁBSKÉHO ASFALTU

MICHAL JURÁŠEK^a, JOSEF CABALKA^b a PAVEL DRAŠAR^a

^a Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Nové Kounice 37, 364 71 Bochoř, Česká republika
michal.jurasek@gmail.com, drjc@mybox.cz, drasarp@vscht.cz

Došlo 25.5.23, přijato 19.6.23.

Mumio (šiladžít), hmota podobná asfaltu či pryskyřici, která vytéká ze skal během horkých slunných dní většinou v jeskyních v Himálaji, je známá jako medicínální substance východní medicíny. Pozvolna je přijímána západním léčitelstvím, ale i medicinou. Obsahuje zejména fulvové kyseliny, humíny, humové kyseliny a radu dalších látek. Článek shrnuje zejména recentní informace o této substanci.

Klíčová slova: shilajit, mumijo, rasájana, biologická aktivita, vlastnosti, fulvokyseliny, fulvové kyseliny

Shilajit (čti šiladžít; psáno též shilajeet, šilājatu) v sanskrtu शिलाजीत neboli mumijo (mumio, moomiyo, mumia), latinsky *Asphaltum punjabianum*, je většinou černohnědá hmota podobná asfaltu či pryskyřici, která vytéká ze skal během horkých slunných dní, většinou v jeskyních v Himálaji, v nadmořských výškách mezi 1000–5000 m, od Arunáčalpradéše na východě po Kašmír na západě. Nachází se také v jiných zemích, např. v Afghánistánu, Antarktidě, Bhútánu, Číně, Nepálu, Pakistánu, Severovýchodní Africe, Tibetu a dnešní Ruské federaci, nejvíce ceněný je dnes Kirgizský shilajit. Ve východní medicíně se má za to, že zpomaluje stárnutí a podporuje omlazení organismu, čímž naplňuje požadavek ajurvedické medicíny na zařazení mezi rasájany (रसायन, raný ajurvedský termín související s prodlužováním délky života a posilováním těla). Podobně jako u maralího kořenu¹ na jeho léčivé vlastnosti poukázala asijským lovcům zvěř, která shilajit vyhledávala a olizovala. Původ mumia není zcela jasný, ale podle dnešního názoru to jsou organické pozůstatky fauny a flóry, které se vzájemně v průběhu

tisíciletého přirozeného procesu promísily a spojily s anorganickými skalními minerály².

Shilajit, látka opředená mnoha pověrami, uváděná např. i Avicennou, Aristotelem a dalšími (mj. na léčení kašle, anginy, migrén, epilepsie, zlomenin, dislokace, poliomyelitidy, ochrnutí obličeje, otrav, tuberkulózy, vředů a zánětlivých onemocnění)³, je stále velmi populární a ve formě doplňku stravy jej prodávají u nás i renomované lékárny. Nicméně, jako cokoliv, co je na prodej a čeho je málo, je shilajit zhusta porušován a dokonce je za něj vydáváno téměř kde co; na místě je zde pečlivá analýza a kontrola kvality⁴. Je nutno podotknout, že jeho složení je proměnlivé, záleží na místě sběru, a tudíž má i proměnlivé biologické vlastnosti, a to od nuly až po „zázrak“. Balastní „šedé“ literatury a informací kolem této látky je velmi mnoho a nestojí za citování. Nicméně Chemical Abstracts Service uvádí o tomto materiálu 298 časopiseckých sdělení, 187 patentů, 33 přehledů a 6 záznamů klinických studií, poněkud více z našeho století.

Pokud se podíváme na ony zmíněné klinické studie, je zaznamenáno, že studie z roku 2020 ukázala, že orální konzumace mumia po operaci zlomeniny holenní kosti by mohla být slibnou možností pro zkrácení doby hojení⁵. Výsledky studie z roku 2019 prokázaly, že 8 týdnů suplementace mumiem podpořilo zachování maximální svalové síly po únavném cvičení a vyvolalo příznivé adaptace svalové a pojivové tkáně⁶. Práce z téhož roku poskytla důkazy, které prokazují, že perorální suplementace shilajitem u dospělých zdravých žen indukovala geny relevantní pro migraci endoteliálních buněk a růst krevních cév a zlepšila mikroperfuzi kůže⁷. Léčba shilajitem, podle studie z roku 2016, významně zvýšila hladiny celkového testosteronu, volného testosteronu a dehydroepiandrosteronu (DHEA) ve srovnání s placebem. Úroveň gonadotropních hormonů (LH a FSH) zůstaly nezměně-

Obr. 1. Shilajit (*Asphaltum punjabianum*)

ny⁸. Studie z roku 2016 poskytla důkaz, že perorální suplementace shilajitem u obézních lidských subjektů s nadváhou/třídy I podporovala adaptaci kosterního svalstva prostřednictvím upregulace genů souvisejících s extracelulární matricí, které řídí svalové mechanotransdukční vlastnosti, elasticitu, opravy a regeneraci⁹. Studie z roku 2009 prokázala spermatogenní účinek shilajitu u oligospermických pacientů tak, jak je popisováno v ajurvédské medicíně¹⁰. Dále se dá shrnout, že shilajit má antiulcerogenní, antidiabetické, anxiolytické, imunomodulační, antialergické, analgetické, neuroprotektivní, antimykotické, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Dále je uváděna i jeho aktivita podporující kognitivní a paměťové funkce¹¹.

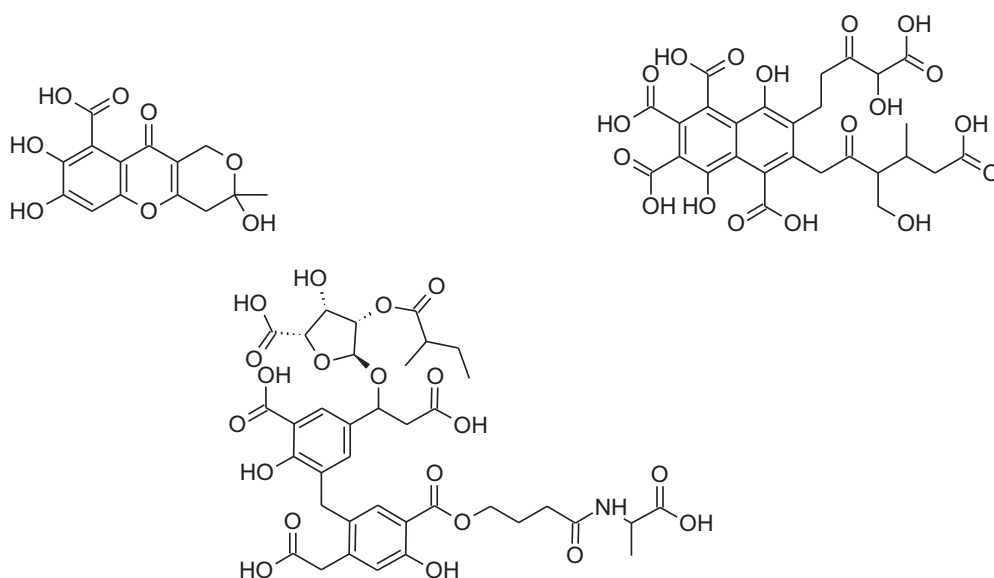
Současná literatura uvádí použití shilajitu jako nutraceutika v prevenci Alzheimerovy choroby¹² a kognitivních poruch¹³ mj. souvisejících se stářím¹⁴. Shilajit byl a je používán samotný, ale i jako komponenta, v orientální medicíně pro obecné fyzické posilování, proti stárnutí, pro stabilizaci cukru v krvi, pro omlazení močových cest, pro zvýšenou účinnost fungování mozku, pro omlazení ledvin, pro posílení imunitního systému, na artritidu, hypertenzi a také pro léčbu mnoha dalších chorob¹⁵. Shilajit byl studován jako chemoterapeutikum na rakovinu močového měchýře¹⁶. Byl použit ve formě antimikrobiálního hydrogelu k hojení poranění¹⁷. Byl ale zaznamenán i případ fyzickou námahou indukované anafylaxe po požití shilajitu¹⁸ a případ pseudohyperaldosteronismu po jeho požití během těhotenství¹⁹.

Bakalářská práce²⁰ uvádí řadu dalších biologických aktivit, včetně ochrany před ionizujícím zářením. Práce je však natolik zmatečná, že se některé uvedené údaje nedají ověřit ani podle citací.

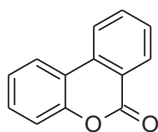
Český klub skeptiků Sisyfos uvádí, že údaje o léčivých vlastnostech shilajitu jsou nevěrohodné², neboť nejsou podepřeny klinickými studiemi; zřejmě jim lze doporučit, aby se zajímali o soudobou lékařskou literaturu. Výše uvedené výsledky klinických studií potvrzují oprávněnost zařazení shilajitu mezi rasájaný, mj. jak pro posílení oligospermických pacientů, tak pro zvýšení koncentrace testosteronu a hormonu mládí²¹.

Jakkoli je shilajit směs řady látek, má v Chemical Abstracts Service svoje registrační číslo 12040-71-0. Na trhu s chemikáliemi jej lze zakoupit přibližně za 1 USD/g, v lékárně poněkud dražší. Mumio, očištěné od příměsí a extrahované, má podobu tmavě hnědě zbarvené homogenní hmoty, elastické konsistence, s lesklým povrchem, s osobitým aromatickým pachem a nahořklou chutí. Specifická hmotnost je 2–2,5 kg dm⁻³, teplota tání ca 80 °C, pH 0,5% vodného roztoku 6,7–7,0 se stáním zvyšuje na 7,5. Při uskladnění mumio postupně tvrdne v důsledku ztráty vlhkosti. Je snadno rozpustné ve vodě (1/8), málo rozpustné v 95% ethanolu (1/4500) a etheru (1/7000) a téměř nerozpustné v chloroformu²².

Podívejme se blíže na složení. Primární složkou shilajitu jsou biologicky aktivní fulvové kyseliny (používáme progresivní názvosloví²³ místo výrazu fulvokyseliny) o molekulové hmotě 700–2000 Da tvořící min. 60 % shilajitu a oxidované dibenzo- α -pyrony, tvořící ca 0,3 % (cit.²⁴). Mezi další složky můžeme uvést huminy, humové kyseliny, fytofenoly, aromatické karboxylové kyseliny (benzoová, hippurová, ellagová), organické kyseliny, aminokyseliny, peptidy (mono-, di-, tripeptidy), proteiny mezi nimi albuminy, lipidy, fosfolipidy, mastné kyseliny, triterpeny, minerální látky a vodu²⁵. Před potravinářským a medicínálním použitím je nutno přírodní materiál přečiš-



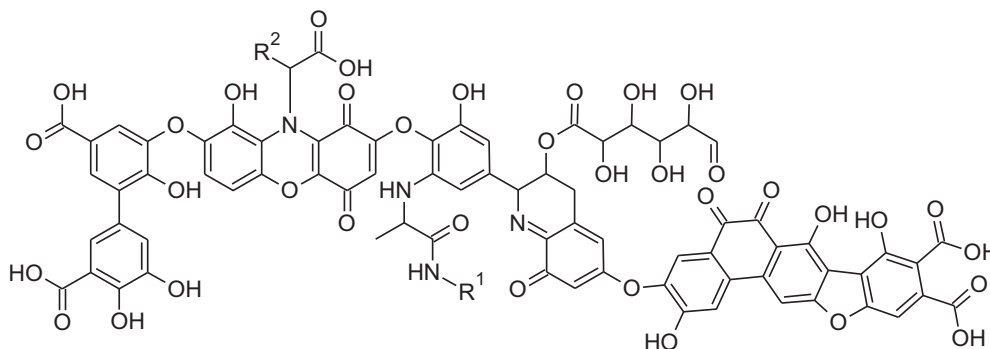
Obr. 2. Různé představy o struktuře fulvových kyselin dle cit.^{33–35}

Obr. 3. Dibenzo- α -pyron (6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on)

tit, na což je popsána řada postupů²⁶. International Humic Substance Society (IHSS) na svých stránkách²⁷ přináší komplexní analytická data a vzorky pro huminové látky, které by bylo možno k charakterizaci a identifikaci využít.

Fulvové kyseliny (od lat. *fulvus*, žlutý, angl. fulvic acids (substances) CAS RN 308066-67-3) jsou žlutohnědou frakcí huminových látek (složitých vysokomolekulárních polycyklických sloučenin jako nepřilíš uspořádaná síť aromatických organických polymerů s mnoha karboxylovými skupinami (COOH). Tyto kyseliny snadno disociují a vážou kovové ionty). Mají relativní molekulovou hmotnost v rozmezí několika stovek až desítek tisíc Daltonů (cit.²⁸). Pocházejí zřejmě z ligninu a jsou rozpustné jak v kyselém, tak v bazickém prostředí. Humové kyseliny (někdy řazené mezi allomelaniny²⁹, angl. humic acids CAS RN 1415-93-6) mohou být charakterizovány jako nepřilíš uspořádaná síť aromatických polymerů s různou kyselostí a reaktivitou³⁰, jsou to černohnědé huminové látky o molekulové hmotě pět tisíc až sto tisíc Daltonů, rozpustné v alkalických roztocích, avšak nerozpustné v kyselinách, i ty jsou schopny vázat kovové ionty. Huminy jsou všechny ostatní nerozpustné hnědočerné huminové látky přítomné v půdní organické hmotě, které nemůžeme převést do roztoku žádnou acidobazickou úpravou^{23,31,32}.

Recentní přehled³⁶ přináší souhrn ukazující, že fulvové kyseliny mohou působit jako imunitní modulátor, ovlivňovat redoxní stav a potenciálně ovlivnit zdraví střev. Je popsáno, že fulvové kyseliny snižují prozánětlivé markery, ale také aktivují imunitní systém k zabíjení bakterií. Ukázalo se, že snižují oxidační stres a dokonce vyvolávají apoptózu v liniích rakoviny jater. Dále pak fulvové kyseliny také ovlivňují mikrobiom a možná zlepšují funkci střev.

Obr. 4. Představa struktury huminové kyseliny podle cit.³⁷, jiné představy viz cit.³¹

va. Zdá se, že fulvové kyseliny mají, pokud jde o tyto fyziologické stavy, efekt Yin-Yang. Při vysoké dávce a špatném podávání se však může projevit i jejich toxicita.

Opět, jako u jiných prostředků tradiční medicíny Orientu^{38,39}, musíme být opatrní a neodmítnout výsledky lékařského výzkumu mající za sebou tisíciletou tradici jenom proto, že nezapadají do „škatulek“, které jsme si při modelování lékařských a přírodních jevů vytvořili my, v našem tradičním pojetí. Ano, opatrnosti je třeba například u orientální alchymie, i když i ta poskytla naší současné chemii leckterý základ. Na straně druhé, zkušenosti s přírodními drogami a jejich medicínám využitím jsou, třeba i pro takové „západní“ instituce jako National Institutes of Health, Bethesda, MD, jehož odborníci sbírají rady kofenárek a šamanů z celé zeměkoule, velmi užitečné ve výzkumu nových léků. A k malé osvětě by měla posloužit i série našich článků, jako např.^{40,41}.

LITERATURA

- Jurášek M., Opletal L., Harmatha J., Sláma K., Drašar P.: Chem. Listy 115, 595 (2021).
- Heřt J.: *Stručný výkladový slovník českých skeptiků*. Český klub skeptiků Sisyfos, <https://www.sisyfos.cz/clanek/870-mumio>, staženo 22. 6. 2022.
- <https://www.blackresin.com/shilajit-resins-middle-eastern-history/>, staženo 22. 6. 2022.
- Binitha R. R. V., Mahadevan S., Rosamma M. P., Rajesh K. S.: J. Pharm. Sci. Innovation 8, 189 (2019).
- Sadeghi S. M. H., Hosseini Khameneh S. M., Khodadoost M., Hosseini Kasnavieh S. M., Kamalinejad M., Gachkar L., Rampp T., Pasalar M.: J. Altern. Complementary Med. 26, 521 (2020).
- Keller J. L., Housh T. J., Hill E. C., Smith C. M., Schmidt R. J., Johnson G. O.: J. Int. Soc. Sports Nutr. 16, 1 (2019).
- Das A., El Masry S. M., Gnyawali S. C., Ghatak S., Singh K., Stewart R., Lewis M., Saha A., Gordillo G., Khanna S.: J. Am. Coll. Nutr. 38, 526 (2019).
- Pandit S., Biswas S., Jana U., De R. K., Mukhopadhyay S. C., Biswas T. K.: Andrologia 48, 570 (2016).

9. Das A., Datta S., Rhea B., Sinha M., Veeraragavan M., Gordillo G., Roy S.: *J. Med. Food* 19, 701 (2016).
10. Biswas T. K., Pandit S., Mondal S., Biswas S. K., Jana U., Ghosh T., Tripathi P. C., Debnath P. K., Auddy R. G., Auddy B.: *Andrologia* 42, 48 (2009).
11. Carrasco-Gallardo C., Guzmán L., Maccioni R. B.: *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2012, 674142.
12. Calfio C., Gonzalez A., Singh S., Rojo L. E., Maccioni R. B.: *J. Alzheimer's Dis.* 77, 33 (2020).
13. Maccioni R. B., Calfio C., Gonzalez A., Luttgies V.: *Biomolecules* 12, 249 (2022).
14. Sharma J.: *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 9, 2054 (2020).
15. Malik N., Masand S., Keshav J., Mohapatra S.: *World J. Pharm. Res.* 9, 455 (2020).
16. Kloskowski T., Szeliski K., Krzeszowiak K., Fekner Z., Kazimierski L., Jundzill A., Drewa T., Pokrywczynska M.: *Sci. Rep.* 11, 22614 (2021).
17. Zandrea O., Ngwabebhoh F. A., Patwa R., Nguyen H. T., Motiei M., Saha N., Saha T., Saha P.: *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* 607, 120952 (2021).
18. Losa F., Deidda M., Firinu D., Di Martino M. L., Barca M. P., Del Giacco S.: *World J. Clin. Cases* 7, 623 (2019).
19. Stavropoulos K., Sotiriadis A., Patoulis D., Imprialos K., Dampali R., Athyros V., Dinas K.: *Gynecol. Endocrinol.* 34, 1019 (2018).
20. Šmídová H.: *Průzkum aplikací huminových kyselin v medicíně a kosmetice. Bakalářská práce.* Vysoké učení technické v Brně, Brno 2010; https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=27101, staženo 3. 8. 2022.
21. Jurášek M., Stárka L., Drašar P.: *Chem. Listy* 116, 113 (2022).
22. <https://cs.wikipedia.org/wiki/Mumio>, staženo 22. 6. 2022.
23. Drašar P., Kozler J., Paleta O.: *Chem. Listy* 117, 581 (2023).
24. Ghosal S.: US6440436 (2002).
25. Orlov Yu. A., Orlov S. Yu., Sakalova K. L.: RU2164411 (2001).
26. Bugaev F., Kompantsev D., Pogrebnyak L.: *J. Res. Pharm.* 23, 697 (2019).
27. <https://humic-substances.org/>, staženo 26. 6. 2022.
28. Pivokonský M.: *Koagulate při úpravě vody.* Academia, Praha 2020.
29. The Merck Index, Monograph Number 4771, Merck, Whitehouse Station 2001.
30. Encyclopædia Britannica, Inc.; <https://www.britannica.com/>, staženo 26. 6. 2022.
31. Skokanová M., Dercová K.: *Chem. Listy* 102, 262 (2008).
32. Fremrová L.: ČSN ISO 6107-5 (75 0175), část 5 (2010).
33. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4514278.html>, staženo 22. 6. 2022.
34. Stevenson F. J.: *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions.* Wiley, New York 1994.
35. Veselá L., Kubal M., Kozler J., Innemanová P.: *Chem. Listy* 99, 711 (2005).
36. Winkler J., Ghosh S.: *J. Diabetes Res.* 2018, 5391014 (2018).
37. Stevenson F. J.: *Humus Chemistry.* Wiley, New York 1982.
38. Jurášek M., Opletal L., Kmoníčková E., Drašar P.: *Chem. Listy* 115, 363 (2021).
39. Bejček J., Spiwok W., Kmoníčková E., Ruml T., Rimpelová S.: *Chem. Listy* 115, 4 (2021).
40. Jurášek M., Drašar P.: *Chem. Listy* 115, 468 (2021).
41. Jurášek M., Rybka A., Opletal L., Drašar P.: *Chem. Listy* 116, 668 (2022).

M. Jurášek^a, J. Cabalka^b, and P. Drašar^a
 (^a*Department of Chemistry of Natural Substances, University of Chemistry and Technology, Prague,* ^b*Nové Kounice, Bochov, Czech Republic*): **On the Strength of Punjabi Asphalt**

Mumio (shilajit), a substance similar to asphalt or resin that oozes from rocks during hot sunny days, mostly in caves in the Himalayas, is known as a medicinal substance in Eastern medicine. It is slowly being accepted by Western healing as well as medicine. It mainly contains fulvic acids, humic acids and a number of other substances. The article mainly summarizes recent information about this substance.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: shilajit, mumijo, rasayana, biological activity, properties, fulvic acids

ELEKTROANALÝZA INSULINU NA NANOKOMPOZITNÍCH ELEKTRODÁCH

Tento článek je součástí seriálu *Ženy v české chemii**

LIBUŠE TRNKOVÁ a IVETA TRÍSKOVÁ

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika
175126@mail.muni.cz

Došlo 17.3.23, přijato 14.7.203.

Článek si všímá posledních prezentovaných prací s problematikou elektrochemické detekce insulinu a předkládá kritický pohled na výzkum a vývoj jeho elektrochemických neenzymových senzorů. Monitoruje vliv experimentálních podmínek na insulinový oxidační signál a zamýšlí se nad katalytickými efekty nanočástic či nanokompozitů deponovaných na površích elektrochemického snímače.

Klíčová slova: insulin, tyrosin, elektrochemie, senzor, nanočástice, nanokompozit, modifikované povrchy



Prof. RNDr. Libuše Trnková, CSc. (*25. 9. 1947) působí na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity (MU) více jak 50 let. V letech 1965–1970 studovala na MU (tehdy ještě UJEP) chemii a fyziku se zaměřením na výuku, a když se v roce 1972 uvolnilo místo asistenta na Katedře teoretické a fyzikální chemie (KTFCH), neváhala a konkurz vyhrála. Během prvních dvou let obhájila rigorózní práci (RNDr.), za dalších 11 let kandidátskou práci (CSc.) a v roce 2000 habilitační práci (doc.). Jmenovaná profesorkou byla v roce 2017, a to v oboru fyzikální chemie. Náplní její vědecko-výzkumné práce je (a) studium elektrodových procesů biologicky významných látek (nukleové kyseliny, oligonukleotidy, proteiny a jejich složky) na rtuťových a grafitových elektrodách, (b) rozvoj a aplikace moderní elektrochemické metody – eliminační voltametrie (EVLS – Elimination Voltammetry with Linear Scan) a (c) charakterizace i tvorba nových modelových systémů pro popis polarizovaného mezifázi elektroda/elektrolyt a dějů, které se na tomto rozhraní odehrávají. Je autorkou více jak 250 publikací v renomovaných mezinárodních časopisech s h indexem 44. **Za celoživotní přínos k rozvoji elektroanalytické chemie jí byla v roce 2018 udělena Cena firmy Metrohm.**

Dlouhodobé působení na KTFCH a od roku 2007 na Ústavu chemie v sobě odráží bohatou pedagogickou činnost Libuše Trnkové, počínaje laboratorními cvičeními a semináři z fyzikální chemie až po přednášky z biofyzikální chemie, elektroanalýzy, elektrodové kinetiky a metod chemického výzkumu. V Laboratořích biofyzikální chemie a elektrochemie (LABIFEL) probíhají nejen laboratorní cvičení z pokročilých analytických metod, ale i výzkum v rámci bakalářských, diplomových a disertačních prací.

Z mimouniverzitních aktivit Libuše Trnkové lze zmínit její dlouhodobé působení v Brněnském filharmonickém sboru Beseda brněnská (BFS BB), kde zastává funkci místopředsedkyně sboru; stará se nejen o propagaci sboru, ale i o organizaci jeho koncertů doma a v zahraničí. Kromě hudby a zpěvu se zajímá o historii a ráda cestuje.

* Tento příspěvek je součástí seriálu *Ženy v české chemii*, jenž představuje ku příležitosti každoročních významných celosvětových svátků – Mezinárodního dne žen a dívek ve vědě (11. únor) a Mezinárodního dne žen (8. březen) – úspěšné ženy působících v české chemii. Článek vznikl na pozvání redakčního kruhu a jeho výjimečně větší stránkový rozsah byl na přání autorek, vzhledem k jedinečnosti představeného tématu a jeho podrobného zpracování, umožněn.



RNDr. Mgr. Iveta Třísková, Ph.D. (*7. 6. 1986) absolvovala v roce 2010 magisterské studium v oboru Analytická biochemie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Ve své diplomové práci, kterou vypracovala pod vedením Dr. Marty Farkové, navázala na bakalářskou práci a věnovala se potenciometrickému studiu protonačně-deprotonačních rovnováh purinových derivátů, zejména benzylaminopurinu. Výsledky diplomové práce následně rozšířené o voltametrickou studii byly v roce 2012 publikovány a staly se tak podkladem pro rigorózní práci, která byla v roce 2012 úspěšně obhájena. V roce 2014 ukončila doktorské studium v oboru Fyzikální chemie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Ve své disertační práci, kterou vypracovala pod vedením prof. Libuše Trnkové, se věnovala elektrochemickému studiu krátkých oligonukleotidů nejen na rtuťové kapkové elektrodě, ale i na pevných elektrodách, a to především na polymerní pentelkové elektrodě. Ve své práci využila klasickou voltametrickou metodu cyklickou voltametrii nebo voltametrii s lineární polarizací elektrody, doplněnou o eliminační voltametrii s lineárním scanem (EVLS). Základy této metody na MU položila a o její další vývoj se zasloužila právě její školitelka prof. Libuše Trnková. **Dosažené výsledky v rámci jejího doktorského studia byly v letech 2011 a 2012 oceněny Cenou ředitele Ústavu a v roce 2014 obdržela Cenu děkana. V roce 2015 obdržela Cenu Metrohm za nejlepší publikaci mladého elektroanalytického chemika do 35 let.** Elektrochemickému výzkumu na pevných grafitových elektrodách, stejně tak jako dalšímu rozvoji eliminační voltametrie se věnuje dodnes. V poslední době se její výzkum zaměřil i na elektrochemickou studii aminokyselin a proteinů, a to zejména insulinu. Je školitelkou a konzultantkou bakalářských a diplomových prací s elektrochemickou tematikou. Je autorkou/spoluautorkou 27 publikací v mezinárodních impaktovaných odborných časopisech. Ve svém volném čase se věnuje především rodině.

Obě autorky (IT a LT) se podílely na akreditaci nového studijního oboru – Biofyzikální chemie – a její výuce se jak v základních, tak i v pokročilých kurzech intenzivně věnují. Autorky také každoročně organizují konferenci (Workshop of Biophysical Chemists and Electrochemists), které se zúčastňuje velký počet studentů s možností soutěžit o tři ceny firmy Metrohm ČR v oblasti biofyzikální chemie a elektrochemie a také o Cenu Emila Palečka za nejlepší práci v oblasti bioelektrochemie. Loni se uskutečnil již 22. ročník a od letošního roku se bude tato akce konat střídavě v Brně na MU a na Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského.

Obsah

1. Úvod
2. Insulin a diabetes mellitus
3. Současný stav analýzy insulinu
4. Elektrochemický proces insulinu a tyrosinu
5. Neenzymové elektrochemické senzory pro stanovení insulinu
6. Poznatky našich experimentů
 - 6.1. Vliv modifikovaných elektrodových povrchů
 - 6.2. Vliv chloridů
 - 6.3. Vliv pH, iontové síly a koncentrace insulinu
 - 6.4. Nativní a denaturovaný stav insulinu v elektrochemické detekci
 - 6.4.1. Tepelná denaturace insulinu
 - 6.4.2. Chemická denaturace insulinu
7. Závěr

1. Úvod

Cílem článku je představit zapojení elektrochemie do výzkumu významného proteinu, jako je insulin. Jedná se o relativně malý hormonální protein tvořený jednapadesáti aminokyselinami, který ve výzkumu proteinů často zastupuje modelový systém. Na základě jeho struktury se odvíjí i jeho elektrochemická aktivita. Základní elektrochemický protokol obecně staví na elektroaktivitě zkoumané látky

a v případě proteinů, pokud se nejedná o metaloproteiny, je tento protokol závislý především na redoxní aktivitě jednotlivých aminokyselin. Tuto aktivitu lze předpokládat u pěti aminokyselin, z nichž dvě obsahují atomy síry, L-cystein nebo jeho dimer L-cystin (Cys) a L-metionin (Met), a tři z nich jsou sice bez atomu síry, ale nesou ve své molekule postranní aromatický řetězec: L-tyrosin (Tyr), L-tryptofan (Trp), L-histidin (His)¹. Dalo by se očekávat, že všechny tyto aminokyseliny jsou v insulinu přítomné, ale není tomu tak. Insulin překvapivě neobsahuje Met a Trp a z elektrochemických studií vyplývá, že za oxidační odezvy insulinu jsou zodpovědné především Tyr. Protože molekula insulinu obsahuje celkem čtyři tyrosiny, otázkou zůstává, které jsou z nich oxidovány. Při hledání odpovědi na tuto otázku se však musíme podívat na vyšší strukturu insulinu, protože elektroda se chová jako elektrochemická čočka a tyrosin by měla vidět. Je také možné, že si elektroda svým nábojem a chemickým složením insulinu k oxidačnímu procesu připraví, třeba změněným nábojem, denurací nebo vazbou na danou látku v chemicky modifikovaném povrchu elektrody. Proto rozšířený elektrochemický protokol může stavět i na elektrochemické aktivitě látek, které umožní zprostředkovaně získat citlivý a selektivní senzor prostřednictvím vazebné interakce s protilátkou, aptamerem, specifickým ligandem (biosenzor) nebo prostřednictvím katalyzátoru, jako je např. nanočástice nebo nanokompozit.

2. Insulin a diabetes mellitus

Po mnoho let hraje insulin klíčovou roli v rozvoji chemie peptidů, farmakologie, buněčného signalizování a strukturní biologie². Tento polypeptidický hormon, produkovaný β -buňkami lokalizovanými v malých kulovitých strukturách nazývaných Langerhansovy ostrůvky slinivky břišní^{3,4}, reguluje hladinu glukosy v krvi a zajišťuje její hladinu v normálních mezích (3–8 mmol l⁻¹)⁵. Normální hladina insulinu v krvi nalačno je nižší než 25 mIU l⁻¹ (0,86 ng l⁻¹; 0,15 nmol l⁻¹)⁵. Dysfunkce produkce insulinu způsobuje různé formy syndromu diabetu (diabetes mellitus, DM), celosvětově nejběžnějšího a nejnákladnějšího metabolického onemocnění⁶. Lékařské údaje poukazují na to, že v roce 2030 bude na světě diabetem postiženo více než 422 milionů lidí a stane se tak sedmou nejčastější příčinou úmrtí. Podle statistik Světové zdravotnické organizace nyní trpí cukrovkou v České republice více než jeden milion obyvatel a např. v USA je diabetických pacientů na počet obyvatel více jak deset procent. Nedávno, v souvislosti s pandemií Covid-19, byl DM uznán jako závažný rizikový faktor nepříznivého průběhu a smrtelných následků tohoto virového onemocnění. Enzymové senzory pro glukosu, komerčně využívané k diagnostice diabetu, vykazují určité nevýhody vyplývající ze závislosti enzymové aktivity použitého enzymu na teplotě, vlhkosti a pH (cit.⁷). Navíc je třeba poznamenat, že tak jako hladina insulinu, tak i hladina glukosy v krvi může kolísat v závislosti na životním stylu.

3. Současný stav analýzy insulinu

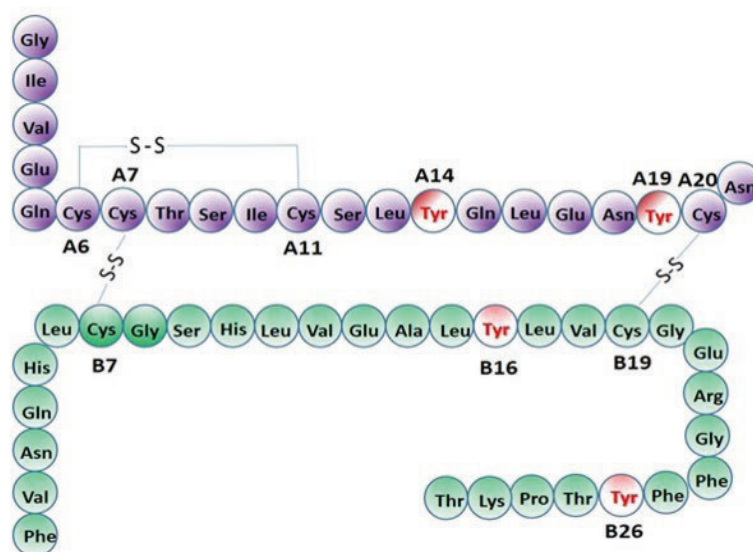
Vzhledem k závažnosti tohoto velice rozšířeného onemocnění je stanovení insulinu v diagnostice diabetu velmi důležité⁸. Zpočátku navržené postupy pro sledování koncentrací insulinu byly však málo citlivé, navíc i velmi náročné na realizaci⁹, a proto bylo nezbytné zaměřit se na vývoj levného, citlivého a selektivního insulinového senzoru¹⁰. V současné době využívané analytické postupy zahrnují metody bioanalýzy, především imunoanalýzy (EIA, RIA, LIA)^{11–13}. Jejich nevýhodou je však dlouhotrvající analýza a často nedostatečná citlivost¹⁴, kterou lze však zvýšit derivatizací insulinu pomocí izotopů a florigenních značek⁵. Další využívané metody, založené na chromatografii (HPLC)^{15,16}, kapilární elektroforéze (CE)¹⁷, jsou náročné nejen na instrumentaci, ale i na dlouhotrvající předpřípravu¹⁸. V poslední době je detekce insulinu diskutována v souvislosti s průtokovou injekční analýzou¹⁹ a s elektrochemickými metodami²⁰. Elektrochemické metody jsou považovány za jedny ze slibných metod pro stanovení insulinu, díky nenáročnosti na instrumentaci a čas, a díky poskytnutému nízkému limitu detekce. Toto tvrzení zaznává v mnoha publikacích, ale velmi často je to přání otcem myšlenky (*Libenter homines id, quod volunt, credunt*), protože jedním z největších problémů elektro-detekce je interference a znečištění povrchu senzoru složkami analyzovaného reálného vzorku. Na druhé straně je třeba poznamenat, že elektrochemické metody, které položily základ pro kon-

strukci biosenzorů, mohou být hlavními ukazateli DM, ať už se jedná o enzymové, neenzymové, elektrochemické, optické, neinvazivní biosenzory anebo biosenzory s nepřetržitým monitorováním⁹. Jsou využívány při stanovení glukosy, kde se však detekční limity pohybují řádově téměř v milionkrát vyšších hodnotách než v případě insulinu.

V posledních letech byl zaznamenán také pokrok ve vývoji nanobiosenzorů využívajících různé nanomateriály (např. nanočástice kovů, magnetické nanočástice, nanovlákná, nanodrátky, nanokompozity, kvantové tečky, uhlíkové nanotrubičky, grafen)⁹. Specificita katalytického nebo afinitního biosenzoru závisí na vazebné reakci. Zatímco pomocí katalytického biosenzoru lze stanovit změnu koncentrace analytu, pomocí afinitního biosenzoru je sledována jeho vazebná aktivita²¹. Biosenzor je považován za analytické zařízení slibující lepší komunikaci našeho těla s prostředím a reakci na něj, což vede ke zlepšení péče o pacienty díky včasné diagnostice a léčbě onemocnění²². Biosenzor je definovaný jako samostatné integrované zařízení poskytující přesná kvantitativní nebo semi-quantitativní analytická data s využitím biorekogniční složky²³. Pro jeho realizaci je vyvíjeno velké množství technik a spojení biosenzoru s vysoce afinitními biomolekulami vede ke stanovení významných látek, jako je glukosa a insulin⁹. Navzdory pokroku a neustálému výzkumu a vývoji ve výrobě biosenzorů pro glukosu^{24–31}, vývoj biosenzorů pro insulin je však stále pozadu⁹ a to platí především v případě elektrochemických senzorů, kterým je na rozdíl od biosenzorů v tomto článku věnována pozornost.

4. Elektrochemický proces insulinu a tyrosinu

Jak již bylo naznačeno, elektrochemický výzkum proteinů se zabývá pěti redoxně aktivními aminokyselinami (AMK) (tryptofan, tyrosin, histidin, methionin a cystein), které mohou poskytnout kvalitativní a kvantitativní informace o studovaném proteinu s ohledem na jeho změny ve struktuře, tvorbu a degradaci dimerních a multimerních struktur. Insulin je složen ze dvou peptidových řetězců, řetězce A (21 AMK) a řetězce B (30 AMK), které jsou spolu spojeny dvěma disulfidovými vazbami (obr. 1)^{2,4}. Jedna disulfidická vazba je umístěna v řetězci A na pozicích 6–11. Řetězec A lze oddělit od řetězce B redukčními činidly při takových experimentálních podmínkách, aby došlo k přerušení disulfidických vazeb mezi A7–B7 a A20–B19 (denaturace). Biochemický a lékařský výzkum ukazuje, že tři kratší oblasti řetězce A (1–3; 12–17; 19) a jedna delší oblast s aminokyselinovou sekvencí od pozice 8 do 25 v řetězci B jsou nezbytné pro správnou funkci insulinu. Z hlediska elektroaktivity jsou důležité nejen disulfidové vazby, které lze redukovat a insulin se následně ocitne v denaturované formě, ale také dva histidiny a čtyři tyrosiny. Ne každá publikace má správně uvedenu primární strukturu insulinu a v mnoha publikacích na tuto nesrovnalost neupozornili ani jejich oponenti. Bohužel se velmi často stává, že následující autor opíše nesprávnou insulinovou strukturu a chyba se stále opakuje.

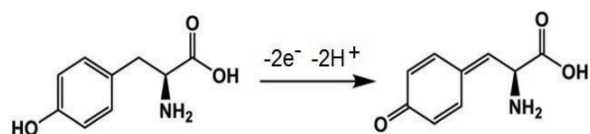


Obr. 1. **Primární struktura lidského insulinu** (tyrosiny jsou vyznačeny červeně). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

Přímá a účinná elektrochemická oxidace insulinu je pro vývoj rychlého a citlivého insulinového elektrochemického senzoru velmi důležitá³². Je obecně známo, že nejpoužívanějším elektrodovým materiálem je uhlík³², ať už se jedná o elektrody ze skelného uhlíku (glassy carbon electrodes, GCE)³³, tištěné uhlíkové elektrody (screen printed carbon electrodes, SPCE)³⁴, pentelkové grafitové elektrody (PeGE)³⁵, nebo uhlíkové pastové elektrody³⁶. Pentelkové grafitové elektrody mají ve srovnání s ostatními uhlíkovými elektrodami řadu výhod, a to nízkou pořizovací cenu, tedy širokou dostupnost, snadnou možnost modifikace³⁷ a dobře definovanou plochu elektrody¹⁵. Co se týká chemických a elektrochemických vlastností, pentelkový uhlík má vysokou chemickou a tepelnou odolnost, překvapivě nízký kapacitní proud a velmi rychlý přenos náboje^{38–40}. I když je uhlík považován za jeden z nevhodnějších materiálů, studie ukázaly, že přímá oxidace insulinu na nemodifikovaných elektrodách je limitována především dvěma nedostatky: pomalá kinetika jeho oxidačního procesu a povrchové znečištění elektrody, což způsobuje nižší citlivost, horší reprodukovatelnost a stabilitu senzoru v lineárním rozsahu insulinových koncentrací^{32,41}. Z tohoto důvodu byly vítány povrchové modifikace elektrod, a to především prostřednictvím nanočástic a nanokompozitů, umožňujících stanovení insulinu ve stopových i v ultrastopových koncentracích^{32,33,41–47}. Návrh insulinového neenzymového senzoru často čerpá z výhod zesílených elektrostatických interakcí (kladně nabitý polymer nebo membrána vůči záporně nabitému insulinu), zvětšeného povrchu senzoru (nanočástice nebo uhlíkové nanotrubičky, CNT) a efektivní katalýzy (nanočástice kovů nebo kovových oxidů, Me_xO_y).

První průzkumy redoxního chování insulinu byly realizovány na povrchově upravených elektrodách ze skel-

ného uhlíku pokrytých chitosanovým filmem (CHIT) a mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT), jež oproti nemodifikovaným elektrodám poskytovaly stabilní insulinové signály. GCE/CHIT/MWCNT elektrody tak byly použity pro zkoumání elektrooxidačních procesů insulinu a také k amperometrickému stanovení insulinu. Pro charakterizaci anodického procesu byly provedeny pH studie elektrochemické oxidace insulinu na MWCNT elektrodách a ukázalo se, že zvyšující se pH roztoku oxidaci insulinu usnadňuje. Závislost potenciálu oxidace insulinu na pH vykazovala směrnici rovnou -61 mV, což nepřímo vyjadřovalo elektrodový proces s poměrem počtu H^+ iontů k počtu elektronů rovným 1. Toto chování lze vysvětlit předpokladem, že oxidační proces zahrnuje redoxně aktivní tyrosinové zbytky přítomné v molekule insulinu. Pokud se podíváme na elektro-oxidaci volné aminokyseliny tyrosinu, pak zjistíme, že změna nastává na hydroxyly dle rovnice $-\text{C}-\text{OH} \rightarrow -\text{C}=\text{O} + \text{H}^+ + \text{e}^-$. Výsledky voltametrické studie insulinu a volného tyrosinu na GCE/CHIT/MWCNT ukázaly na podobnost polohy anodického signálu insulinu a volného tyrosinu na potenciálové ose (kolem $0,7$ V)⁴⁸, což podpořilo tvrzení, že oxidační proces insulinu na GCE/CHIT/MWCNT zahrnuje tyrosinové zbytky přítomné ve struktuře insulinu. Produkt elektrolýzy insulinu byl také testován, a to pomocí hmotnostní spektrometrie, elektronové paramagnetické rezonance a separačních metod (gelová elektroforéza, HPLC). Bylo navrženo, že ztráta čtyř hmotnostních jednotek po oxidaci insulinu na GCE/CHIT/MWCNT by mohla být způsobena tvorbou dvou intramolekulárních dityrosinových můstků^{32,41}. Pro bližší pochopení oxidačního procesu insulinu je nutné seznámit se s oxidačním mechanismem volného tyrosinu, který do dnešní doby není úplně vyjasněn. Před zhruba 30 lety bylo navrženo schéma oxidace tyrosinu

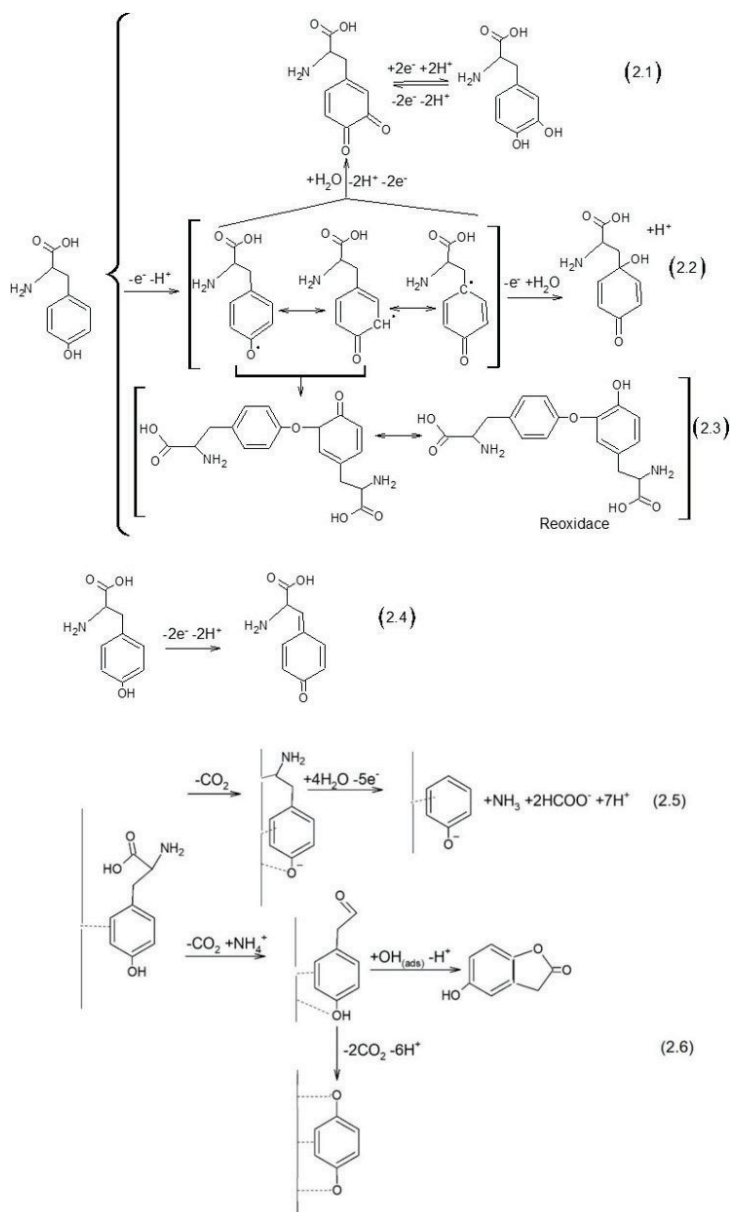


Obr. 2. Schéma elektro-oxidace tyrosinu

a v literatuře je stále uváděn zjednodušený oxidační mechanismus Tyr (obr. 2)^{1,49}.

Na základě literárních podkladů Dourado a spol.⁵⁰ navrhuje podrobnější oxidační mechanismus L-Tyr

(obr. 3). Mnoho autorů se shodlo na tom, že bez ohledu na elektrodový materiál dochází nejdříve k oxidaci fenolické skupiny v molekule L-Tyr (cit. 51–55), avšak přesný mechanismus oxidace a konečný produkt měnící se v závislosti na experimentálních podmínkách je sporný. Některé publikace využívající spektroskopické techniky jako např. FTIR na kovových elektrodách^{56,57} se přiklání k variantě, že nejdříve dochází k dekarboxylaci molekuly a následně k oxidaci aminoskupiny. Jiní autoři předpokládají, že procesy oxidace aminoskupiny a dekarboxylace molekuly proběhnou zároveň⁵⁷ (reakce 2.6). Většina prací, která předpokládá prvotní oxidaci fenolické skupiny, navrhuje její oxidaci na keton v jediném kroku^{52–55} (reakce 2.1, 2.2 a 2.4), někteří však považují za konkurenční krok polymere-

Obr. 3. Možná schématická reprezentace tyrosinové oxidace (upraveno podle⁵⁰)

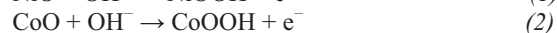
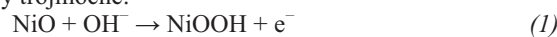
rizaci⁵² (reakce 2.3). Na základě jistých experimentů se též předpokládá, že oxidace fenolické skupiny bude probíhat ve dvou $1e^-$ krocích s aromatickým radikálovým meziproduktem. Tato částice může být díky hybridizaci oxidována na jiném uhlíku za vzniku molekuly se dvěma ketoskupinami⁵¹ (reakce 2.1). Publikace využívající spektroskopické techniky ukázaly, že velmi důležitým faktorem pro proces oxidace je adsorpce, a to bez ohledu na kyselé (reakce 2.6)⁵⁷ či alkalické prostředí (reakce 2.5)⁵⁶. V kyselých prostředích byla důležitá role adsorpce pozorována díky rozdílným voltamogramům zaznamenaným na polykrystalické a monokrystalické platinové elektrodě. Intenzita proudu v oblasti vylučování vodíku se mění, což naznačuje, že místa pro adsorpci jsou obsazena jinými částicemi, a dochází tak k posunu v oblasti tvorby oxidu Pt (cit.⁵⁷). „Geometrie“ této adsorpce může také objasnit, proč by mohla být usnadněna oxidace karboxylové skupiny; možná díky tomu, že by molekula měla být orientována $-COOH$ skupinou k povrchu elektrody, stejně tak jako celý fenolický kruh. Po těchto oxidačních krocích, se však mezi autory objevují opět neshody. Ogura a spol. předpokládali, že konečným produktem bude fenol⁵⁶, zatímco Zinola a spol. navrhuje více komplexní cestu, kde C_α je oxidován na keton a jeho pozdější oxidace generuje chinon, který se následně re-oxiduje na *para*-derivát. Podle našich zkušeností se proces oxidace tyrosinu může značně lišit v závislosti na elektrodozem materiálu. Je však důležité mít na paměti, že v každém případě má tento proces mnoho podobností⁵². Rozdíl mezi elektrodami by měl být vztažen ke zvýšení či snížení pravděpodobnosti dekarboxylace aminokyseliny⁵⁰.

Variabilita v tyrosinové oxidaci je tedy bohatá a jistě bude záviset nejen na povrchové chemii a morfologii elektrody, ale i na pH, iontové síle, rozpouštědle a na složení základního elektrolytu. Navíc je třeba si uvědomit, že zde prozatím hovoříme o volném tyrosinu a ne tyrosinu vázaném v molekule proteinu. Nejvhodnější chemie a morfologie povrchů elektrod pro citlivou a selektivní detekci insulinu se stále hledá a pro mnoho prací se stala základem elektroda ze skelného uhlíku pokrytá chitosanem (elektrostatická interakce) s uhlíkovými nanotrubičkami (zvětšení povrchu a podle nás i možné hydrofobní interakce). GCE/CHIT/MWCNT elektrody vykazují při potenciálu 0,7 V a fyziologickém pH detekční limit kolem 30 nmol l^{-1} , relativně vysokou citlivost ($135 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$), lineární dynamický rozsah v rozmezí od 100 nmol l^{-1} do $3 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ a vysokou provozní a dlouhodobou stabilitu. I když se tyto upravené elektrody staly prvními slibnými elektrochemickými senzory pro insulin⁵², tak výzkum oxidačního chování insulinu na různě modifikovaných uhlíkových elektrodách se neustále vyvíjí.

5. Neenzymové elektrochemické senzory pro stanovení insulinu

Jak už bylo uvedeno, insulin je jedním z obtížněji stanovitelných analytů (pomalá elektro-oxidace) a vyžaduje katalýzu, často realizovanou pomocí nanočástic kovů

nebo kovových oxidů. Arvinte A. a spol. v roce 2010 představili elektrochemický senzor pro detekci insulinu využívající CNT-NiOCoO/Nafion modifikované uhlíkové tištěné elektrody (SPGE), umožňující oxidativní detekci insulinu ve vodných roztocích s fyziologickým pH s dobrou citlivostí ($22,57 \text{ } \mu\text{A mg}^{-1} \text{ ml}^{-1}$)⁴⁷. Tento nanokompozit byl připraven spojením komerčně dostupného nanoprášku (označeného NiCoO₂) v roztoku Nafionu (jako kotevní pojivo) s CNT (zvýšení povrchu) velikosti v různých hmotnostních poměrech. Jelikož materiály založené na oxidu kovu, využívané jako heterogenní katalyzátory, vykazují chemickou stabilitu a elektrokatalytickou aktivitu pouze v alkalickém prostředí, byla pro zvýšení odezvy zmíněného senzoru ve fyziologickém prostředí nezbytná předpříprava (pretreatment) takto modifikované SPGE v alkalickém prostředí (cyklování v prostředí 1 M NaOH v rozmezí potenciálů od $-0,2 \text{ V}$ do $+1,1 \text{ V}$). Elektrokatalytický efekt nanočástic byl popsán rovnicemi (1) a (2), které poukazují na oxidaci dvojmocných kovů na kovy trojmocné:



V zájmu zhodnocení možné interference některých běžných analytů vyskytujících se v tělních tekutinách (např. askorbová a močová kyselina) autoři sledovali amperometrické odezvy senzoru s přídavnou vrstvou Nafionu bez katalyzátoru s předpokladem repulzního efektu záporně nabitého Nafionu vůči aniontovým substancím, který zabraňuje vstupu interferující molekuly do nanokompozitu⁴⁷. Je však třeba poznamenat, že repulzní efekt nafionové membrány není stoprocentně účinný, zejména v případě askorbové kyseliny. O vlivu dalších interferentů proti znečištění (antifouling) senzoru práce nepodává žádně informace.

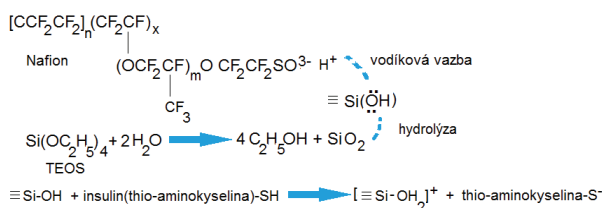
Zajímavá je práce autorů skupiny Salimiho, která pro elektrodovou modifikaci elektrody ze skelného uhlíku poprvé použila nanočástice karbidu křemíku (SiC) s výsledkem nízkého detekčního limitu insulinu ($3,3 \text{ pmol l}^{-1}$) díky amperometrické průtokové injekční analýze. Největší pozornost zasluhuje rychlá příprava senzoru bez použití mediátorů přenosu elektronů či specifických činidel a také antiadsorpční vlastnosti jeho povrchu⁵⁸. I když zmiňovaný senzor má téměř excelentní vlastnosti, tak zde není zmínka o jeho aplikaci při stanovení insulinu v reálných vzorcích; byl řešen jen efekt interference přídavnou vrstvou Nafionu, podobně jako to učinil Arvinte. Je třeba poznamenat, že autoři neřeší problém elektrostatické interakce insulinu s Nafionem z hlediska jejich nábojů, neboť se dá předpokládat, že při fyziologickém pH má insulin záporný náboj⁵⁹. Podle našeho názoru je také možné, že elektrostatická repulzní interakce záporně nabitých malých molekul se záporně nabitými membránovými póry Nafionu bude mnohem větší než v případě velkých molekul, jako je insulin.

Ke slovu se dostala i uhlíková pastová elektroda (CPE), kterou použil Jaafariasl M. se svými spolupracovníky v roce 2011 a modifikoval ji silikagelem (Si-CPE). Adsorpce insulinu na povrchu takto modifikované elektro-

dy poskytovala vysokou citlivost pomocí adsorptivní rozpouštěcí (stripping) analýzy v diferenčním pulzním nebo hydrodynamickém amperometrickém režimu. Zejména hydrodynamická amperometrie ukázala větší citlivost než diferenční pulzní analýza. Klíčovou výhodou takto navrženého elektrochemického senzoru je jeho vysoká selektivita vůči insulinu i v přítomnosti aminokyselin obsahujících síru (cystin, cystein a glutathion)¹⁴. Voltametrické experimenty potvrdily akumulaci insulinu na povrchu Si-CPE a byl navržen oxidační mechanismus, který byl popsán rovnicemi bez podrobnějšího rozboru: prekoncentrace ($\equiv\text{SiOH}_{(\text{CPE})} + \text{insulin}_{(\text{roztok})} \leftrightarrow \equiv\text{SiOH-insulin}_{(\text{CPE})}$) a anodické rozpouštění (od +0,4 V do 1,2 V, $\equiv\text{SiOH-insulin}_{(\text{CPE})} \leftrightarrow \equiv\text{SiOH}_{(\text{CPE})} + \text{insulin-Ox}_{(\text{roztok})} + \text{ne}^-$).

Autoři se zabývají odpovědí na otázku, které aminokyseliny jsou zodpovědné za oxidaci insulinu. Za tímto účelem provedli elektrochemickou analýzu volných aminokyselin, které mohou být elektrochemicky aktivní (tyrosin, cystin, histidin a cystein). I když cystein a cystin oxidační odezvu neposkytovaly, což je z našeho pohledu zajímavé, oxidační signál tyrosinu a histidinu byl zaznamenán, a to při potenciálu 900 mV a 950 mV. Tímto experimentem je dokladováno, že cystin ani cystein se na oxidaci insulinu podílet nebudou a za oxidační odezvu bude zodpovědný tyrosin nebo histidin. I když navržený mechanismus zvýšené reaktivity silikagele vůči insulinu není zatím úplně vyjasněn, tak nepřítomnost odezvy cysteinu a cystinu podmiňuje již zmíněnou vysokou selektivitu senzoru vůči insulinu v přítomnosti aminokyselin obsahujících síru. Interakce insulinu se silikagelem není v práci zcela vyjasněna. Užitečnost navrženého senzoru byla testována i z hlediska jeho využití pro stanovení insulinu v injekcích.

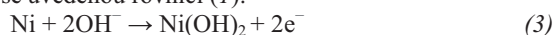
Konstrukce senzorů s využitím jejich povrchové modifikace pomocí kompozitu křemíku se stala velmi populární a také tým Aminio v roce 2014 této popularity využil pro konstrukci elektrochemického insulinového senzoru nanočástice oxidu křemíku (SiO_2NP). Nanokompozit $\text{SiO}_2\text{NP}/\text{Nafion}$ imobilizovali na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Podobně jak uvádí i předchozí práce^{47,58} (Arvinte, Salimi), Nafion zde hraje roli kotevního pojiva a zabraňuje smývání vytvořeného filmu z povrchu elektrody v průběhu elektrochemického procesu. Elektrokatalytické chování takto vyrobeného senzoru bylo sledováno pomocí cyklické (CV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) a výsledky ukázaly, že nano- SiO_2 vykazuje výraznou elektrokatalytickou aktivitu v oxidaci insulinu, a to na základě navrženého reakčního mechanismu (upraveno a opraveno nejen z publikace⁶⁰, ale i z publikace⁶¹):



Předností navrženého senzoru je skutečnost, že byl aplikován pro stanovení insulinu nejen v injekčních vzorcích, ale i v reálných vzorcích kožního potu, což je méně obvyklé; ostatní prezentované senzory tuto aplikaci vůbec neuvádí. Autoři věnují pozornost i rušivým účinkům interferujících látek (glukosa, glycin, fenylalanin, histidin, cystin a tryptofan) a pouze v případě vysoké koncentrace tryptofanu byla zaznamenána viditelná interference. Vzhledem ke stabilitě a antipasivačním vlastnostem je nově zkonstruovaný senzor $\text{SiO}_2\text{NP}/\text{Nafion}/\text{GCE}$ považován za vysoce účinný amperometrický insulinový detektor v nanomolárním měřítku⁶⁰.

Jinou modifikací uhlíkové elektrody, spočívající v elektrodepozici nanokompozitu RuOx/CNT na povrch uhlíkové elektrody a umožňující stabilní a citlivou voltametrickou a amperometrickou detekci insulinu představil v roce 2007 J. Wang se svým týmem. Jeho studie ukázala, že pokrytí elektrody pomocí nanokompozitu RuOx/CNT nabízí výrazné zrychlení oxidace insulinu ve srovnání s elektrodami pokrytými buď jen RuOx , nebo jen CNT , což je pravděpodobně důsledkem synergického zesílení účinnosti elektrodového povrchu. Překvapivý účinek modifikace pomocí nanokompozitu RuOx/CNT na oxidaci insulinu však není zatím úplně vyjasněn. I přes tento možný nedostatek práce naznačuje velký příslib pro konstrukci miniaturizovaných senzorů a detektorů pro monitorování insulinu⁴².

V roce 2016 byl Yu Y. a spol. vyroben elektrochemický insulinový senzor, využívající levné a ekologicky šetrné nanočástice niklu (NiNP)⁶². Pro modifikaci povrchu elektrody vyrobené z cínem dopovaného oxidu inditého – Indium Tin Oxide – byla využita technika iontové implantace, která spočívá v tom, že povrch materiálu se bombarduje určitými ionty ve vakuové komoře ($< 10^{-4}$ mbar, tj. 0,01 Pa) pomocí energie o rozsahu 50 až 200 keV. Ionty násilně pronikají povrchem materiálu a při četných kolizích s atomy se zastaví a ztratí svoji energii. O podmínkách tohoto procesu autoři nepiší. ITO elektroda byla vybrána jako vhodný elektrodový substrát díky širokému potenciálovému oknu a stabilním elektrochemickým vlastnostem. Výkonnost senzoru byla testována pomocí cyklické voltametrie, elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) a chronoamperometrie (CA) a takto připravená NiNP/ITO elektroda vykazovala v prostředí 0,1 M NaOH dobré detekční limity (viz tab. I). Elektrokatalytický efekt niklových nanočástic byl opět podmíněn alkalickým prostředím (cyklování v 0,1 M NaOH v rozmezí potenciálu od -1 V do $+1$ V; 30 cyklů) a popsán rovnicemi, které mají podobnost s výše uvedenou rovnicí (1):



Katalytický efekt redoxního páru $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$ na oxidační proces insulinu je vyjádřen jednoduchou rovnicí bez bližší specifikace oxidačního produktu insulinu:



Autoři věnovali pozornost interferencím vyskytujících se v tělních tekutinách běžně společně s insulinem (askorbová kyselina, močová kyselina, glukosa).

V případě, že byla studie možných interferentů provedena na úrovni pikomolární koncentrace, v souladu s požadavkem na analýzu pikomolárních koncentrací insulínu v lidské krvi, nebyly interference na NiNP/ITO elektrodě pozorovány. Jiná situace však nastala, pokud byla koncentrace interferentů oproti koncentraci insulínu $50\times - 100\times$ zvýšena; pak byla na elektrodě pozorována silná odezva interferujících substancí. Jedná se o častý problém senzorů založených na elektrokatalytickém stanovení insulínu a vyvíjí se studie vedoucí ke zmírnění možných interferencí. Autoři jako jednu z možností navrhuji využití průtokového systému⁶².

Je třeba poznamenat, že elektrokatalytický efekt nanočástic oxidu niklu pro oxidační signál insulínu poprvé zkoumal Rafiee B., který v roce 2013 vyvinul senzor využívající nanokompozit NiONP/Nafion-MWCNT (multi walled carbon nanotubes)⁶³. NiONP byly deponovány na povrch tištěné uhlíkové elektrody (SPE) dekorované uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT), kdy karboxylové skupiny na povrchu MWCNT mohou stimulovat depozici NiONP. Elektrochemické chování kompozitu NiONP/Nafion-MWCNT ve vodných alkalických roztocích insulínu bylo zkoumáno pomocí CV, CA a EIS. Rafiee vysvětluje elektrokatalytický efekt nanočástic oxidu niklu, spočívající v konverzi Ni^{II}/Ni^{III} v alkalickém prostředí (0,1 M NaOH) dle rovnice $Ni(OH)_2 \leftrightarrow NiOOH + e^- + H^+$. V přítomnosti insulínu NiONP/Nafion-MWCNT/SPE senzor reflektuje oxidační procesy probíhající ve dvou potenciálových oblastech. V první oblasti anodických potenciálů se nejdříve začínají produkovat Ni^{III} nanočástice, což je vyjádřené rovnicí: $Ni(OH)_2 \leftrightarrow NiOOH + e^- + H^+$. Následně, při vyšších potenciálech, dochází k elektrokatalytické oxidaci insulínu, dle schématu: $NiOOH + \text{insulin} \rightarrow Ni(OH)_2 + \text{produkt}$ (kolem +0,7 V) a současně k redukci Ni^{III} na Ni^{II} . Podle autorů je posledně jmenovaný proces dokladován snížením katodického signálu redukce Ni^{III} na Ni^{II} při zpětné polarizaci senzoru. Tato skutečnost by měla jasně dokazovat, že použitý modifikátor v podobě NiONP se přímo účastní elektrokatalytické oxidace insulínu, ovšem podle CV záznamů toto tvrzení není zřetelně podloženo. Předpokládá se adsorpce insulínu na tvořící se Ni^{III} (kolem +0,7 V). Adsorbovaný insulin je oxidován v chemické reakci s pomalou kinetikou a produkuje částice Ni^{II} , což se projeví poklesem katodického signálu; částice Ni^{II} pak mohou být zpětně oxidovány na Ni^{III} . Voltametrické studie ukázaly, že SPE modifikovaná filmem NiONP/Nafion-MWCNT snižuje přepětí insulínu a usnadňuje jeho oxidaci ve srovnání s nemodifikovanými SPE. Pro zhodnocení výkonnosti této modifikované elektrody byla využita také amperometrická metoda⁶³.

Na tuto práci navázala Šišoláková I. a spol.⁷ v roce 2019 a pro substrát si místo SPE zvolila pentelkovou grafitovou elektrodu (PeGE) modifikovanou nejen kompozitem NiONP/chitosan-MWCNT, ale i kompozitem NiNP/chitosan-MWCNT. Nanočástice Ni nebo NiO byly deponovány na povrch chitosan-MWCNT/PeGE pomocí pulzní voltmetrie a elektrochemické vlastnosti obou připravených senzorů byly zkoumány pomocí CV, CA a EIS

v prostředí fosfátového pufru (PBS) o fyziologickém pH simulujícím prostředí lidského organismu. Elektroda NiONP/chitosan-MWCNT/PeGE vykazovala lepší elektroanalytickou charakteristiku ve srovnání s NiNP/chitosan-MWCNT/PeGE a autoři došli k závěru, že pro elektroanalýzu insulínu vhodnějším kandidátem je pentelková tuha modifikovaná oxidem kovu než samotným kovem⁷. Nicméně detekční limity pro insulin nezasahovaly ani v případě NiONP/chitosan-MWCNT/PeGE do pikomolárních koncentrací insulínu. Překvapivé ale je, že oxidační signál insulínu je v případě modifikace NiONP zapsán až kolem 1,45 V, a v případě modifikace NiNP kolem 1,1 V, tedy v obou případech v daleko pozitivnějších potenciálech než 0,7 V, který uvádí Rafiee⁶³.

Důležitost vlivu chitosanové membrány při elektrochemické detekci insulínu na NiONP a MWCNT modifikované tištěné uhlíkové elektrodě (SPCE) je pak dále ukázána na porovnání dvou elektrochemických senzorů NiONP/MWCNT/SPCE a NiONP/chitosan-MWCNT/SPCE, kdy elektrody modifikované chitosanem vykazují širší lineární rozsah koncentrací ($0,25 \mu\text{mol l}^{-1} - 5 \mu\text{mol l}^{-1}$), nižší limit detekce, 94 nmol l^{-1} , vyšší citlivost ($0,021 \mu\text{A l} \mu\text{mol l}^{-1}$) a také lepší stabilitu oproti elektrodám bez chitosanové membrány⁶⁴. Z důvodu simulace koncentrace chloridů v lidské krvi byla detekce insulínu provedena v prostředí PBS a nežádoucí vliv chloridů na elektrochemickou detekci insulínu byl pak eliminován pomocí chitosanové membrány, která má stabilizující efekt pro nanočástice, ale pravděpodobně i odpuzující efekt pro ionty Cl^- .

Jak se tedy ukázalo a stále ukazuje, nanočástice přechodných kovů, zejména jejich oxidů, lze považovat za slibný a levný materiál pro katalýzu oxidačního procesu insulínu. Navíc kombinace nanočástic přechodných kovů s uhlíkovými nanotrubičkami, které zvětšují aktivní povrch elektrody, může zlepšit analytické vlastnosti elektrodového povrchu. Byly připraveny další dva typy elektrochemických senzorů založených na tištěných uhlíkových elektrodách modifikovaných kombinací CoNP nebo CuNP s chitosanem a MWCNT. Výsledky porovnání stability, analytické charakteristiky a selektivity obou senzorů prokázaly lepší stabilitu a analytické vlastnosti bez výrazného vlivu interferencí na stanovení insulínu v případě senzoru CoNP/chitosan-MWCNT/SPCE (cit.⁶⁵). Podobně jako CoNP a CuNP, tak i nanočástice zinku (ZnNP) vykazují elektrokatalytickou aktivitu ve stanovení insulínu. I když ZnNP/chitosan-MWCNT/SPCE má o něco lepší mez detekce (LOD, tab. I) než předchozí uvedené nanokompozitní SPCE, tak ostatní analytické parametry (tab. I) jsou podobné⁶⁶. Podle našich úvah do elektrokatalytického procesu v alkalickém prostředí vstupují nanočástice ne v podobě čistého kovu, ale v podobě jeho příslušného oxidu.

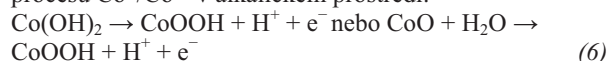
V. Singh v roce 2019 navrhnul senzorové pole, založené na SPE dekorované uhlíkovými nanotrubičkami s modifikací kvantových teček (CdSe/ZnS QD), za účelem přímé detekce pikomolárních koncentrací insulínu v jedné kapce (obr. 4). Ve fyziologickém prostředí takto vytvořené senzorové pole vykazuje limit detekce 100 pmol l^{-1}

a lineární rozsah pro pikomolární koncentrace insulinu ($100 \text{ pmol l}^{-1} - 5000 \text{ pmol l}^{-1}$)⁶⁷.

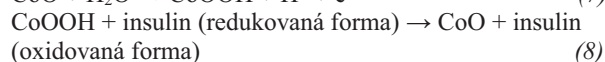
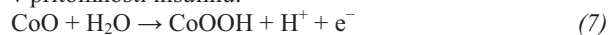
Z našeho pohledu synergický efekt konjugátu multi-stěnných nanotrubiček a kvantových teček typu c/s (core/shell) usnadňuje u oxidovatelných tyrosinových reziduí přenos elektronů. Vzniká otázka, proč je pro usnadnění přenosu elektronu výhodné používat kombinace QD a MWCNT? Dalo by se předpokládat, že oxidace kvantových teček CdSe/ZnS bude probíhat za odejmutí elektronů z valenčního pásu ZnS (shell) a ty by mohly být přijaty uhlíkovými nanotrubičkami, protože jejich Fermiho hladina leží mezi HOMO-LUMO energií (gap) kvantových teček. V tom případě by elektrony z MWCNT mohly usnadnit elektronový transfer insulinu.

Razmi H. a spol.⁶⁸ v roce 2019 představili levný a stabilní elektrochemický senzor založený na pentelkové grafitové elektrodě modifikované nanokompozitem tvořeným oxidem grafenu (GO) a nanočásticemi oxidu kobaltu (CoONP). Při přípravě senzoru byly nejdříve syntetizovány nanovrstvy oxidu grafenu (GO), a to přímo na povrchu pentelkové elektrody jako zdroji uhlíku za pomoci potenciostatické metody v prostředí kyseliny sírové, a následně byly na povrch GO modifikované PeGE deponovány nanočástice oxidu kobaltu (CoONP) za pomoci voltametrie.

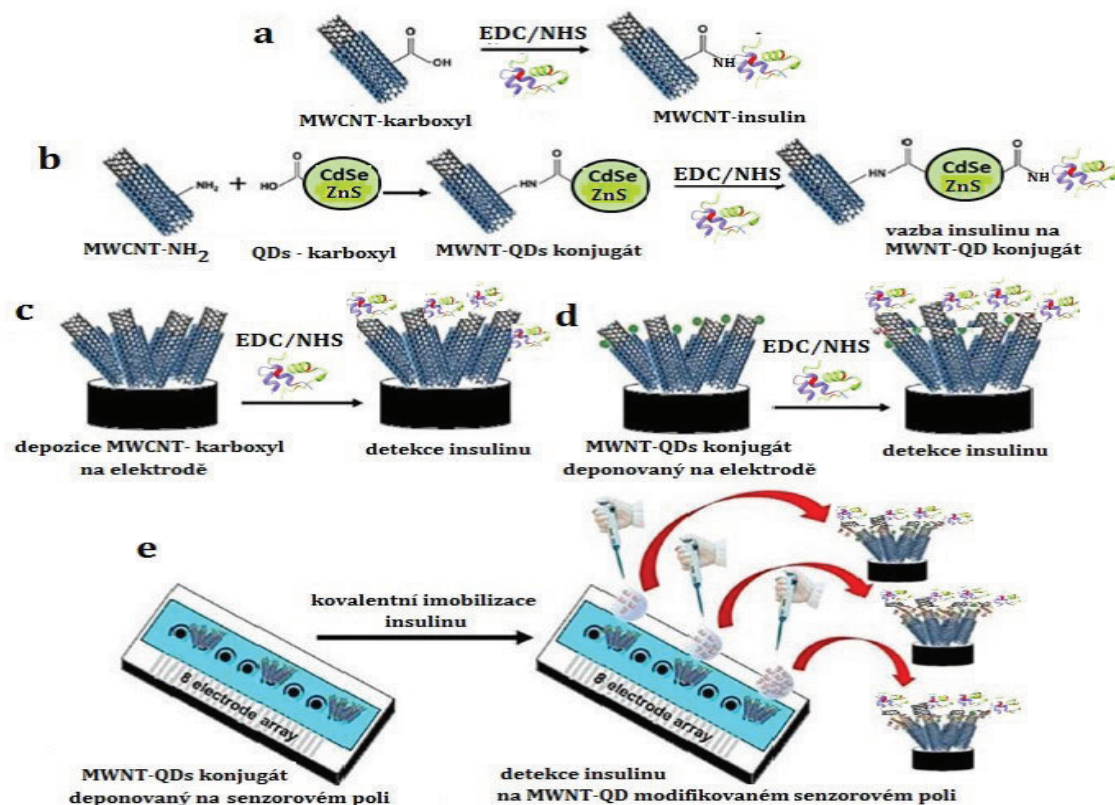
Katalytické vlastnosti CoONP/GO/PGE pomohly snížit detekční limit na subnanomolární koncentrace (LOD $0,12 \text{ nmol l}^{-1}$), zvýšit jak citlivost ($0,687 \mu\text{A l nmol}^{-1}$), tak i lineární koncentrační rozsah ($0,46 \text{ nmol l}^{-1} - 100 \text{ nmol l}^{-1}$). Odezva senzoru nebyla ovlivněna přítomností běžných biologických interferentů, jako jsou kyseliny askorbová, močová, citronová a také glukosa. Byly analyzovány tři synteticky připravené farmaceutické vzorky insulinu tří různých značek (Regular, Isophane a Lansolin) a procento výtěžnosti ($97,55-101,48 \%$) naznačuje, že navrhovaný senzor může být použit pro rutinní analýzu insulinu ve farmaceutických vzorcích⁶⁸. Díky tomu, že CoONP jsou stabilní a elektroaktivní pouze v alkalickém prostředí, byla popsána elektrokatalytická reakce odpovídající redoxnímu procesu $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$ v alkalickém prostředí:



Stejně tak byl navržen i mechanismus elektrokatalýzy v přítomnosti insulinu:



Nedávno autoři⁶⁹ vyvinuli robustní a citlivý elektrochemický insulinový senzor založený na elektroaktivních



Obr. 4. Schéma detekce insulinu pouze pomocí MWCNT (a, c) a navázání MWCNT na povrch SPE modifikované pomocí QDs (b, d). Návrh MWCNT – QD modifikovaného elektrodového pole pro detekci insulinu v jedné kapce (e), upraveno podle⁶⁷. EDC je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid; NHS je *N*-hydroxysukcinimid

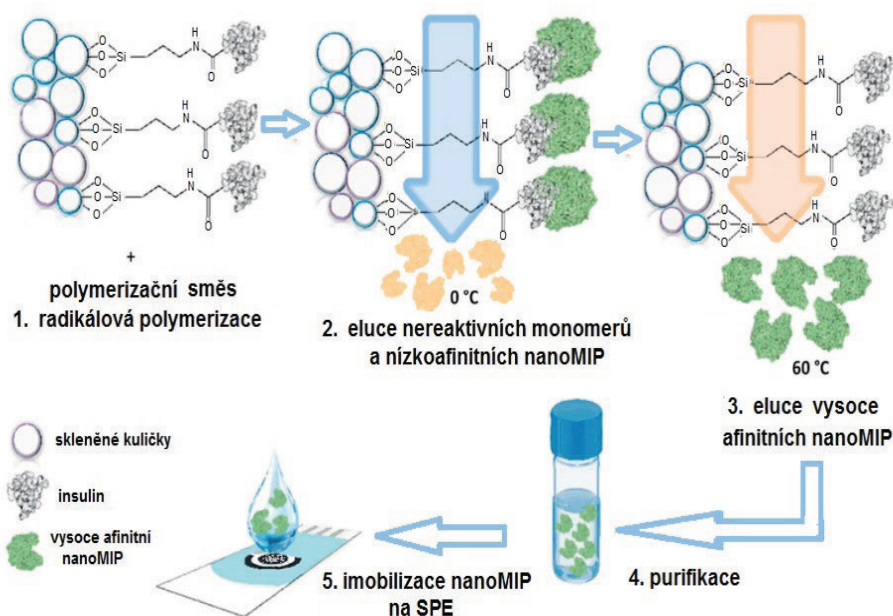
molekulárně vtištěných (imprintovaných) polymerních částicích (nanoMIP), které v polymerní matici zanechávají dutiny s afinitou pro vybranou „templátovou“ molekulu, v tomto případě insulin. NanoMIP senzor označený redoxní sondou kombinuje rozpoznávací a informační schopnosti a v podstatě nahrazuje páry seskupení enzym-mediátor využívané v klasických biosenzorech. Lze předpokládat, že nanoMIP senzor oproti biosenzoru může poskytovat vyšší stabilitu a lepší výkon v komplexních biologických vzorcích. Zajímavostí v této práci je, že nanoMIP částice byly výpočetně navrženy pomocí *in silico* mapování insulinového epitopu (antigenní determinant – konkrétní oblast antigenu, na kterou se vážou protilátky) a syntetizovány polymerací na pevné fázi (skleněné kuličky) (obr. 5). Oxidační odezva insulinu byla sledována pomocí diferenční pulzní voltametrie v klinicky relevantním rozsahu koncentrací 50 pmol l^{-1} – 2000 pmol l^{-1} . Podle autorů nanoMIP senzor díky velkému počtu rozpoznávacích míst a uzpůsobené geometrii pro insulin nabízí řadu výhod, a to především vysokou citlivost a selektivitu vůči insulinu s limitem detekce 26 fmol l^{-1} a 81 fmol l^{-1} v pufru a v lidské plazmě, potvrzující praktickou aplikaci u lůžka pacienta (point of care analysis). NanoMIP senzor vykazuje také velkou stabilitu po 168 dní, což by potvrzovalo robustnost daného senzoru⁶⁹.

Molekulárně imprintovaný polymer (MIP), který zanechává dutiny v polymerní matici s afinitou pro vybranou „templátovou“ molekulu a který mimikuje interakci zámku a klíče (lock and key) podle nás sice slibuje vysokou citlivost senzoru, ale proces imprintu je často nároč-

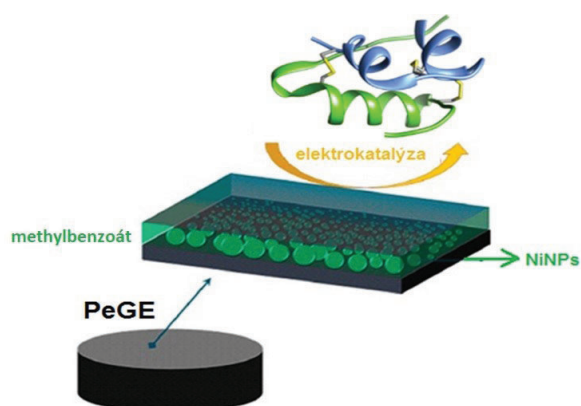
ný na reprodukovatelnost: 1) těžko kontrolovatelný proces radikálové polymerace vede ke značným odchylkám mezi jednotlivými šaržemi senzorů; 2) regenerace senzorů s MIP je často neúplná (vědecké publikace málokdy zařazují měření slepých vzorků a měří jen kalibrace od nízkých koncentrací k vysokým koncentracím a tak se může zdát, že senzor díky jisté hysterezi z předchozích měření funguje lépe, než by tomu odpovídala realita); 3) selektivita senzoru a jeho afinita k analytu bývá prakticky výrazně horší než u protilátky, výhodou může být ale aplikace MIP senzorů na analyty, pro které je produkce protilátek obtížná, např. nízkomolekulární látky.

Nedávno autoři⁷⁰ představili elektrochemický senzor pro kvantifikaci insulinu založený na modifikaci pentelkové grafitové elektrody nanočásticemi Ni (NiNP) a methylbenzoátem a testovaný pomocí cyklické a diferenční pulzní voltametrie (obr. 6). Pro nás byla překvapivá malá závislost oxidačního signálu insulinu na pH a podle našich zkušeností je třeba hodnotit nejen výšku, ale i polohu signálu. Úloha benzoátu není přesně definována, stejně jako elektrokatalytická aktivita niklových nanočástic. Krevní vzorky (lidské sérum) byly před vlastní insulinovou detekcí podrobeny precipitačnímu protokolu s ethanolom, přičemž do takto upraveného krevního séra byl následně insulin o známé koncentraci přidán. V tomto případě nelze tvrdit, že NiNP/MB/PeGE je slibným nástrojem pro detekci insulinu v biologických vzorcích, poskytující relevantní signály bez vedlejších interferencí⁷⁰.

Kamyabi M. a spol. v roce 2021 navrhli citlivý, rychlý a neenzymový elektrochemiluminiscenční (ECL) sen-



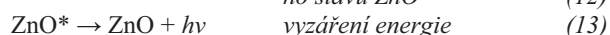
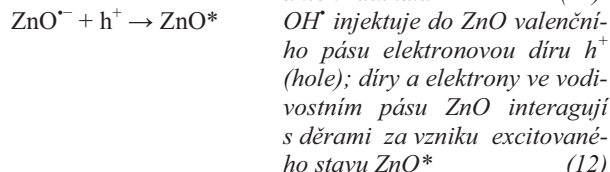
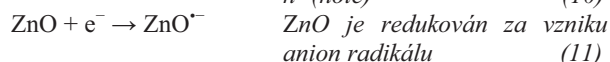
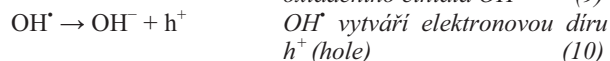
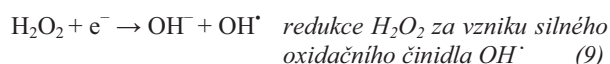
Obr. 5. Syntéza a eluce molekulárně imprintovaných nanočástic termo-elučním procesem a jejich zavedení na povrch tištěné platinové elektrody (upraveno podle⁶⁹)



Obr. 6. Schéma výroby senzoru NiNPs/(MB)/PeGE (upraveno podle⁷⁰)

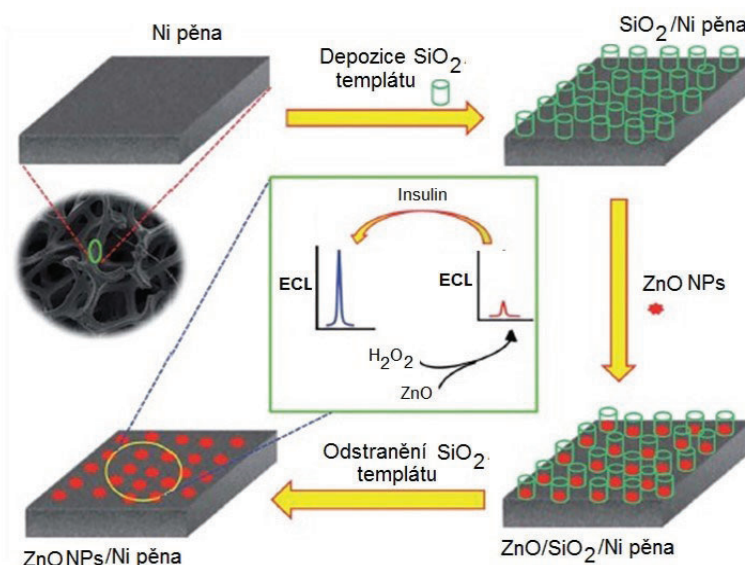
zor, založený na dekoraci niklové pěny ZnO nanočásticemi. Pro úpravu velikosti nanočástic ZnO byl použit templát oxidu křemičitého. Příprava ZnONP/Ni pěnové elektrody zde byla podrobně popsána a morfologie takto připraveného senzoru ZnONP/Ni-pěna byla charakterizována pomocí FESEM (field emission scanning electron microscopy), EDX (energy dispersive X-ray), XRD (X-ray diffraction) a EIS (electrochemical impedance spectroscopy). Elektrochemiluminiscence (ECL) senzoru ZnONP/Ni-pěna byla zkoumána v přirozeném médiu v přítomnosti H_2O_2 jako účinného ko-reaktantu. Se zvyšující se koncentrací insulinu bylo pozorováno výrazné zlepšení signálu ECL, což prokázalo zesilující účinek insulinu na ECL emisi (obr. 7).

Byl předložen pravděpodobný ECL reakční mechanismus mezi ZnONP a H_2O_2 :



V prostředí fosfátového pufru tento senzor vykazoval excelentní výkonnost při detekci insulinu v lineárním rozsahu koncentrací $3,57 \cdot 10^{-15} \text{ mol l}^{-1}$ až $2,94 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ a velmi nízký detekční limit $1 \cdot 10^{-16} \text{ mol l}^{-1}$. Navržený ECL senzor s výbornou reprodukovatelností, teplotní stabilitou a vysokou citlivostí byl využit pro stanovení insulinu v reálných vzorcích krevního séra s velmi přijatelnými výsledky⁷¹. K přesvědčivé hodnověrnosti senzoru by přispěla srovnávací studie s jiným proteinem než s insulinem.

Pro potřeby klinické diagnostiky a účinné léčby s ohledem na ekonomickou a praktickou potřebnost je nevhodnějším řešením vícerozložková analýza. Zde se nabízí simultánní analýza insulinu a glukosy. Problém je však nejen v překryvu oxidačních signálů obou analytů a ve vzájemném zapojení se do reakčních procesů, ale i ve velmi rozdílných koncentračních hladinách. A proto Zhao Y. a spol. v roce 2021 uvedli studii, v níž jsou představeny algoritmy umělé inteligence (AI), které pomáhají elektrochemickým metodám k překonání tohoto problému. Nejdříve se změní pomocí cyklické voltametrie proudové



Obr. 7. Modifikační proces výroby niklové pěnové elektrody se ZnO nanočásticemi pro ECL detekci insulinu (upraveno podle cit.⁷¹)

Tabulka I
Elektrochemické senzory insulinu a jejich stručná charakterizace

Senzor	Metoda	LOD	Linearita	Poznámka	Lit.
ZnONP/Ni pěnová elektroda	ECL	1 fM	3,57 fM – 2,94 nM	výborná reprodukovatelnost, teplotní stabilita a vysoká citlivost; využití pro stanovení insulinu v reálných vzorcích krevního séra	71
NanoMIP /SPPtE	DPV	26 fM (pufr) 81 fM (lidská plazma)	50 pM – 2000 pM	vysoká citlivost a selektivita vůči insulinu, praktická aplikaci u lůžka pacienta	69
Si/C/GCE	CV DPV amperometrie v průtoku (FIA)	3,3 pM (FIA) 20 nM (DPV)	100 pM – 600 pM (FIA) 200 pM – 600 nM (DPV)	rychlá příprava bez použití mediátorů, vysoká citlivost, výborná katalytická aktivita, stabilita	58
elektrochemie a AI (umělá inteligence) višesložková analýza insulinu a glukosy	CV machine learning	pM (insulin) a mM (glukosa)	není uvedeno	přijatelný detekční limit a přesnost, nízká cena a vysoká účinnost, s potenciálem pro využití v klinické diagnostice	72
NiNP/ITO	CV, EIS, chronoamperometrie	10 pM	100 pM – 2400 pM a 1 nM – 125 nM	potenciální biosenzor pro insulin	62
Si-CPE (silica gel modified carbon paste electrode)	DPAdSV a hydrodynamická amperometrie	36 pM (hydrodynamická amperometrie) 4,8 nM (DPAdSV; pH 2) 6,7 nM (DPAdSV; pH 7,4)	90 pM – 1400 pM (hydrodynamická amperometrie) 10 nM – 560 nM (DPAdSV; pH 2) 30 nM – 360 nM (DPAdSV; pH 7,4)	snadná příprava, vysoká reprodukovatelnost, dobrá chemická a mechanická odolnost a snadná obnovitelnost povrchu, vysoká selektivita vůči insulinu v přítomnosti aminokyselin obsahujících síru	14
MWCNT – QD/SPE elektrodové pole (CdSe/ZnS QD)	CV	100 pM	100 pM – 5000 pM	přímá detekce pikomolárních koncentrací insulinu v kapce, ve fyziol. prostředí	67
CoONP/GO/PGE	CV	0,12 nM	0,46 nM – 100 nM	rutinní analýza insulinu ve farmaceutických vzorcích	68

Tabulka I
Pokračování

Senzor	Metoda	LOD	Linearita	Poznámka	Lit.
RuOx/CNT/GCE	CV amperometrie	1 nM	10 nM – 800 nM	zlepšení citlivosti a stability senzoru v důsledku elektrokatalytické aktivity	42
Au-AgNP/GQD/GCE	CV, DPV	1,1 nM	10 μ M – 120 μ M	spolehlivý a přesný senzor pro insulin v biologických a klinických vzorcích	73
SiNP/Nafion/GCE	DPV CV	3,1 nM	10 nM – 50 nM	nano-SiO ₂ vykazuje výraznou elektrokatalytickou aktivitu k oxidaci insulinu	60
NiONP/Nafion-MWCNT/SPE	CV, chrono- amperometrie EIS	6,1 nM	20,0 nM – 260 nM	dobrá reprodukovatelnost a stabilita	63
NiNP/MB(methylbenzoát)/PGE	CV	8,30 nM	25 nM – 450 nM	spolehlivost detekce insulinu v biologických vzorcích není průkazná	70
CoNP/chitosan-MWCNT/SPCE	CV	25 nM	0,05 μ M – 5 μ M	vhodný elektrochemický senzor pro detekci insulinu	65
NiONP/chitosan-MWCNT/SPCE	CV, chrono- amperometrie EIS	94 nM	0,25 μ M – 5 μ M	vhodný elektrochemický senzor pro detekci insulinu	64
NiONP/chitosan-MWCNT/PGE	CV, chrono- amperometrie EIS	260 nM	0,05 μ M – 5 μ M	vhodný kandidát na elektro- chemický senzor pro insulin	7
CNT-NiCoO ₂ /Nafion/SPE	CV amperometrie	0,22 μ g ml ⁻¹	0,1 μ g ml ⁻¹ – 31,5 μ g ml ⁻¹	citlivá a stabilní odezva pro insulin	47
ZnNP/chitosan-MWCNT/SPCE	CV	0,23 μ M	0,5 μ M – 5 μ M	rychlý, levný a efektivní senzor	66
CuNP/chitosan-MWCNT/SPCE	CV	1,11 μ M	0,1 μ M – 4 μ M		65
NiNP/chitosan-MWCNT/PGE	CV, chrono- amperometrie EIS	4,34 μ M	1 μ M – 5 μ M		7
CNF/SPCE	CV, DPV	1,7 μ M	1 μ M – 10 μ M		74
Bi ₂ O ₃ /SPCE	CV, DPV	1,8 μ M	1 μ M – 10 μ M		

křivky insulinu, glukosy a jejich směsi, následně je extrahováno sedm typických znaků voltametrické křivky jako charakteristických hodnot pro detekci koncentrací insulinu a glukosy. Nakonec, po naučení s využitím algoritmu (strojové učení – machine learning), jsou koncentrace insulinu a glukosy odděleny (obr. 8). Celý proces tak trvá asi tři minuty. S využitím tohoto přístupu lze detekovat insulin na pikomolární úrovni a glukosu na milimolární úrovni, což splňuje klinické požadavky. K ověření výkonnosti a účinnosti navržené metody byla tato metoda využita ke stanovení insulinu a glukosy ve fetálním hovězím séru a reálných klinických vzorcích krevního séra. Výsledky jsou uspokojivé, ukazující, že tato metoda může splňovat základní klinické potřeby. Tento vícesložkový testovací systém poskytuje přijatelný detekční limit a přesnost; má přednosti v nízké ceně a vysoké účinnosti, s potenciálem pro využití v klinické diagnostice⁷².

V témže roce Wang J. představil citlivý elektrochemický senzor pro stanovení insulinu v předepsaných léčích u pacientů s diabetem 2. typu. Senzor využívá Au-Ag nanočástice a kvantové tečky grafenu (Au-Ag NP/GQD). Pro přípravu Au-Ag NP/GQD modifikované GCE elektrody (Au-Ag NP/GQD/GCE) byly syntetizovány GQD hydrotermální metodou přímo na povrch GCE a následně byly na tento povrch elektrochemicky deponovány Au-AgNP. Stanovení insulinu pomocí CV a DPV ukázalo, že lineární rozsah koncentrací, limit detekce a citlivost odpovídaly hodnotám v rozsahu $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ – $120 \mu\text{mol l}^{-1}$; $1,1 \text{ nmol l}^{-1}$ a $0,242 \mu\text{A l} \mu\text{mol}^{-1}$. Selektivita navrženého insulinového senzoru byla zkoumána ve vzorku lidského séra, a to v přítomnosti biologických látek, jako jsou thiomochovina, glukosa, methionin, cystein,

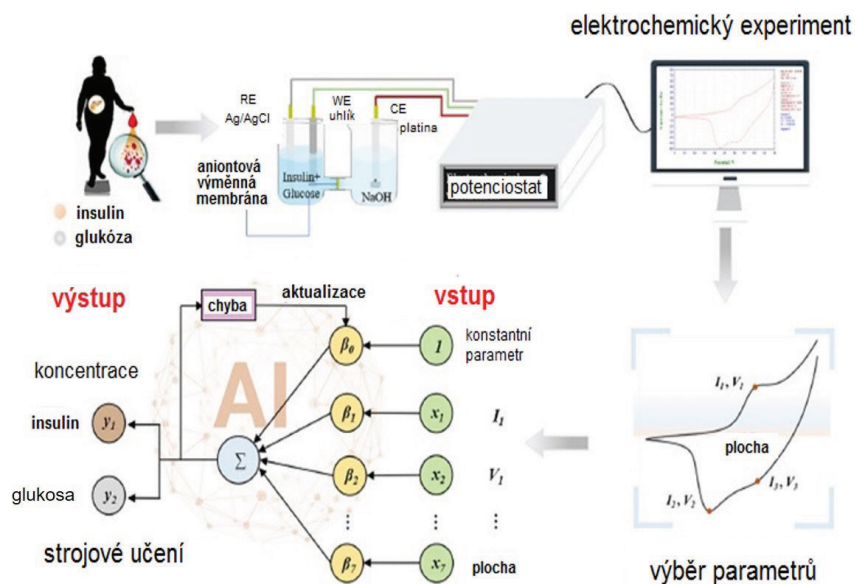
askorbová kyselina, močová kyselina a glutathion, a výsledky ukázaly, že přítomnost těchto látek stanovení insulinu neovlivňuje. Bylo by velmi užitečné rozšířit toto zjištění o podrobnější studii, proč je nanokompozit nevíšivavý k výše vyjmenovaným interferentům. Aplikovatelnost navrženého senzoru byla studována v injekcích insulinu glarginu a výsledky ukázaly přijatelné hodnoty regenerace a relativní směrodatné odchylky⁷³.

Kromě všech výše zmíněných elektrochemických senzorů se pro detekci insulinu velmi často používají i komerčně dostupné tištěné elektrody (SPCE) modifikované nanočásticemi. Naše prozatímní výsledky ukázaly, že insulin lze v jednotkách mikromolárních až stovkách nanomolárních koncentrací spolehlivě stanovit na SPCE modifikovaných uhlíkovými nanovláknky (carbon nanofibres, CNF) a nanočásticemi oxidu bismutu Bi_2O_3 . O využití těchto modifikovaných tištěných elektrod bude blíže pojednáno v následující kapitole.

6. Poznatky našich experimentů

6.1. Vliv modifikovaných elektrodoých povrchů

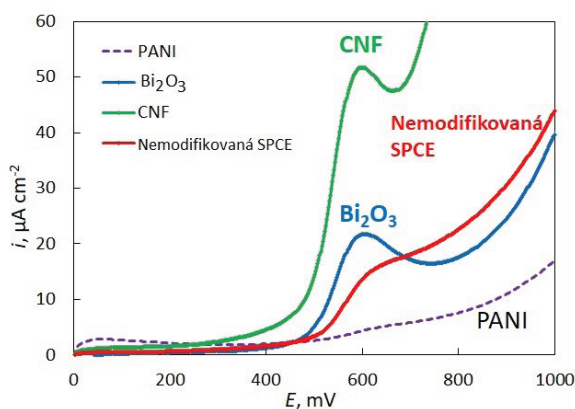
Na základě získaného vhledu do elektrochemického chování insulinu na různých typech chemicky modifikovaných senzorů, kdy citlivá detekce insulinu je většinou podmíněna katalytickým efektem nanočástic či nanokompozitů, jsme se na jedné straně dozvěděli mnoho zajímavých informací, ale na druhé straně jsme v článcích nenacházeli dostatečné vysvětlení jevů při zprostředkované elektrochemické detekci insulinu. Problém dostatečné



Obr. 8. Elektrochemická a AI (Artificial Intelligence) experimentální struktura (upraveno podle⁷²)

citlivosti a selektivity elektrochemického senzoru, různě modifikovaného nanomateriálem, lze vidět především v matici fyziologických vzorků, která obsahuje plno interferujících, často povrchově silně kontaminujících složek. Z hlediska aplikace potenciálních senzorů v klinickém výzkumu je nezbytné dozvědět se více o tom, jak se insulin v roztoku i na povrchu elektrody chová. Za tímto účelem jsme si položili několik otázek, na něž jsme se snažili najít odpověď. První otázka byla, jak je detekce insulinu podmíněna modifikovaným povrchem komerční SPCE ve fyziologickém prostředí. Na čtyřech tištěných elektrodách jsme pomocí voltametrie s lineární polarizací elektrody (linear sweep voltammetry – LSV) sledovali oxidační signál rekombinantního lidského insulinu v prostředí PBS a abychom sofistikovaně mohli komparaci signálů provést, byly proudy (I) převedeny podle plochy elektrody S na proudové hustoty ($i=I/S$). Výsledné LSV křivky jsou prezentovány na obr. 9. Voltametrie byla realizována pomocí μ Autolabu firmy Metrohm^{74–76}.

Jak je vidět z obrázku, nejnižší, skoro přehlédnutelný oxidační signál insulinu je zaznamenán na tištěné elektrodě modifikované polyanilinem (PANI); polymerní anilin v tomto fyziologickém prostředí oxidaci insulinu nepodporuje. Vzájemné porovnání intenzity oxidačních signálů pro insulin o stejné koncentraci získaných na nedomifikované elektrodě SPCE a Bi_2O_3 a CNF modifikovaných SPCE ukázalo, že správně zvolená povrchová modifikace může zněkolikanásobit citlivost detekce. I když na nedomifikované elektrodě oxidační signál insulinu je patrný, tak modifikace SPCE přispěla ke zvýšení citlivosti se stejnou energetickou synergií (potenciály jsou kolem 600 mV). Na první pohled vyšší oxidační signály na uhlíkových nanovláčkách (CNF – carbon nanofibers) než na nanočásticích Bi_2O_3 jsou ovlivněny vyšší proudovou odezvou základního elektrolytu – PBS pufru. Podobná situace se objevila



Obr. 9. LSV signály pro rekombinantní lidský insulin o koncentraci $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ na nedomifikované a různě modifikované tištěné elektrodě SPCE (oxid bismutitý, uhlíková vlákna, polyanilin) v prostředí PBS pufru (pH 7,4). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

i při použití SPCE modifikovaných grafenem (není ukázáno). Pokud by byla aplikována korekce na základní linii (base line correction), pak by byly oxidační píky insulinu na obou posledně jmenovaných elektrodách velmi podobné. Na nedomifikované SPCE je mechanismus oxidace insulinu následován dalšími reakcemi a je možné, že CNF na svém povrchu vlastní další oxidovatelné skupiny nebo ke zvýšenému proudovému pozadí přispívají přítomné chloridy. Je také možné, že v případě PANI chloridy interagují s povrchem a brání insulinu v procesu přenosu elektronů.

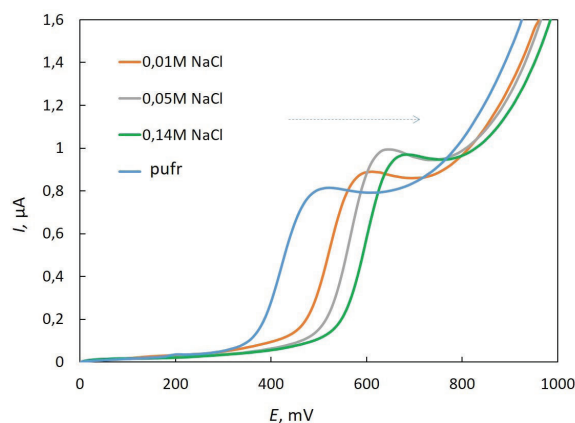
6.2. Vliv chloridů

Na základě poslední úvahy o vlivu chloridů jsme provedli experiment, který je zobrazen na obr. 10. Vliv chloridů se projevuje posunem oxidačního potenciálu insulinu do pozitivnějších hodnot oproti prostředí fosfátovému pufru, který chloridy neobsahoval.

Vliv iontů Cl^- podle našich úvah může posunout hodnotu oxidačního potenciálu insulinu prostřednictvím elektrostatické interakce, neboť insulin v prostředí pH 7,4 je záporně nabitý.

6.3. Vliv pH, iontové síly a koncentrace insulinu

Oxidační chování insulinu bylo sledováno na obou typech modifikovaných elektrod (CNF/SPCE , $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$) nejen s ohledem na koncentraci insulinu ($1\text{--}20 \mu\text{mol l}^{-1}$), ale i v kontextu podmínek okolního prostředí, jako je pH ($1,8\text{--}11,0$), iontová síla a složení pufru (PBS – phosphate buffer saline, FA – fosfát-acetát, fosfát). Vůdčí myšlenkou provedené koncentrační závislosti byla práce⁷⁷ (Pocker měřil v rozsahu pH $1,1\text{--}11,2$ a efekt pH zkoumal při koncentraci insulinu $100 \mu\text{mol l}^{-1}$), zabývající se strukturními přechody monomer/dimer, přičemž se předpoklá-



Obr. 10. LSV oxidační signály insulinu ($c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$) ve fosfátovém pufru (pH 7,4) s přidavkem různé koncentrace chloridových iontů (šipka naznačuje posun potenciálu se zvyšující se koncentrací chloridů). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

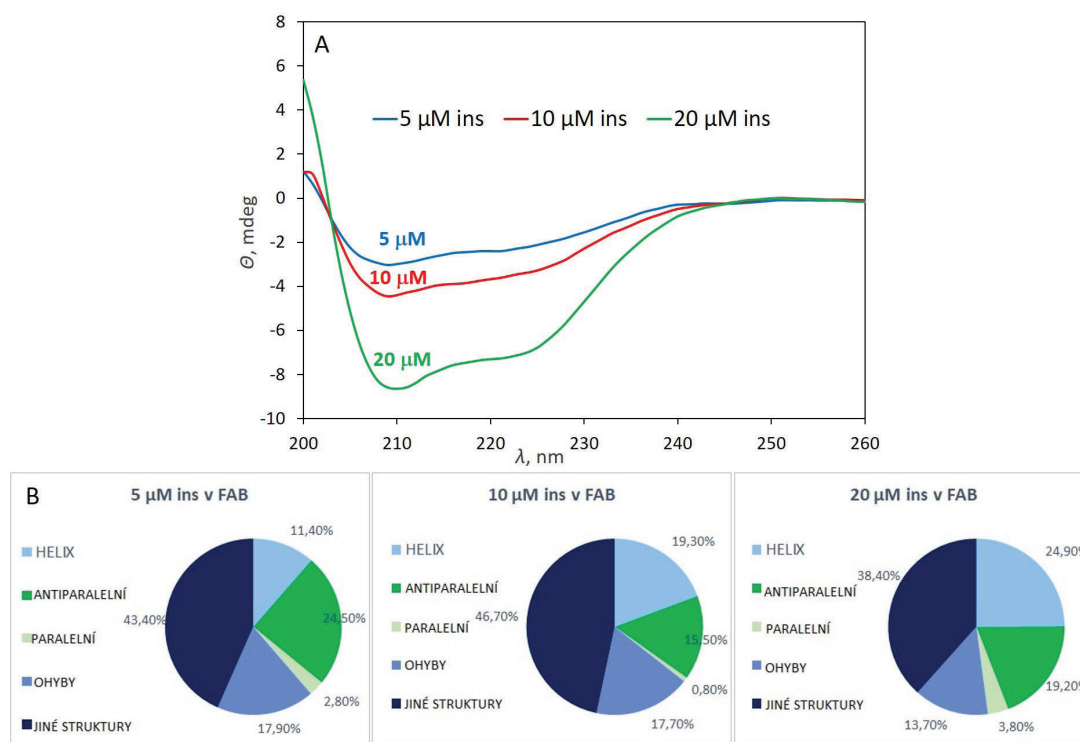
dalo, že monomerní insulin existuje při velmi nízkých koncentracích (maximálně do $2 \mu\text{mol l}^{-1}$); při vyšších koncentracích se tvoří především dimer. Jelikož tato práce hodnotí strukturální změnu nativního insulinu v závislosti na koncentraci z hlediska změny ve spektru cirkulárního dichroismu (CD), chtěly jsme se podívat, zda i elektrochemie bude schopná reflektovat strukturální přechod z monomeru na dimer v podobě viditelné změny v charakteru oxidačních signálů insulinu v důsledku měnící se koncentrace. Předpokládaná strukturální změna monomer/dimer však nebyla zatím elektrochemicky prokázána, což může být způsobeno fyziologickou hodnotou pH předpokládající přechod na monomerní strukturu bez ohledu na koncentraci insulinu⁷⁷. Na základě provedené koncentrační závislosti insulinu byla stanovena i hodnota LOD pro použité elektrodové modifikace (CNF/SPCE a $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$) ve všech pufovaných prostředích a ukázalo se, že nejnižší hodnotu LOD poskytuje CNF/SPCE ($1,20\text{--}1,76 \mu\text{mol l}^{-1}$), oproti $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$ ($1,67\text{--}1,86 \mu\text{mol l}^{-1}$)^{74–76}.

Vliv koncentrace na chování insulinu byl monitorován i z hlediska charakteru CD spekter, kdy s rostoucí koncentrací insulinu dochází ke zvýšení intenzity v CD spektru, a to ve všech pufovaných prostředích (obr. 11A). Sekundární struktura pak byla posouzena pomocí algorit-

mu BeStSel, což je webový server poskytující pro analýzu CD spekter metodu výběru beta struktury (Beta Structure Selection). Na server lze jednoduše přímo nahrát naměřená CD data (elipticita vs. vlnová délka). Originalita BeStSel spočívá v tom, že provádí podrobnou analýzu sekundární struktury, poskytující informace o osmi komponentách sekundární struktury, včetně paralelní β -struktury a antiparalelních β -listů se třemi různými skupinami stočení v prostoru^{78,79}. Z tohoto posouzení je zřejmé, že s rostoucí koncentrací dochází k poklesu zastoupení neuspořádaných struktur, zvyšuje se procentuální zastoupení β -listů, což lze právě vysvětlit posunem rovnováhy směrem ke struktuře dimeru (obr. 11B)⁷⁵.

Oxidační chování insulinu bylo sledováno i z hlediska vlivu iontové síly prostředí na obou typech modifikovaných elektrod (CNF/SPCE a $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$) v prostředí FA pufru o iontové síle $I = 0,2 \text{ mol l}^{-1}$ a $I = 0,55 \text{ mol l}^{-1}$. Vyšší iontová síla sice zvyšuje intenzitu oxidačních signálů insulinu, avšak naproti tomu samotný oxidační proces insulinu znesnadňuje (posun oxidačního signálu do pozitivnějších potenciálů), a to na obou typech modifikovaných elektrod^{74–76}.

Jelikož již dříve publikované CD spektrální studie prokázaly strukturální přechod monomer/dimer nejen vlivem koncentrace, ale i vlivem pH (cit.⁷⁷), bylo opět naším



Obr. 11. A) Vliv koncentrace insulinu (ins) v roztoku FA pufru (pH 7,4) na tvar CD spekter. B) Diagram zastoupení strukturálních uspořádání v molekule insulinu získaný z programu BeStSel. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

cílem zjistit, zda i elektrochemie bude schopna s ohledem na měnící se pH prostředí odrážet případné strukturální změny v molekule insulinu. Jinými slovy, zda bude docházet ke změně charakteru oxidačních signálů insulinu a prokáže se tak přechod z dimerní formy na formu monomerní či naopak. Bohužel ani v tomto případě existence rozlišené monomerní a dimerní struktury insulinu elektrochemicky prokázána nebyla.

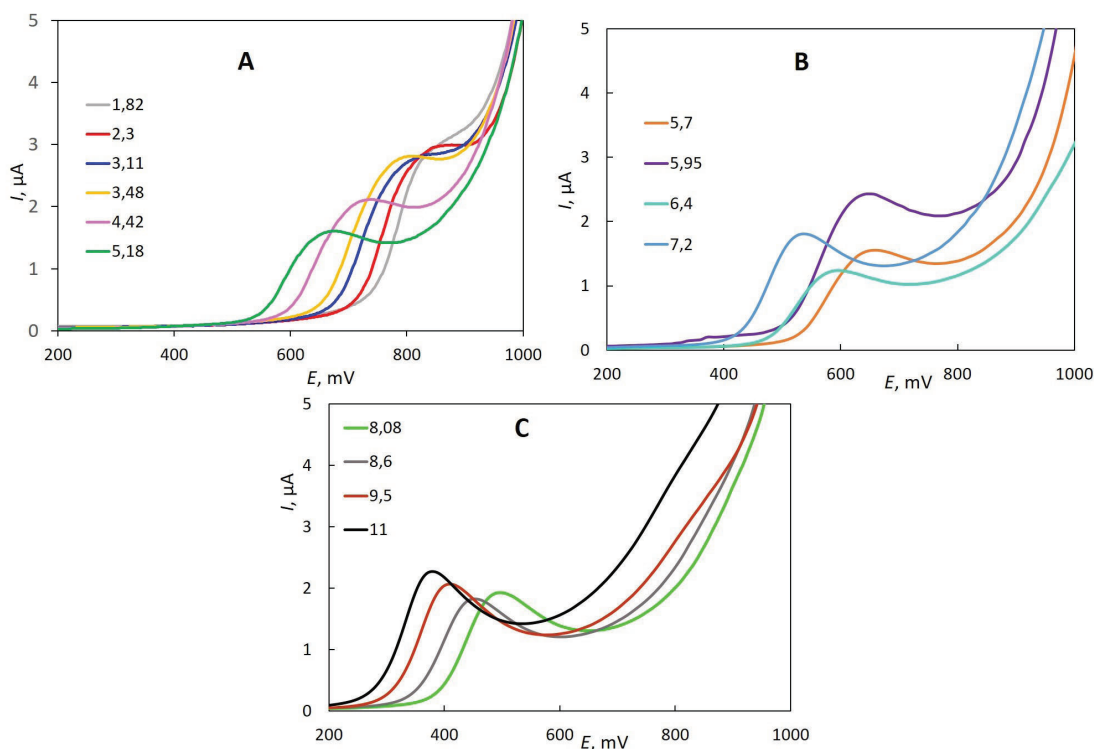
Insulin poskytoval charakteristické oxidační signály v celé škále pH (1,8–11,0) pufovaného prostředí na obou typech modifikovaných elektrod. $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$ poskytuje podobný charakter oxidačních signálů jako CNF/SPCE. Zároveň i tato provedená pH závislost potvrdila, že na CNF/SPCE probíhá méně energeticky náročný oxidační proces insulinu ve srovnání s $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$ a navíc modifikace CNF poskytla oxidační signály insulinu s vyšší intenzitou. Zajímavostí zůstává, že na rozdíl od tyrosinu, který v závislosti E_p na pH vykazuje zlomy (v souladu pak s hodnotami jeho $\text{p}K_{a1} = 2,2$; $\text{p}K_{a2} = 9,2$; $\text{p}K_{a3} = 10,46$), u insulinu žádné zlomy pozorovány nebyly a v celkové škále pH hodnot směrnice dE_p/pH odpovídala hodnotě -52 mV na jednotku pH. Tyrosin v oblasti fyziologického pH poskytoval hodnotu -57 mV na jednotku pH (cit.^{74,80}).

Pokud se pozorně podíváme na obrázky pH závislosti, tak voltametrické píky mají v kyselých a alkalických oblastech (obr. 12A a 12C) kromě postupného sledu potenciálu píků

(E_p) i postupný mírně klesající a mírně stoupající trend i ve výškách píků (I_p). Jinak se chová insulin v oblasti od jeho izoelektrického bodu ($\sim 5,7$) až do $\text{pH} \sim 7,5$ (obr. 12B), kde posloupnost v I_p je narušena. I když nebyly voltamogramy snímány na stejné elektrodě, popsany trend se opakoval a podněcoval myšlenku, že struktura insulinu může být podle jeho náboje ovlivňována nábojem i morfologií povrchu elektrody⁷⁴.

6.4. Nativní a denaturovaný stav insulinu v elektrochemické detekci

Je obecně známo, že za stabilitu nativní struktury proteinů jsou zodpovědné nejen hydrofobní interakce, ale i disulfidické můstky. Vlivem faktorů prostředí, jako je pH, teplota, ale i vlivem chemických činidel je možné tyto disulfidické můstky rozrušit, a pak hovoříme o denaturaci proteinů. Naše experimenty byly vedeny snahou odpovědět opět na zajímavé otázky. Jaká bude role disulfidických můstků a s tím související denaturační změny ve struktuře insulinu a zda bude zaznamenán redoxní proces cystein-cystin? Tepelná denaturace či chemická denaturace je známá z výsledků studií pomocí CD spekter, avšak neexistují studie, které by se na denaturační proces podívaly pod drobnohledem elektrochemie. Vzhledem k tomu, že insulin je malá molekula, tak se může velmi krátce po

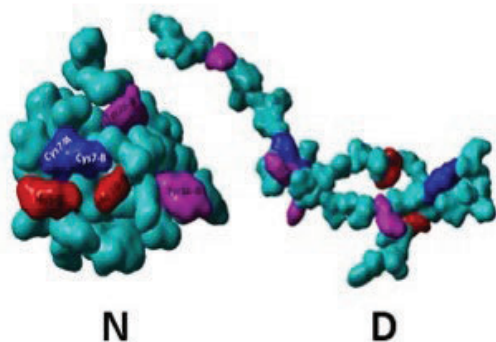


Obr. 12. LSV oxidační signály insulinu ($c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$) v oblasti kyselého (A), neutrálního (B) a alkalického pH (C) fosfátového-acetátového pufru (FA pufr; pH 1,82–10,99) na CNF/SPCE. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy; pro nebarevnou tištěnou verzi obrázku je třeba poznamenat, že zvyšující se hodnota pH posouvá oxidační signály insulinu k negativnějším potenciálům).

denaturaci opět svinout do určité náhodné konformace, která však nemusí být totožná s nativní strukturou (nepublikované výsledky).

6.4.1. Tepelná denaturace insulínu

Vlivem teploty dochází k rozrušení terciární a sekundární struktury proteinů, tedy i k rozštěpení disulfidických vazeb. Přesto, že tepelná denaturace insulínu byla podrobně studována již dříve, tak se jednalo především o CD spektrální studie či diferenční skenovací kalorimetrické (DSC) a izotermální titrační kalorimetrické (ITC) studie, umožňující navíc i vyhodnocení teploty tání insulínu (melting point, T_m) odpovídající hodnotě 68 °C (cit.⁸¹). Naproti tomu nejsou známy literární zdroje, které by tepelnou denaturaci insulínu posuzovaly z hlediska elektrochemie. Naše experimenty prokázaly, že i elektrochemické metody jsou schopny detekovat rozdíl mezi nativní a denaturovanou formou insulínu, a to na základě rozdílné intenzity oxidačního signálu insulínu. Předpokládali jsme, že intenzita (tedy výška) oxidačních signálů insulínu nám může zodpovědět otázku, kolik molekul tyrosinu se bude na oxidačním procesu podílet a zda v průběhu denaturace došlo k úplnému rozvinutí struktury insulínu se všemi čtyřmi molekulami tyrosinu přístupnými elektrodě. Důležitým předpokladem pro úplné rozvinutí řetězce do lineární podoby je existence nativního insulínu v monomerní formě. Právě v tomto případě je zde zajištěn jasný přechod nativní (N) / denaturovaná forma (D), jak naznačuje i simulovaný YASARA (Yet Another Scientific Artificial Reality Application; dostupné z <http://www.yasara.org/>) model (obr. 13). Studie provedené pomocí molekulové dynamiky ukázaly, že v nativní struktuře insulínu jsou dvě molekuly tyrosinu lokalizovány uvnitř struktury a dvě jsou exponované na povrchu, a tudíž se mohou významně podílet na oxidačním signálu insulínu. V případě denaturace insulínu a rozpletení řetězce do lineární formy lze očekávat dvojnásobný nárůst oxidačního signálu, z důvodu zpřístupnění všech čtyř molekul tyrosinu.



Obr. 13. YASARA model pro nativní a denaturovanou formu insulínu. Tyrosiny jsou v barvě fialové, cystein-cystin v barvě modré a histidin v barvě červené. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

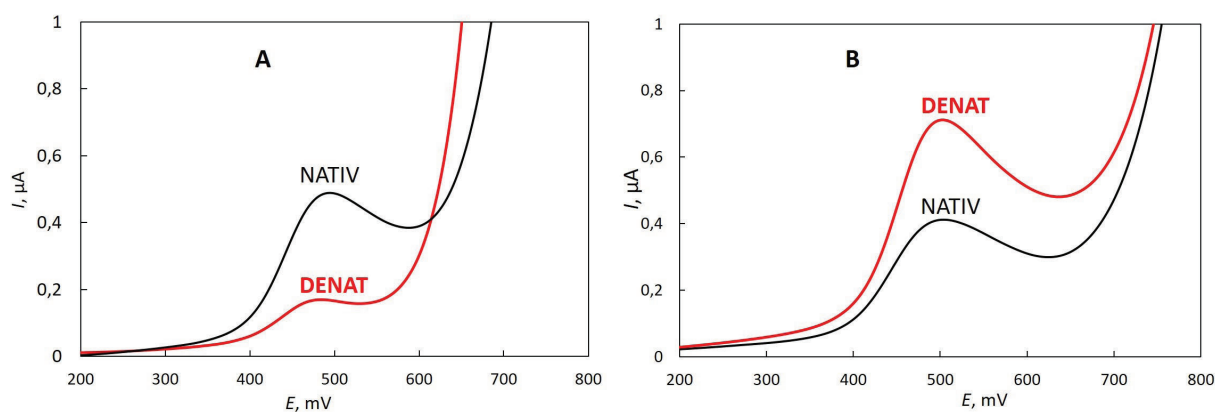
Tepelný denaturační proces byl posuzován z několika hledisek, a to z hlediska a) vlivu struktury insulínu, b) času denaturace a c) vlivu prostředí, v němž denaturační proces probíhá. Ideou provedených experimentů byla nejen zvědavost, jak se budou lišit oxidační signály denaturovaného insulínu, jehož původní nativní struktura byla monomerní ($c = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$) a jehož původní nativní struktura byla dimerní ($c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$). Jinými slovy, zda charakter získaných oxidačních signálů potvrdí, že denaturace monomerní struktury povede přímo k úplnému rozvinutí struktury do podoby D (obr. 13), což se může projevit dvojnásobnou intenzitou oxidačních signálů nebo denaturační proces z dimerní struktury bude více komplexnější a proběhne tak ve více po sobě jdoucích krocích. Ukázalo se, že k úplnému rozvinutí nativní monomerní struktury došlo již po 30 minutách, kdy bylo zaznamenáno téměř dvojnásobné zvýšení oxidačních signálů, avšak úplná denaturace dimerní struktury byla časově náročnější a pravděpodobně se jednalo o dvoukrokovou denaturaci. Svou roli během denaturačního procesu sehrálo i pufované prostředí, v němž denaturace probíhala, a potvrdilo se, že nativní struktura insulínu je obecně stabilnější v prostředí FA pufru oproti PBS pufru a potřebuje tak delší čas pro úplnou denaturaci⁷⁶.

Tepelná denaturace byla sledována i prostřednictvím CD spekter. V této studii se vycházelo z publikace⁸¹ uvádějící, že dimerní struktura insulínu se rozbaluje při teplotě ~ 70 °C a dva získané monomerní mutanty se rozplétají při vyšších teplotách. CD termálně denaturační experiment byl realizován pro insulín o koncentraci 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ v PBS pufru (pH 7,4) v rozsahu teplot 15–95 °C. Z provedené teplotní závislosti bylo možné usoudit, že se jedná o dvoufázový proces, což koreluje i se získanými elektrochemickými výsledky pro koncentraci insulínu 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ v prostředí PBS (cit.⁷⁵).

6.4.2. Chemická denaturace insulínu

Pro chemickou denaturaci insulínu sledovanou pomocí elektrochemie byla jako běžně využívaná denaturační činidla vybrána močovina a guanidin hydrochlorid. Výběr těchto denaturačních činidel byl učiněn z důvodu pouhé ztráty nativního stavu insulínu (rozvolnění struktury) aniž by docházelo k rozštěpení disulfidických vazeb. Tudíž nedochází k oddělení insulínových řetězců A a B jako v případě denaturačního činidla 1,4-dithiothreitolu (DTT). Navíc DTT je elektrochemicky aktivní, proto je nutné po skončení denaturace provést odsolení (Amicon 3K dialyzační kolonka; „cut off“ 3 kDa), což se pro nás stalo komplikací (viz další text). Molekulová hmotnost insulínu činí 5,8 kDa, po denaturaci pomocí DTT se oddělí řetězec A a B s tím, že jeden z řetězců bude menší než 3 kDa, a tudíž se nezachytí na dialyzační membráně, ale projde přes membránu. Denaturaci pomocí DTT proto bylo možné zkoumat pouze spektrálně.

Vysoká koncentrace močoviny (8 mol l^{-1} v prostředí 30 mM MOPS – 3-(*N*-morfolino)propansulfonová kyselina; pH 7,0) a guanidin hydrochloridu (5 mol l^{-1} v prostředí 0,1 M TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan; pH 7,4)



Obr. 14. Diferenční pulzní voltamogramy nativního (NATIV) a denaturovaného (DENAT) insulinu v 30 mM MOPS pufru: 3-(*N*-morfolino)propansulfonová kyselina, pH 7,0. Chemická denaturace byla provedena pomocí 8 M močoviny s následným odsolením na dialyzační kolonce (A) bez odsolení (B)

byla vybrána z důvodu, že použitá takto vysoká koncentrace denaturačního činidla by měla zajistit úplnou denaturaci insulinu v rozpletení řetězců. Toto tvrzení lze podložit i faktem z publikace⁸² uvádějící, že při použití močoviny jako denaturačního činidla o koncentraci 0–3 mol l⁻¹ je možno očekávat přítomnost i nativního proteinu, při koncentraci 3–6 mol l⁻¹ dochází k přechodu mezi nativní a denaturovanou formou a při koncentraci močoviny vyšší než 6 mol l⁻¹ bude zajištěna úplná denaturace proteinu. Postupy chemické denaturace močovinou i guanidin hydrochloridem byly prováděny dle publikací^{83,84}.

Je známo, že močovina jako denaturační činidlo vytváří vodíkové vazby s –NH i –CO skupinami exponovaných peptidových vazeb a oslabuje tak hydrofobní efekt, jež je hlavním příspěvkem ke stabilitě nativní struktury proteinu. Důsledkem tohoto chování je pak rozvolnění nativní struktury proteinu. Denaturační proces byl nejdříve prováděn na základě literatury tak, že byl insulin denaturován v prostředí 30 mM MOPS pufru obsahujícím 8 M močovinu a po 15 minutách denaturace byl odsolen na dialyzační kolonce. Výsledek však nebyl uspokojivý, protože oxidační signál denaturovaného insulinu je značně nižší než oxidační signál nativního insulinu. Tento jev může být důsledkem odsolení na kolonce, což dokládá i publikace⁸⁵, která tvrdí, že jakmile je močovina odstraněna po denaturaci dialýzou, dochází působením vzdušného kyslíku k opětovné renaturaci proteinu a spontánně se vytváří sekundární a terciární struktura. Insulin, vzhledem ke své velikosti, se ihned po denaturaci sbalí, avšak tato nově vytvořená struktura nemusí odpovídat struktuře nativního insulinu. Může se vytvořit jakákoliv náhodná energeticky málo výhodná struktura, způsobující značné snížení oxidačního signálu denaturovaného insulinu. Proto byl pro další zkoumání, po předchozím ověření, že močovina není elektroaktivní na elektrodě, využit postup bez odsolení a insulin byl podroben denaturačnímu procesu přes noc. A ukázalo se, že oxidační signál denaturovaného insulinu byl dle očekávání cca 2× vyšší ve srovnání s oxidačním

signálem nativního insulinu, což by dokazovalo, že dojde k úplnému rozvinutí řetězce do lineární podoby a elektrodě tak budou přístupné všechny čtyři molekuly tyrosinu (obr. 14)⁷⁶.

Guanidin hydrochlorid jako denaturační činidlo působí podobně jako močovina, tedy taktéž oslabuje hydrofobní efekt zajišťující stabilitu nativní struktury proteinů. V tomto případě byl využit denaturační postup dle publikace^{83,84} (5 M guanidin hydrochlorid v 0,1 M TRIS; pH 7,4) s následným odsolením denaturačního činidla po 6 hodinách na Amicon kolonce a stejně tak, jako v případě močoviny, byl zaznamenán stejný charakter oxidačního chování denaturovaného insulinu. Proto byla i v tomto případě, po ověření elektrochemické neaktivity guanidin hydrochloridu, provedena následná elektrochemická analýza denaturovaného insulinu bez předchozího odsolení.

Chemická denaturace insulinu byla zkoumána také pomocí spekter cirkulárního dichroismu. V tomto případě byl jako denaturační činidlo využit 1,4-dithiothreitol. DTT, známý jako Clelandovo činidlo, se využívá pro redukci disulfidických můstků v proteinech. Samotný DTT je také elektroaktivní, jeho redoxní potenciál je –0,33 V při pH 7. S rostoucím pH nad hodnotu 7 je jeho redukční schopnost omezená až se úplně vytrácí. Dobře se rozpouští ve vodných roztocích, ale i v některých organických rozpouštědlech a má malou schopnost podléhat oxidaci vzdušným kyslíkem. Chemická denaturace insulinu ($c = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$) v PBS (pH 7,4) probíhala pomocí přídatku 10 mM DTT. Jelikož DTT sám o sobě absorbuje v oblasti vlnových délek 200–208 nm a může tak měnit tvar CD spektra insulinu, byl denaturační proces sledován pouze v rozmezí vlnových délek 208–250 nm, a tudíž nebylo možné využít algoritmu BeStSel pro analýzu sekundární struktury. V průběhu chemické denaturace dochází k postupnému nasycení a na základě výpočtu kinetiky reakce se ukázalo, že se jedná o kinetiku 1. řádu. Po 30 minutách denaturace však dochází ke zlomu a kinetika procesu se mění⁷⁵. Popsané denaturační studie jasně indi-

kuji neustálý dialog mezi experimentem, dosavadním poznatkem a vlastní invencí.

7. Závěr

Největším přáním a přímo touhou analytického elektrochemika je získat pro daný analyt levný, přenosný, lehce obslužný, citlivý a selektivní senzor. Aby všechny tyto atributy byly splněny také v případě insulinu, jsou poslední dva jmenované atributy velkou výzvou, protože: 1) detekční limit pro insulin je velmi nízký a odpovídá jednotkám pikomolárních koncentrací a 2) selektivita v reálném vzorku, kde je mnoho interferujících látek, včetně konkurujících proteinů, je ohrožena. Často, a to nejen v případě insulinu, se objeví rozličné strategie, jak čelit nízké citlivosti a nízké selektivitě senzoru. Důraz je kladen na ty parametry, z nichž jsou užitečné informace o příčině odezvy senzoru. Tyto informace mohou vývoj robustního elektrochemického senzoru značně podpořit. I když denně vychází nespočet článků o nových citlivých senzorech s příslibem jejich perspektivní aplikace, jen málokterý se skutečně využije. Větší měrou se tato skutečnost objevuje v oblasti biosenzorů, kde je propast mezi navrženými a skutečně používanými senzory ještě markantnější.

Náš článek si všímá elektrochemických senzorů, které pro stanovení insulinu využívají různých nanokompozitních povrchových modifikací. Na návrhy senzorů se díváme více kriticky, ovšem bez zpochybňování výsledků, které mohou vést k další zajímavé studii, k dalším inovacím a k vysvětlením jevů, jež dosud vysvětleny nebyly. Je jasné, že insulin pro svou oxidační přeměnu potřebuje podporu, to znamená být aktivován k přenosu elektronů a protonů, s největší pravděpodobností prostřednictvím svého tyrosinu.

Za zamyšlení stojí několik faktů, které by stály za objasnění, tj.: (a) různé citlivý oxidační signál insulinu v závislosti na povrchové modifikaci elektrody (morfologie, chemismus); (b) oxidační potenciál volného a vázaného tyrosinu nemusí být zcela identický; (c) vedle tyrosinu mohou být v insulinu oxidovány cysteiny a třeba i histidiny; (d) katalýza oxidace insulinu nanočásticemi a nanokompozity v závislosti na jejich složení a různých poměrech složek; (e) existence povrchové denaturace insulinu; (f) odlišná konformace insulinu po chemické denaturaci v důsledku odstranění denaturačního činidla pomocí dialýzy.

Závěrem lze konstatovat, že cesta úspěšné aplikace nově navrženého insulinového senzoru do klinické praxe není snadná. Každá analýza reálného vzorku vydává elektrodu (senzor) na milost složkám matrice a tento klíčový moment je nutné u každého navrženého senzoru individuálně řešit. Z hlediska insulinu, jehož koncentrace se v reálném vzorku pohybuje v řádu pikomolárních koncentrací, je toto řešení obzvláště náročné.

Seznam zkratk a symbolů

BeStSel	software (Beta Structure Selection)
CD	cirkulární dichroismus
CHIT	chitosan
CNT	uhlíková nanotrubička (carbon nanotube)
CNF	uhlíkové nanovláknko (carbon nanofiber)
DM	diabetes mellitus
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie (differential scan calorimetry)
DTT	1,4-dithiothreitol
ECL	elektrochemiluminiscence (electrochemiluminescence)
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (glassy carbon electrode)
ITC	izotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry)
MIP	molekulárně vtištěný polymer (molecular imprinted polymer)
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
MWCNT	vicestěnná uhlíková nanotrubička (multi wall-ed carbon nanotube)
NP	nanočástice (nanoparticle)
PBS	roztok fosfátového pufru (phosphate buffer saline)
PeGE	pentelková grafitová elektroda (pencil graphite electrode)
QDs	kvantové tečky (quantum dots)
Tyr	tyrosin
YASARA	molekulová dynamika (Yet Another Scientific Artificial Reality Application)

LITERATURA

- Palecek E., Tkac J., Bartosik M., Bertok T., Ostatna V., Palecek J.: *Chem. Rev.* 115, 2045 (2015).
- Mayer J. P., Zhang F., DiMarchi R. D.: *Biopolymers* 88, 687 (2007).
- Cabrera O., Berman D. M., Kenyon N. S., Ricordi C., Berggren P. O., Caicedo A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2334 (2006).
- Fu J. Q., Cui Q., Yang B., Hou Y. Y., Wang H. H., Xu Y. Y., Wang D. F., Zhang Q., Pi J. B.: *Food Chem. Toxicol.* 100, 161 (2017).
- Hovancova J., Sisolakova I., Orinakova R., Orinak A.: *J. Solid State Electrochem.* 21, 2147 (2017).
- Buchanan T. A., Xiang A. H.: *J. Clin. Invest.* 115, 485 (2005).
- Sisolakova I., Hovancova J., Orinakova R., Orinak A., Garcia D. R., Shylenko O., Radonak J.: *Electroanalysis* 31, 103 (2019).
- Maghsoudi A. S., Hassani S., Akmal M. R., Ganjali M. R., Mirnia K., Norouzi P., Abdollahi M.: *Int. J. Nanomed.* 15, 2219 (2020).

9. Sabu C., Henna T. K., Raphey V. R., Nivitha K. P., Pramod K.: *Biosens. Bioelectron.* 141, 111201 (2019).
10. Wang J., Musameh M.: *Anal. Chim. Acta* 511, 33 (2004).
11. Frasconi M., Tortolini C., Botre F., Mazzei F.: *Anal. Chem.* 82, 7335 (2010).
12. Burgi W., Briner M., Franken N., Kessler A. C.: *Clin. Biochem.* 21, 311 (1988).
13. Tanaka T., Matsunaga T.: *Anal. Chem.* 72, 3518 (2000).
14. Jaafariasl M., Shams E., Amini M. K.: *Electrochim. Acta* 56, 4390 (2011).
15. Luo Y., Huang K. X., Xu H. B.: *Anal. Chim. Acta* 553, 64 (2005).
16. Hvass A., Skelbaek-Pedersen B.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 551 (2005).
17. Ortner K., Buchberger W., Himmelsbach M.: *J. Chromatogr. A* 1216, 2953 (2009).
18. Visser N. F. C., van Harmelen M., Lingeman H., Irth H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, 451 (2003).
19. Taghdisi S. M., Danesh N. M., Lavaee P., Emrani A. S., Ramezani M., Abnous K.: *Anal. Lett.* 48, 672 (2015).
20. Wang Y., Li J. H.: *Anal. Chim. Acta* 650, 49 (2009).
21. Turner A. P. F., Chen B. N., Piletsky S. A.: *Clin. Chem.* 45, 1596 (1999).
22. Sanghera N., Anderson A., Nuar N., Xie C., Mitchel D., Klein-Seetharaman J.: *Int. J. Parallel Emergent Distrib. Syst.* 32, 119 (2016).
23. Thévenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S.: *Biosens. Bioelectron.* 16, 121 (2001).
24. Taguchi M., Ptitsyn A., McLamore E. S., Claussen J. C.: *J. Diabetes Sci. Technol.* 8, 403 (2014).
25. Yoo E. H., Lee S. Y.: *Sensors* 10, 4558 (2010).
26. Pisoschi A. M.: *Biochem. Anal. Biochem.* 1, 1000e119 (2012).
27. Updike S. J., Hicks G. P.: *Nature* 214, 986 (1967).
28. Mosbach K., Danielsson B.: *Biochim. Biophys. Acta* 364, 140 (1974).
29. Mehrotra P.: *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* 6, 153 (2016).
30. Hovorka R., Nodale M., Haidar A., Wilinska M. E.: *Diabetes Technol. Ther.* 15, 4 (2013).
31. Thabit H., Hovorka R.: *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 41, 105 (2012).
32. Zhang M. G., Mullens C., Gorski W.: *Anal. Chem.* 77, 6396 (2005).
33. Cheng L., Pacey G. E., Cox J. A.: *Anal. Chem.* 73, 5607 (2001).
34. Hart J. P., Crew A., Crouch E., Honeychurch K. C., Pemberton R. M.: *Anal. Lett.* 37, 789 (2004).
35. Poorahong S., Thammakhet C., Thavarungkul P., Limbut W., Numnuam A., Kanatharana P.: *Microchim. Acta* 176, 91 (2012).
36. Wang J., Rivas G., Cai X. H., Chicharro M., Farias P. A. M., Palecek E.: *Electroanalysis* 8, 902 (1996).
37. Akanda M. R., Sohail M., Aziz M. A., Kawde A. N.: *Electroanalysis* 28, 408 (2016).
38. Navratil R., Kotzianova A., Halouzka V., Opletal T., Triskova I., Trnkova L., Hrbac J.: *J. Electroanal. Chem.* 783, 152 (2016).
39. Li X. C., Triskova I., Trnkova L.: *Electrochim. Acta* 442, 141921 (2023).
40. Trnkova L., Triskova I., Cechal J., Farka Z.: *Electrochem. Commun.* 126, 107018 (2021).
41. Salimi A., Noorbakhash A., Sharifi E., Semnani A.: *Biosens. Bioelectron.* 24, 792 (2008).
42. Wang J., Tangkuaram T., Loyprasert S., Vazquez-Alvarez T., Veerasai W., Kanatharana P., Thavarungkul P.: *Anal. Chim. Acta* 581, 1 (2007).
43. Salimi A., Roushani M., Soltanian S., Hallaj R.: *Anal. Chem.* 79, 7431 (2007).
44. Cox J. A., Gray T. J.: *Anal. Chem.* 61, 2462 (1989).
45. Gorski W., Aspinwall C. A., Lakey J. R. T., Kennedy R. T.: *J. Electroanal. Chem.* 425, 191 (1997).
46. Pikulski M., Gorski W.: *Anal. Chem.* 72, 2696 (2000).
47. Arvinte A., Westermann A. C., Sesay A. M., Virtanen V.: *Sens. Actuators, B* 150, 756 (2010).
48. Brabec V.: *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 116, 69 (1980).
49. Ozcan A., Sahin Y.: *Biosens. Bioelectron.* 31, 26 (2012).
50. Dourado A. H. B., Pastrian F. C., De Torresi S. L. C.: *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 607 (2018).
51. Enache T. A., Oliveira-Brett A. M.: *J. Electroanal. Chem.* 655, 9 (2011).
52. Malfoy B., Reynaud J. A.: *J. Electroanal. Chem.* 114, 213 (1980).
53. Suprun E. V., Zharkova M. S., Morozovich G. E., Veselovsky A. V., Shumyantseva V. V., Archakov A. I.: *Electroanalysis* 25, 2109 (2013).
54. Cai X. H., Rivas G., Farias P. A. M., Shiraishi H., Wang J., Palecek E.: *Anal. Chim. Acta* 332, 49 (1996).
55. Zhu S. Y., Zhang J., Zhao X. E., Wang H., Xu G. B., You J. M.: *Microchim. Acta* 181, 445 (2014).
56. Ogura K., Kobayashi M., Nakayama M., Miho Y.: *J. Electroanal. Chem.* 463, 218 (1999).
57. Zinola C. F., Rodriguez J. L., Arevalo M. C., Pastor E.: *J. Electroanal. Chem.* 585, 230 (2005).
58. Salimi A., Mohamadi L., Hallaj R., Soltanian S.: *Electrochem. Commun.* 11, 1116 (2009).
59. Kivlehan F., Lanyon Y. H., Arrigan D. W. M.: *Langmuir* 24, 9876 (2008).
60. Amini N., Gholivand M. B., Shamsipur M.: *J. Electroanal. Chem.* 714, 70 (2014).
61. Mahreni A., Mohamad A. B., Kadhum A. A. H., Daud W. R. W., Iyuke S. E.: *J. Membr. Sci.* 327, 32 (2009).
62. Yu Y. N., Guo M. S., Yuan M. W., Liu W. T., Hu J. B.: *Biosens. Bioelectron.* 77, 215 (2016).
63. Rafiee B., Fakhari A. R.: *Biosens. Bioelectron.* 46, 130 (2013).
64. Sisolakova I., Hovancova J., Orinakova R., Orinak A., Trnkova L., Garcia D. R., Radonak J.: *Bioelectro-*

- chemistry 130, 107326 (2019).
65. Sisolakova I., Hovancova J., Orinakova R., Orinak A., Trnkova L., Triskova I., Farka Z., Pastucha M., Radonak J.: *J. Electroanal. Chem.* 860, 113881 (2020).
 66. Sisolakova I., Hovancova J., Chovancova F., Orinakova R., Maskalova I., Orinak A., Radonak J.: *Electroanalysis* 33, 627 (2021).
 67. Singh V.: *Mater. Lett.* 254, 415 (2019).
 68. Razmi H., Ezzati L., Khorablou Z.: *J. Electrochem. Soc.* 166, B961 (2019).
 69. Cruz A. G., Haq I., Cowen T., Di Masi S., Trivedi S., Alanazi K., Piletska E., Mujahid A., Piletsky S. A.: *Biosens. Bioelectron.* 169, 112536 (2020).
 70. Kouchakinejad S., Babae S., Roshani F., Kouchakinejad R., Shirmohammadi N., Kaki S.: *Chem. Phys. Lett.* 759, 137987 (2020).
 71. Kamyabi M. A., Alipour Z., Moharramnezhad M.: *Anal. Methods* 13, 1003 (2021).
 72. Zhao Y. L., Zhang H. Y., Li Y., Yu X. D., Cai Y., Sha X. P., Wang S. Y., Zhan Z. K., Xu J. H., Liu L. Q.: *Biosens. Bioelectron.* 186, 113291 (2021).
 73. Wang J., Liu C. Y., Hua J.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 16, 211016 (2021).
 74. Seveldová P.: *Redoxní procesy insulinu na uhlikových tištěných elektrodách. Bakalářská práce.* Masarykova univerzita, Brno 2022.
 75. Nosková N.: *Denaturační a agregační stavy insulinu v jeho redukované a oxidované formě. Bakalářská práce.* Masarykova univerzita, Brno 2022.
 76. Velecká M.: *Elektrochemická analýza insulinu. Bakalářská práce.* Masarykova univerzita, Brno 2022.
 77. Pocker Y., Biswas S. B.: *Biochemistry* 19, 5043 (1980).
 78. Micsonai A., Wien F., Bulyaki E., Kun J., Moussong E., Lee Y. H., Goto Y., Refregiers M., Kardos J.: *Nucleic Acids Res.* 46, W315 (2018).
 79. Micsonai A., Wien F., Kernya L., Lee Y. H., Goto Y., Refregiers M., Kardos J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E3095 (2015).
 80. Brezanová A.: *Redoxní procesy elektroaktivních aminokyselin. Bakalářská práce.* Masarykova univerzita, Brno 2022.
 81. Huus K., Havelund S., Olsen H. B., van de Weert M., Frokjaer S.: *Biochemistry* 44, 11171 (2005).
 82. Wingfield P. T.: *Curr. Protoc. Protein Sci.* (2001).
 83. Pace N. C., Grimsley G. R., Scholtz M. J.: *Denaturation of Proteins by Urea and Guanidine Hydrochloride.* Wiley-VCH, Weinheim 2005.
 84. Jiang C. T., Chang J. Y.: *FEBS Lett.* 579, 3927 (2005).
 85. Koolman J., Roehm K. H.: *Barevný atlas biochemie.* Grada, Praha 2012.

L. Trnková and I. Trísková (*Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice, Brno, Czech Republic*): **Electroanalysis of Insulin on Nanocomposite Electrodes**

The article notes the latest presented work on the electrochemical detection of insulin and presents a critical view of the research and development of its electrochemical non-enzymatic sensors. It monitors the effect of experimental conditions on the insulin oxidation signal and considers the catalytic effects of nanoparticles or nanocomposites deposited on the surfaces of the electrochemical sensor.

Keywords: insulin, tyrosine, electrochemistry, sensor, nanoparticles, nanocomposite, modified surfaces

STUDIUM HLADINY METALOTHIONEINU V SÉRU PACIENTŮ SE ZHOUBNÝM NÁDOREM

LUDĚK MELICH^a, MAGDALÉNA FOŘTOVÁ^a, BOŽENA HOSNEDLOVÁ^b, JAKUB PODHÁJSKÝ^a, ONDŘEJ RYCHLÝ^a, JULIA WERLE^a, KRISTÝNA BUREŠOVÁ^a, KATEŘINA DUNOVSKÁ^a, LENKA VYSLOUŽILOVÁ^c, EVA KLAPKOVÁ^a, KAREL KOTAŠKA^a, JANA ČEPOVÁ^a, BLANKA JEDLIČKOVÁ^a, OLGA ŠTĚPÁNKOVÁ^c, RICHARD PRŮŠA^a a RENÉ KIZEK^a

^a Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2. LF a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5,

^b BIOCEV, 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Vestec, ^c Oddělení biomedicínského inženýrství a asistivní technologie, Český institut informatiky, robotiky a kybernetiky, České vysoké učení technické v Praze, Jugoslávských partyzánů 1580/3, 160 00 Praha 6, Česká republika
kizekrene@gmail.com

Došlo 28.5.23, přijato 26.6.23.

Metalothionein (MT) je nízkomolekulární intracelulární protein, jehož primární funkcí je udržení homeostázy těžkých kovů v živých organismech. Molekulární mechanismus exprese MT je velmi málo prostudován. Nedávné výzkumy ukazují na jeho významný vztah ke karcinogenezi, spontánní mutagenezi a účinnosti protinádorových léčiv. Zvýšená hladina MT je studována jako potenciální ukazatel zvýšené metabolické aktivity u nádorových onemocnění. Elektrochemické metody jsou vhodným analytickým nástrojem pro detekci MT.

Za využití elektrochemické analýzy (Brdičkovy reakce) byly studovány teplotně denaturované vzorky krevních sér pacientů s diagnostikovaným nádorovým onemocněním. Získané voltamogramy byly vyhodnoceny jako plocha pod křivkou (AUC odpověď). Pro porovnání normální a abnormální hladiny MT bylo použito kontrolní sérum zdravých probandů ($n = 38$) s průměrným množstvím MT $2,2 \mu\text{g l}^{-1}$ a mediánem $2,1 \mu\text{g l}^{-1}$. Ve všech hodnocených vzorcích krevních sér pacientů s nádorovým onemocněním ($n = 228$) bylo průměrné množství MT $22,7 \mu\text{g l}^{-1}$ a medián $18,1 \mu\text{g l}^{-1}$. Rozdíl (10násobný) mezi skupinami byl statisticky vysoce významný.

Získaná data pilotního experimentu naznačují, že hladiny thiolových sloučenin, jako je MT, mohou mít u pacientů s nádorovým onemocněním klinický potenciál.

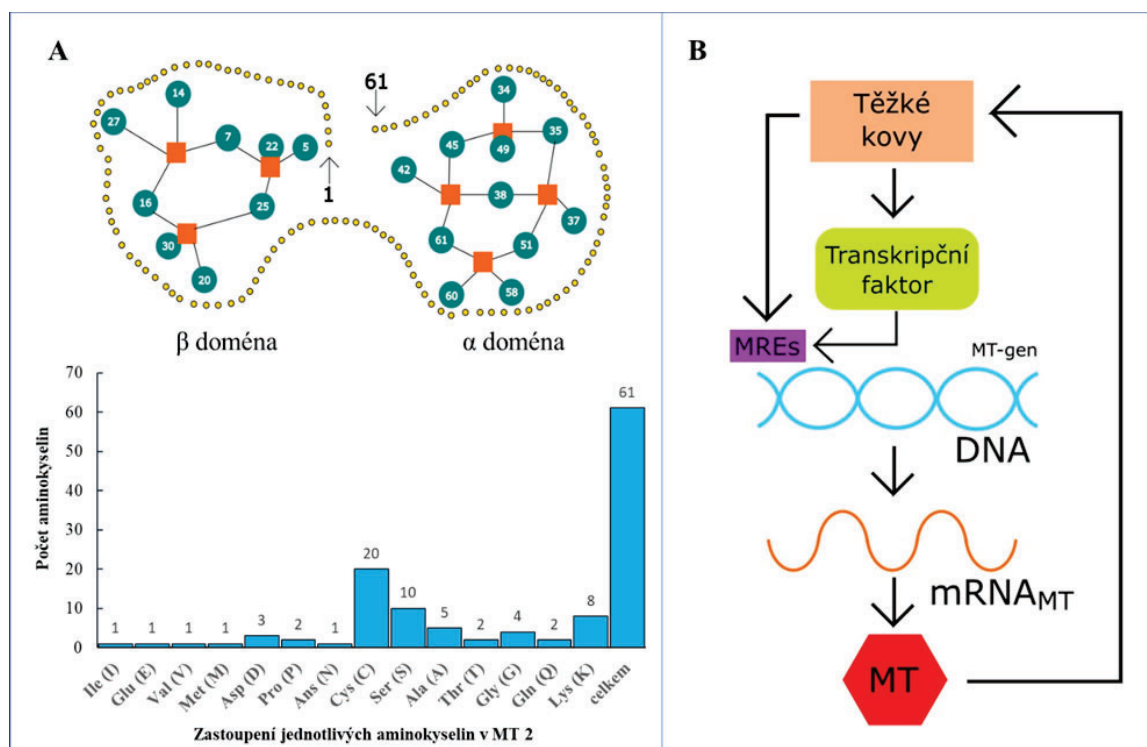
Klíčová slova: metalomika, nádorová onemocnění, játra, slinivka, žlučník, diagnostika, prognostický marker, elektrochemická analýza, Brdičková reakce

Úvod

Molekulární podstata biologické funkce metalothioneinů

Metalothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních, na cystein velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30 % v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti 6–10 kDa (cit.¹). Díky své vysoké afinitě k těžkým kovům, např. k zinku, mědi nebo kadmii, zajišťují homeostatickou kontrolu a detoxikaci těžkých kovů u vývojově rozdílných organismů². Bylo prokázáno, že vazba kadmia na MT zabránila toxickým účinkům, ale docházelo ke zvýšení transportu kadmia do ledvin. Pro hodnocení toxicity byl v případě ledvin prokázán význam poměru Cd/Zn v MT (cit.²). Objev MT je datován k roku 1957, kdy Margoshes a Vallee izolovali MT z koňských ledvin³. V molekule MT nejsou přítomny aromatické ami-

nokyseliny. V primární sekvenci MT se vyskytuje 20 cysteinů obvykle v těchto repetitcích: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X představuje jinou aminokyselinu než cystein. MT se skládají ze dvou vazebných domén (α a β). Kovalentní vazby atomů kovů se účastní sulfhydrylové zbytky cysteinů v klastrech (obr. 1). N-terminální část peptidu je označena jako β -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty. C-terminální α -doména má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem 12 atomů⁴. MT jsou rozděleny do tříd MT-I a MT-II s ohledem na jejich primární strukturu a organismus, ze kterého byly izolovány⁵. I. třída zahrnuje savčí metalothioneiny tvořené 61 až 68 aminokyselinami s molekulovou hmotností 6–7 kDa. Ve II. třídě jsou zařazeny bakteriální MT, proteiny se vzdálenou podobností k I. třídě, které mají odlišné rozmístění Cys zbytků v molekule proteinu ve srovnání s I. třídou MT (obr. 1)⁶.



Obr. 1. **Pravděpodobné schéma struktury metalothioneinů (α a β doména) (A).** Zelené kruhy zastupují SH skupiny (cysteinylové zbytky) a oranžové čtverce označují vázané atomy těžkých kovů (zinek, kadmium, stříbro a další). Ve vloženém obrázku je obsah jednotlivých aminokyselin v MT. **Pravděpodobný vztah koncentrace MT k buněčné proliferaci (B).** Po navázání MT na kov jsou uvolněny transkripční faktory, které dále ovlivňují replikaci a transkripci genové informace MT. Transkripční faktor nasedá na MRE (metal-responsive element) v promotorové oblasti MT-genu a spouští jeho transkripci. Upraveno podle Kägi, Schäffer 1988 (cit.¹) a z databáze Swiss-Prot (ExPASy Molecular Biology Server, zdroj: <http://www.expasy.ch>).

Hladiny MT s potenciálním využitím v klinické praxi

Sledování změny hladin MT u různých onemocnění člověka se věnuje několik výzkumných skupin^{7–16}. Sérové hladiny MT byly u kontrolních skupin zdravých osob kolem $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (cit.¹⁷), u kuřáků kolem $20–25 \mu\text{g l}^{-1}$ (cit.¹⁸). V případě zánětu byly hladiny zvýšené nad $20 \mu\text{g l}^{-1}$ (cit.¹⁸). Ve slinách se hladina MT pohybovala mezi 50 a 100 ng l^{-1} (cit.¹⁸). Hladiny MT jsou ovlivněny prostředím a fyzickou aktivitou¹⁹. U pracovní expozice kadmium se hladiny MT v moči pohybovaly v rozmezí $2–155 \text{ ng g}^{-1}$ moči, $2–11 \text{ ng g}^{-1}$ plazmy (cit.²⁰). Swierczek a spol. studovali hladiny MT v moči po environmentální kontaminaci a zjistili 6–15násobný nárůst po expozici kadmium²¹. Předpokládá se, že kadmium by mohlo souviset s nádorovou transformací. V práci Wolfa a spol. byly analyzovány vzorky moči pacientů s nádory močového měchýře s důrazem na MT s vázaným kadmium. Získané výsledky ukázaly, že kadmium je převážně vázáno na sledovanou MT frakci. Medián koncentrace kadmia vázaného na MT u kontrolní skupiny byl kolem $0,8 \mu\text{g l}^{-1}$, zatímco skupina se zhoubným nádorem vykazovala statisticky zvýšenou hladinu kolem $1,8 \mu\text{g l}^{-1}$ (cit.²²). U expozice rtuti se sérové

hladiny MT pohybovaly od $0,5$ do $1,5 \mu\text{g l}^{-1}$ (cit.²³). Hladiny MT detegované metodou RIA se u kontrolní skupiny pohybovaly v rozmezí $1–16 \text{ ng g}^{-1}$ séra/plazmy a $5–400 \mu\text{g g}^{-1}$ kreatininu v moči^{24–27}. Bylo zjištěno, že hladiny MT mají souvislost se změnou fyziologické funkce ledvin^{27,28}. Změny hladiny MT byly pozorovány také u jaterní dysfunkce²⁹. Milnerowicz a spol. pozorovali zvýšení exprese MT u pankreatitidy a lze předpokládat, že MT bude hrát roli i v syntéze hormonů pankreatu³⁰.

U pacientů se zhoubným nádorem lze předpokládat zvýšení hladiny MT^{31,32}. O hladinách MT u pacientů s nádorovým onemocněním není příliš mnoho dostupných informací^{31,33,34}. Přehled o této problematice podávají Si a Lang¹⁶. Je známo, že hladiny MT jsou ovlivněny hladinami iontů těžkých kovů³⁵. Zvýšené množství MT v nádorových buňkách pravděpodobně souvisí s buněčnou proliferací^{34,36,37}. Studuje se zapojení MT do procesu karcinogeneze a spontánní mutagenese³⁸ a vztah nadměrné exprese MT a koncentrace protinádorových léčiv obsahujících ve své molekule kov³⁹. U pacientů s primárním kožním melanomem byla Weinlichem a spol. statisticky potvrzena spojitost zvýšené hladiny MT s progresí onemocnění a úmrtím pacientů na metastázy⁴⁰. Nadměrná exprese MT je iniciována maligními typy nádorů, což bylo zjiště-

no např. u karcinomu prsu⁴¹, kožních karcinomů⁴², hepatocelulárního karcinomu⁴³ a karcinomů pankreatu⁴⁴.

Stanovení MT

Přehled základních analytických metod stanovení metalothioneinů je popsán v práci Šestákové⁴⁵. Profesor Brdička a profesor Heyrovský publikovali v časopise Nature informace o využití polarografie při diagnostice nádorového onemocnění^{46–48}. Předpokládá se, že thiolové skupiny přítomné v molekule metalothioneinů jsou odpovědné za katalytické signály vylučování vodíku. Elektrochemickému stanovení MT se věnovala řada experimentálních studií⁴⁹. Podrobné studie provedla řada autorů^{50–53}. Thompson a Cosson popisují elektrochemické signály různých proteinů včetně aplikace metody na reálné vzorky *Scylla serrata* a *Crassostrea gigas*⁵⁴. Ke stanovení MT je využíváno široké spektrum metod chemické analýzy⁵⁵. Nejčastěji se využívají elektromigrační metody – gelová a kapilární elektroforéza a chromatografické metody⁵⁶. Dále se využívají elektrochemické metody, mezi něž patří diferenční pulsní voltametrie (DPV) nebo derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem (CPSA)^{49,57–59}. Pomocí CPSA v kombinaci s technikou adsorptivního přenosu (AdTS) lze stanovovat koncentrace MT na úrovni femtomolů ve velmi malých objemech (jednotky μl) vzorku⁵⁸. Imunochemické metody (RIA a ELISA metody) jsou přesné a citlivé²⁴. V klinické praxi se celková koncentrace MT deteguje nejčastěji imunohistochemicky s použitím monoklonální myši protilátky E9 (cit.⁶⁰). Pro analýzu MT a interakcí je také možné využít nanotechnologického přístupu syntetizovaných zlatých nanočástic (AuNPs)⁶¹. AuNPs s pseudoperoxidasovou aktivitou byly využity pro koncentrační rozsah MT 10–50 nmol l^{-1} (cit.⁶²), kdy MT vytváří kolem nanočástice proteinovou korunu⁶³ a mez detekce se pohybuje kolem 1,5 nmol l^{-1} (cit.⁶³).

V naší práci se dlouhodobě snažíme využít elektrochemických přístupů pro potenciální experimentální využití v diagnostice vážných onemocnění^{31–33}. Cílem této práce bylo elektrochemické studium obsahu MT ve vzorcích krevního séra a jejich změn u pacientů se zhoubnými nádory jater, slinivky a žlučníku.

Experimentální část

Použité chemikálie

MT byl zakoupen od společnosti Sigma-Aldrich (USA) a ostatní chemikálie použité pro analýzu byly zakoupeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo) v čistotě p.a. Pro chemicko-biochemickou analýzu byly využity pracovní roztoky od společnosti Siemens (USA).

Biologický materiál

Vzorky séra byly získány ze zbytků séra jako směs anonymních vzorků před jejich likvidací (FN Motol)

a jejich použití je v souladu s vnitřními předpisy. Všechna vyšetření jsou v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Kontrolní skupina byla vybrána podle dostupných údajů ($n = 38$, věk 16 až 18 let). Početní zastoupení biologických vzorků ($n = 228$) jednotlivých kategorií podle mezinárodní klasifikace nemocí je uvedeno na obr. 2. Byly sledovány následující kategorie: C250 (nádor slinivky), C23, C241 (nádory žlučníku), C220, C222 (nádory jater). Početní zastoupení věkových kategorií bylo sestaveno podle doporučení WHO. Nejpočetnější skupinu tvoří pacienti ve věkovém rozmezí 61–75 let, nejméně zastoupena je skupina ve věku 19–30 let.

Příprava roztoků a vzorků

Sběr vzorků venózní krve probíhal na jednotlivých odděleních FN Motol a bylo získáno přibližně 5 ml krve do zkumavek Vacuette s akcelerátorem hemokoagulace. Následnou centrifugací (Avanti J-15R, Beckman Coulter (USA) 1500 g, 10 min, 4 °C) bylo odděleno krevní sérum pro biochemickou analýzu. Individuální vzorky pro stanovení MT byly smíchány s ultračistou vodou do zkumavky (objem minimálně 500 μl ; v poměru ředění 10krát). Následně byl biologický vzorek denaturován (termomixer, 99 °C po dobu 20 min, zkumavka Eppendorf), poté byl centrifugován (po dobu 30 min při 14 000 g, 4 °C, zkumavka Eppendorf). Pro elektrochemickou analýzu byl použit supernatant.

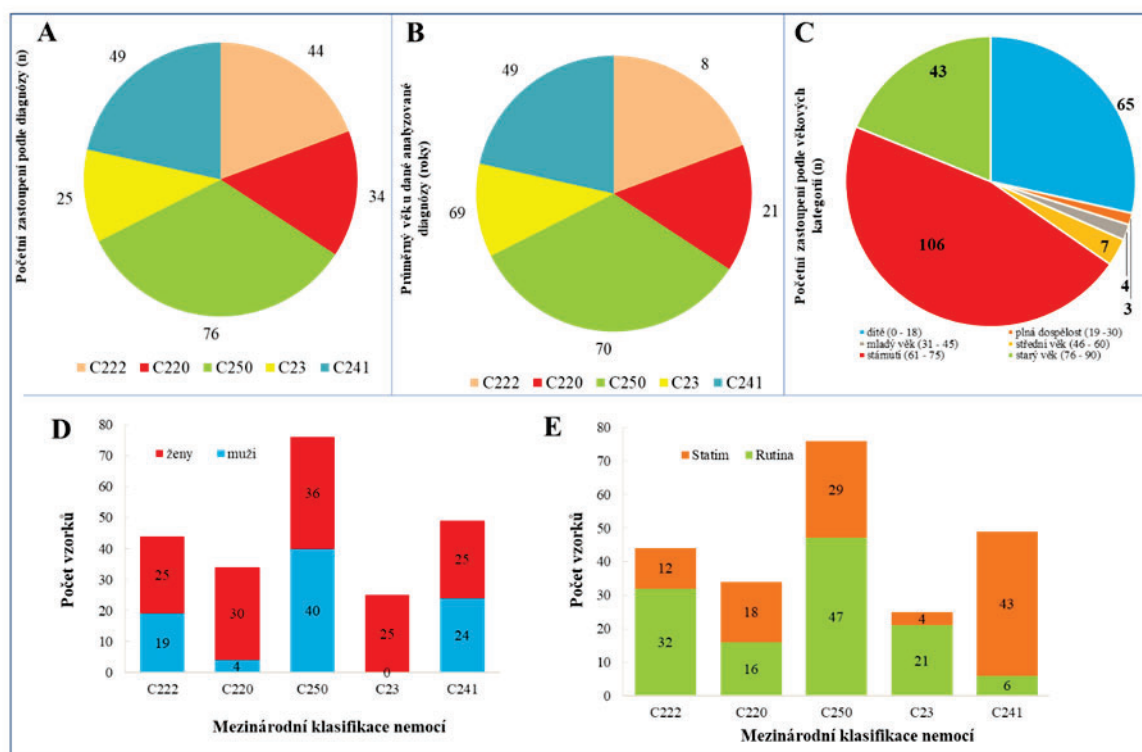
Přístrojové vybavení

Elektrochemická analýza

Elektrochemická analýza byla provedena v tříelektrodovém zapojení pomocí VA-Stand 663 (Metrohm, Herisau, Švýcarsko). Byla použita pracovní elektroda HMDE s plochou 0,4 mm^2 , referenční Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda z uhlíku (obr. 3A). Brdičkův základní elektrolyt obsahoval 1 mmol l^{-1} $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ a 1 mol l^{-1} amonný pufr (pH 9,6). Teplota měřicí nádoby byla udržována na 5 °C. AdTS DPV parametry: počáteční potenciál $-0,35$ V, konečný potenciál $-1,95$ V, modulační čas 0,057 s, potenciálový krok 1,05 mV s^{-1} , modulační amplituda 250 mV. Postup byl proveden podle SOP a podrobně byla námi modifikovaná metodika popsána v pracích^{32,57,64}. Pro kalibraci MT byly použity koncentrace 100, 50, 25, 12, 6, 3, 1,5 $\mu\text{g l}^{-1}$. Pro výpočet koncentrace MT z AUC voltamogramů byla použita následující rovnice: y (μC) = $12,07x$ ($\mu\text{g l}^{-1}$) + 70,9 (cit.⁶⁵).

Chemická analýza

Ultračistá voda byla připravena na zařízení ELGA (Londýn, Spojené království), pH bylo kontrolováno na pH metru (VWR, USA). Pro chemickou analýzu vzorků byl použit analyzátor Atellica Solutions CH 930 (Siemens, USA) a Atellica Solutions IM (Siemens, USA), který využívá mikroobjemovou technologii pro fotometrické analýzy. U vzorků pacientů byly stanoveny koncentrace Ca, Mg, Fe, P, glukosy, ALP, AST, ALT, GGT, LD,



Obr. 2. Početní zastoupení biologických vzorků ($n = 228$) podle mezinárodní klasifikace nemocí C250 (nádor slinivky), C23, C241 (nádory žlučníku), C220, C222 (nádory jater) (A). Průměrný věk (roky) u pacientů s danou diagnózou (B). Početní zastoupení věkových kategorií (podle WHO) pacientů s nádorovým onemocněním. Nejpočetnější skupinou je věková skupina 61–75 let, nejméně zastoupena je skupina 19–30 let (C). Rozřazení analyzovaných vzorků podle pohlaví (D). Počet analyzovaných vzorků podle diagnózy a žádosti o rychlost vyšetření (E).

amylasy, lipasy, celkového bilirubinu, močové kyseliny, močoviny, kreatininu, cholesterolu, albuminu, celkové bílkoviny, C-reaktivního proteinu. U vybraných skupin pacientů pak byly stanoveny vybrané nádorové markery: S-100, PSA, CEA, CA 19-9, CA 72-4, CA 15-3, CA 125, NSE. Pro detekci iontů Na, K, a Cl bylo využito integrované multisenzorové technologie (IMT) na tištěných elektrodách.

Statistické a matematické vyhodnocení

Veškerá analyzovaná data byla převedena do laboratorní databáze QINSLAB a statisticky vyhodnocena. Všechny elektrochemické analýzy byly provedeny minimálně v pěti opakováních. Analytické parametry LOD a LOQ byly vypočítány podle práce Hubaux a Vos⁶⁶.

Výsledky a diskuse

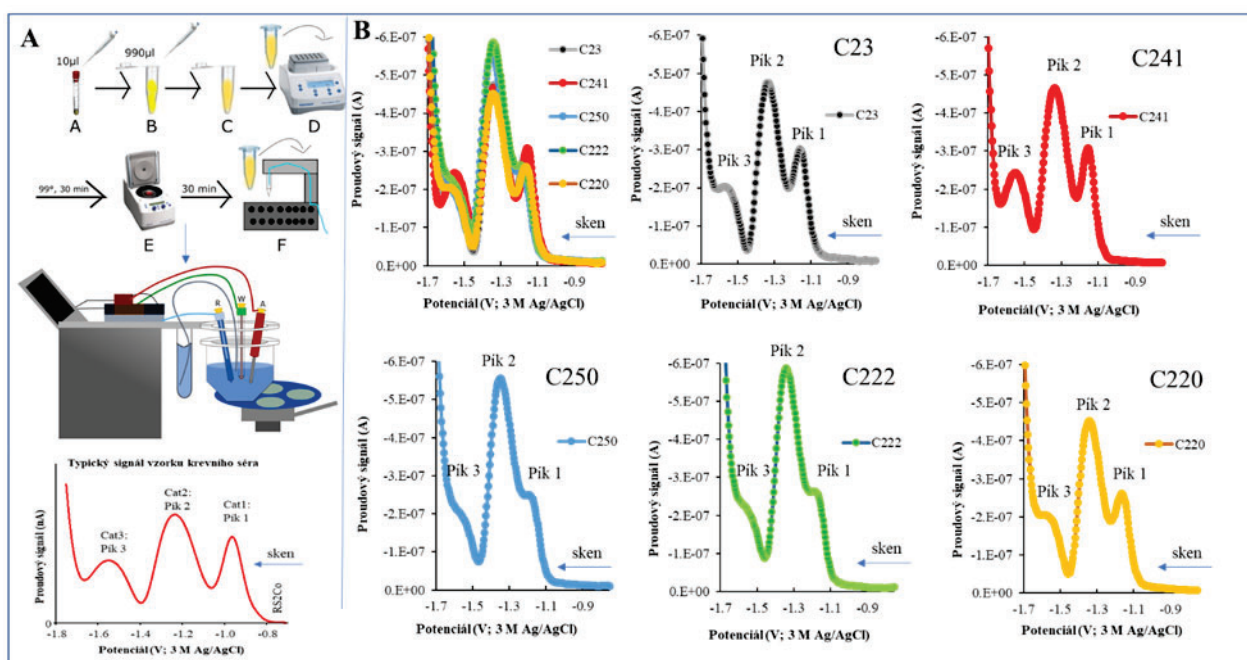
Základní elektrochemické chování metalothioneinů

Elektroanalýza thiolových sloučenin je dlouhodobě studována a popsána v řadě prací mnoha autorů^{64,47,48,50,51,67–69}.

MT jsou charakteristické vysokým obsahem thiolových skupin, které jsou vhodným cílem pro elektrochemické sledování^{24,53}. Pro tyto analýzy bylo využíváno různých analytických přístupů včetně Brdičkovy reakce využívající ionty kobaltu, niklu či platiny^{64,70–72}. Dlouhodobým cílem pro rychlou diagnostiku různých zhoubných nádorů je intenzivní hledání nových přístupů a molekul^{33,73}.

Analýza voltametrických křivek

V experimentu byla testována hladina MT ve vzorcích sér pomocí Brdičkovy reakce. Typické voltametrické záznamy jsou ukázány na obr. 3. Jedním z našich cílů bylo vyhodnocení získaných voltametrických křivek (určení ploch pod křivkou, AUC). Pro tento účel byla v laboratorní databázi vytvořena matematická funkce. U získaných voltamogramů byla vyhodnocena AUC ve čtyřech námi navržených zónách (zóna od $-0,6$ V do $-1,0$ V, druhá od $-1,0$ V do $-1,3$ V, třetí od $-1,3$ V do $-1,6$ V a čtvrtá zóna od $-1,6$ V do $-1,95$ V). Získané AUC pro jednotlivé zóny ukázaly nejlepší závislost na koncentraci pro zónu 2 a 3. Zaznamenané AUC odezvy jednotlivých zón narůstaly v závislosti na množství aplikovaného vzorku. Stanovené relativní chyby v mezidenním stanovení



Obr. 3. Příprava biologického vzorku pro analýzu (A): Odebraných 10 μl zředíme 990 μl ultračisté vody. Vzorek je denaturován při 99 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Následuje centrifugace při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$, po dobu 30 minut. Vlastní elektrochemické měření (DPV, Brdičkova reakce, počáteční potenciál: $-0,35\text{ V}$, konečný potenciál: $-1,95\text{ V}$, modulační čas 0,057 s, potenciálový krok: 1,05 mV/s, modulační amplituda: 250 mV). Typické voltametrické záznamy vzorků krevního séra kontrolní skupiny (A) a pacientů s diagnózou C23, C241, C250, C222 a C220 (B). Voltamogramy ukazují tři katalytická maxima (pík 1, 2 a 3). Data vyhodnocena jako plochy signálů pod křivkou (AUC). DP voltamogram biologického vzorku s redoxním signálem RS_2Co a katalytickými signály Cat1, Cat2 a Cat3. Bylo dávkováno 100 μl vzorku do 5 ml základního elektrolytu.

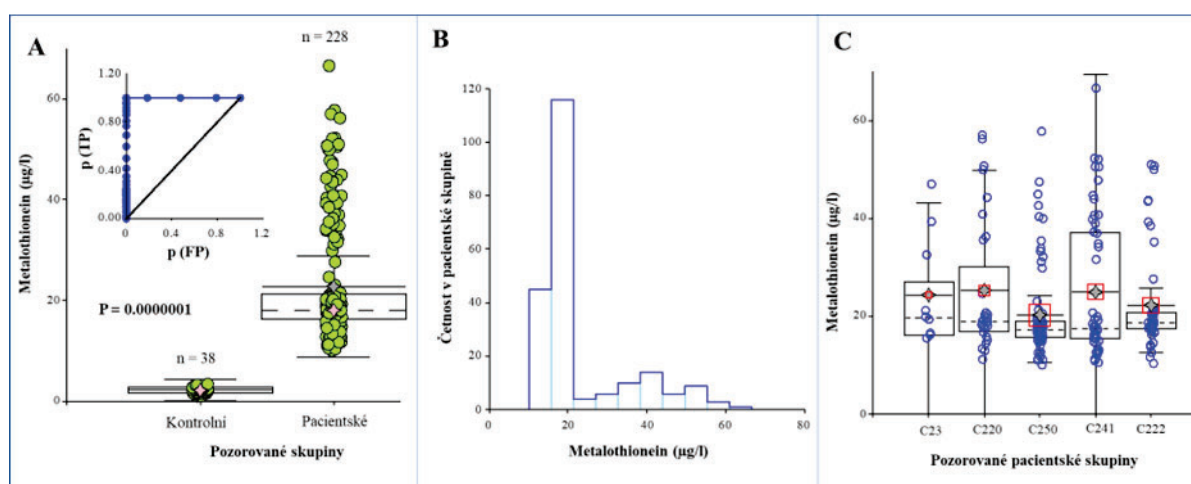
MT se pohybovaly v rozmezí 20–40 % (cit.^{65,74,75}). Výše uvedený postup a matematické vyhodnocení jsme se rozhodli aplikovat na elektrochemickou analýzu vzorků sér u pacientů. Získaný vzorek byl připravován podle námi optimalizovaného postupu (obr. 3A). Připravený vzorek byl ihned elektrochemicky analyzován a byl získán typický voltametrický signál s katalytickými signály Cat1 (pík 1); Cat2 (pík 2); Cat3 (pík 3). Na obr. 3B jsou ukázány typické voltametrické signály vzorků sér pacientů s diagnostikovaným nádorovým onemocněním (C23, C241, C250, C222, C220). Povedli jsme také modifikace výchozí metody přípravy vzorku změnou různých faktorů měření. Teplota denaturace je klíčovým bodem pro přípravu vzorku. Ve většině prací je k denaturaci vzorku používána teplota kolem bodu varu^{8,57,64}. V získané závislosti AUC signálů můžeme pozorovat efekt teploty denaturace biologického vzorku. Nedenaturovaný vzorek poskytuje elektrochemické signály všech elektroaktivních složek obsažených v biologickém vzorku. U teploty kolem 50 $^{\circ}\text{C}$ jsme pozorovali pokles signálů, pravděpodobně spojený s denaturací většiny bílkovin ve vzorku. U dalších denaturačních teplot došlo k postupnému nárůstu signálu mezi 70 a 80 $^{\circ}\text{C}$. Lze předpokládat, že pravděpodobně dochází ke změnám struktury proteinů. V procesu tepelné denaturace bílkovin je k dispozici více aminokyselinových zbytků interagujících s povrchem elektrody. U vyšších denaturač-

ních teplot byl pozorován nevýrazný pokles AUC sledovaných signálů. Změna potenciálů jednotlivých signálů nebyla příliš výrazná. Samozřejmě s přidávkem vzorku (množství analytu) jsou změny jednotlivých signálů typické a dochází k posunu potenciálu katalytických signálů, především píku 3. Čas vlastní denaturace nemá příliš výrazný vliv na změny voltamogramů.

Spojitosť nadměrné exprese MT s nádorovým onemocněním

V posledních letech je studována nadměrná exprese MT u různých nádorů. Jedná se o expresi dvou isoformů MT (konkrétně MT-1a a MT-2a). Nadměrná exprese těchto MT isoformů je převážně spojena s maligními nádory a je studována jako nový prognostický marker^{76,77}. Je známo, že zhoubné nádory (jater, slinivky a žlučníku) mají špatnou prognózu dlouhodobého přežití.

V námi zkoumaném souboru bylo analyzováno 228 vzorků pacientů (C220 11 %, C222 19 %, C241 14 %, C23 5 %, C250 51 % (obr. 4). Asi 30 % analyzovaných vzorků pacientů bylo analyzováno v režimu statim. Ze získaných AUC voltamogramů jsme určili koncentrace MT ve vzorcích. Bylo provedeno porovnání voltamogramů vzorků kontrolní skupiny a pacientů. Průměrná koncentrace MT u kontrolní skupiny ($n = 38$) byla $2,2 \pm 0,6$



Obr. 4. Pro porovnání normální a abnormální hladiny MT bylo použito sérum kontrolní skupiny ($n = 38$) s průměrem $2,2 \mu\text{g l}^{-1}$, medián $2,1 \mu\text{g l}^{-1}$ a pacientů s nádory ($n = 228$) s průměrem $22,7 \mu\text{g l}^{-1}$ a mediánem $18,1 \mu\text{g l}^{-1}$. Ve vloženém obrázku ROC křivka, p (FP) – pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku, p (TP) – pravděpodobnost pozitivního výsledku (A). Distribuční diagram četností jednotlivých koncentrací MT u testovaných patientských vzorků (B). Změna hladiny MT v séru pacientů s nádorovým onemocněním (C23, $n = 25$, průměrný věk = 70; C220, $n = 34$, průměrný věk = 32; C250, $n = 76$, průměrný věk = 69; C241, $n = 49$, průměrný věk = 69; C222, $n = 44$, průměrný věk = 4) určená elektrochemicky (C). Legenda: modré body představují jednotlivá měření pacientů; červený čtvereček je průměrná hodnota, velikost určuje počet analyzovaných případů. Další experimentální podrobnosti jsou uvedeny v části Materiál a Metody.

$\mu\text{g l}^{-1}$ s mediánem $2,1 \mu\text{g l}^{-1}$. Průměrná hladina MT u skupiny pacientů s diagnostikovaným zhoubným nádorem ($n = 228$) byla asi 10krát zvýšená ($22,7 \pm 11,7 \mu\text{g l}^{-1}$ s mediánem $18,1 \mu\text{g l}^{-1}$). Rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou pacientů byl statisticky vysoce průkazný ($P = 0,000001$)^{65,74}. ROC křivka ukazuje velmi dobrou citlivost a specifitu stanovení MT na námi analyzovaném souboru pacientů (obr. 4). Na obr. 4B je zobrazen frekvenční diagram hodnocených vzorků. Jak je zřejmé, většina hodnocených vzorků se pohybovala v oblasti koncentrací mezi 10 a $20 \mu\text{g l}^{-1}$. Na obr. 4C jsou shrnuty získané výsledky hladiny MT u pacientů se zhoubnými nádory v krabicových grafech: C23 ($n = 25$) s průměrem $24,3 \pm 11,2 \mu\text{g l}^{-1}$ (medián $11,6 \mu\text{g l}^{-1}$); C220 ($n = 34$) s průměrem $25,3 \pm 13,8 \mu\text{g l}^{-1}$ (medián $18,3 \mu\text{g l}^{-1}$); C250 ($n = 76$) s průměrem $20,3 \pm 9,3 \mu\text{g l}^{-1}$ (medián $17,3 \mu\text{g l}^{-1}$); C241 ($n = 49$) s průměrem $24,9 \pm 14,3 \mu\text{g l}^{-1}$ (medián $17,5 \mu\text{g l}^{-1}$); C222 ($n = 44$) s průměrem $22,3 \pm 10,2 \mu\text{g l}^{-1}$ (medián $18,8 \mu\text{g l}^{-1}$). Jak je na těchto výsledcích zřejmé, byla většina výsledků stanovené hladiny MT u pacientů s nádory C220, C250, C241 a C222 pod $20 \mu\text{g l}^{-1}$. Ve skupině pacientů C241, C222, C220 i C250 byly pozorovány velmi vysoké hladiny MT nad $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Provedená korelační analýza mezi vybranými analyty krevního séra (uvedeny v části Materiál) a MT ukázala silnou korelaci s nádorovým markerem CA19-9 ($r = -0,979$). Byl prokázán vztah mezi vybranými jaterními enzymy: ALT ($r = 0,594$); AST ($r = 0,513$) a ALP ($r = 0,560$) a hladinou MT.

Závěr

V této práci jsme se snažili poukázat na využití elektroanalytického stanovení metalothioneinů v krevním séru pacientů se zhoubným nádorem. Zvýšená hladina MT v séru u pacientů by mohla být novým markerem progresu u nádorového onemocnění. U pacientů s nádorovým onemocněním byly hladiny MT zvýšeny více než desetkrát v porovnání s kontrolní skupinou. V navazující experimentální práci bude sledována změna hladiny MT u primozáchtů v průběhu onemocnění a probíhající léčby. Velmi vysoké hladiny MT (nad $50 \mu\text{g l}^{-1}$) by měly být dále velmi pečlivě studovány s vazbou na průběh onemocnění. Z výše uvedeného vyplývá, že by se MT mohl stát také vhodným terapeutickým cílem u řady onemocnění.

Práce byla řešena jako součást projektu Liga proti rakovině Praha a EURO-CHOLANGIO-NET: The European Cholangiocarcinoma Network (CA18122). Naše velké poděkování patří panu RNDr. Josefovi Růžičkovi za vytváření laboratorní databáze a algoritmů pro vyhodnocování experimentálních dat.

Zkratky

MT	metalothioneiny
SH	sulfhydrylová skupina
GIF	růstový inhibiční faktor
MTF-1	metal transkripční faktor
MRE	metal responsive element

DPV	diferenční pulzní voltametrie
AdTS CPSA	adsorptivní přenosová technika kombinovaná s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou za konstantního proudu
ELISA	enzymová imunoanalýza
R.S.D.	relativní standardní odchylka
AUC	plocha pod křivkou
ALT	alaninaminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
ALP	alkalická fosfatasa
CA 19-9	nádorový marker ze skupiny glycidových antigenů. Není nádorově ani orgánově specifický
SOP	standardní operační postup

LITERATURA

- Kagi J. H. R., Schaffer A.: *Biochemistry* 27, 8509 (1988).
- Nordberg M., Nordberg G. F.: *Biomolecules* 12, 360 (2022).
- Margoshes M., Vallee B. L. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813 (1957).
- Kagi J. H. R., Kojima Y.: *Experientia. Suppl.* 52, 25 (1987).
- Kojima Y.: *Methods Enzymol.* 205, 8 (1991).
- Binz P. A., Kagi J. H. R.: *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel 1999.
- Krizkova S., Masarik M., Majzlik P., Kukacka J., Kruseova J., Adam V., Prusa R., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R.: *Acta Biochim. Pol.* 57, 561 (2010).
- Tariba B., Zivkovic T., Krasnici N., Marijic V. F., Erk M., Gamulin M., Grgic M., Pizent A.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 75, 813 (2015).
- Fabrik I., Kukacka J., Baloun J., Sotornik I., Adam V., Prusa R., Vajtr D., Babula P., Kizek R.: *Electroanalysis* 21, 650 (2009).
- Nakayama A., Fukuda H., Ebara M., Hamasaki H., Nakajima K., Sakurai H.: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 426 (2002).
- Vilanova A., Gutierrez C., Serrat N., Raga X., Paternain J. L.: *Clin. Biochem.* 30, 235 (1997).
- Milnerowicz H., Jablonowska M., Bizon A.: *Pancreas* 38, 681 (2009).
- Tamai Y., Iwasa M., Eguchi A., Shigefuku R., Sugimoto K., Hasegawa H., Takei Y.: *PLoS One* 15, e0237370 (2020).
- Krejčova L. a 14 spoluautorů: *Int. J. Electrochem. Sci.* 7, 1767 (2012).
- Tariba B., Zivkovic T., Marijic V. F., Erk M., Gamulin M., Pizent A.: *Archiv. Med. Res.* 47, 232 (2016).
- Si M. F., Lang J. H.: *J. Hem. Oncol.* 11, 107 (2018).
- Akintola D. F., Sampson B., Fleck A.: *J. Lab. Clin. Med.* 126, 119 (1995).
- Yadav V. S., Mir R. A., Bhatia A., Yadav R., Shadang M., Chauhan S. S., Dhingra K., Kharbanda O. P., Yadav R., Garg R.: *J. Periodont.* 92, 1329 (2021).
- Milnerowicz H., Nowak P., Wielogorska D., Wochynski Z., Sobiech K. A.: *Biol. Sport* 21, 81 (2004).
- Nordberg G. F., Garvey J. S., Chang C. C.: *Environment. Res.* 28, 179 (1982).
- Swierczek S., Abuknesha R. A., Chivers I., Baranovska I., Cunningham P., Price R. G.: *Biomarkers* 9, 331 (2004).
- Wolf C., Strenziok R., Kyriakopoulos A.: *Anal. Chim. Acta* 631, 218 (2009).
- Sekovanić A., Piasek M., Orct T., Sulimanec Grgec A., Matek Sarić M., Stasenko S., Jurasović J.: *Biomolecules* 10, 821 (2020).
- Nordberg M., Nordberg G. F.: *Met. Ions Life Sci.* 5, 1 (2009).
- Tohyama C., Shaikh Z. A., Ellis K. J., Cohn S. H.: *Toxicology* 22, 181 (1981).
- Tohyama C., Shaikh Z. A., Nogawa K., Kobayashi E., Honda R.: *Toxicology* 20, 289 (1981).
- Tohyama C., Shaikh Z. A., Nogawa K., Kobayashi E., Honda R.: *Arch. Toxicol.* 50, 159 (1982).
- Acharya P. a 10 spoluautorů: medRxiv 2022.05.30.22275767 (2022).
- Li X. Y. a 10 spoluautorů: *Front. Endocrinol.* 13, 951093 (2022).
- Milnerowicz H., Chmerek M., Rabczynski J., Milnerowicz S., Nabzdyk S., Knast W.: *Pancreas* 29, 28 (2004).
- Zelena J., Potesil D., Vacek J., Adam V., Hradecky J., Prusa R., Kizek R., Vojtesek B.: *Klin. Onkol.* 17, 190 (2004).
- Petrlova J. a 10 spoluautorů: *Klin. Onkol.* 19, 138 (2006).
- Fabrik I., Adam V., Krizkova S., Kukacka J., Prusa R., Trnkova L., Kizek R.: *Klin. Onkol.* 20, 384 (2007).
- Bizon A., Jedryczko K., Milnerowicz H.: *Postepy Hig. Med. Dosw.* 71, 98 (2017).
- Priante E., Pietropoli E., Piva E., Santovito G., Schumann S., Irato P.: *Int. J. Mol. Sci.* 23, 12001 (2022).
- Sztalmachová M., Gumulec J., Cernei N., Hlavna M., Zítka O., Babula P., Adam V., Kizek R., Masařík M.: *Chem. Listy* 106, 1075 (2012).
- Kizek R., Vacek J., Adam V., Vojtesek B.: *Klin. Biochem. Metab.* 12, 72 (2004).
- Goncharova E. I., Rossman T. G.: *Cancer Res.* 54, 5310 (1994).
- Kelly S. L., Basu A., Teicher B. A., Hacker M. P., Hamer D. H., Lazo J. S.: *Science* 241, 1813 (1988).
- Weinlich G., Bitterlich W., Mayr V., Fritsch P. O., Zelger B.: *Brith. J. Dermatol.* 149, 535 (2003).
- Bier B., Douglas-Jones A. G., Totsh M., Dockhorn-Dworniczak B., Böcker W., Jasani B., Schmid K. W.: *Breast Cancer Res. Treat.* 30, 213 (1994).
- Zelger B., Sidoroff A., Hopfl R., Ofner D., Jasani B., Schmid K. W.: *Appl. Immunohistochem.* 2, 254 (1993).
- Huang G. W., Yang L. Y.: *World J. Gastroenterol.* 8, 650 (2002).
- Ohsio G., Imamura T., Okada N., Wang Z. H., Yamaki K., Kyogoku T., Suwa H., Yamabe H., Imamura M.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122, 351 (1996).
- Vodičková H., Pacáková V., Šestáková I., Mader P.: *Chem. Listy* 95, 477 (2001).
- Brdicka R.: *Nature* 139, 1020 (1937).

47. Brdicka R.: *Nature* 139, 330 (1937).
48. Heyrovsky J.: *Nature* 142, 317 (1938).
49. Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Klejdus B., Havel L.: *Chem. Listy* 98, 166 (2004).
50. Olafson R. W.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 19, 111 (1988).
51. Olafson R. W., Olsson P. E.: *Methods Enzymol.* 205, 205 (1991).
52. Olafson R. W., Sim R. G.: *Anal. Biochem.* 100, 343 (1979).
53. Sestakova I., Navratil T.: *Bioinorg. Chem. Appl.* 3, 43 (2005).
54. Thompson J. A. J., Cosson R. P.: *Marine Environ. Res.* 11, 137 (1984).
55. Dabrio M., Rodríguez A. R., Bordin G., Bebianno M. J., De Ley M., Šestáková I., Vašák M., Nordberg M.: *J. Inorg. Biochem.* 88, 123 (2002).
56. Gunn A. P., McLean C. A., Crouch P. J., Roberts B. R.: *Anal. Biochem.* 630, 114326 (2021).
57. Trnkova L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry* 56, 57 (2002).
58. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
59. Prusa R., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Zehnalek J.: *Clin. Chem.* 50, A28 (2004).
60. Jasani B., Elmes M. E.: *Methods Enzymol.* 205, 95 (1993).
61. Docekalova M. a 11 spoluautorů: *8th International Conference on Nanomaterials - Research and Application (NANOCON)*, str. 429, 2016.
62. Li X. J., Wang Y. S., Yang S. Y., Tang X., Liu L., Zhou B., Wang X. F., Zhu Y. F., Huang Y. Q., He S. Z.: *Microchim. Acta* 183, 2123 (2016).
63. Zhang Y., Hao J. X., Xu X. J., Chen X. W., Wang J. H.: *Anal. Chem.* 92, 2080 (2020).
64. Petrlova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trnkova L., Jelen F., Prusa R., Kukacka J., Kizek R.: *Electrochim. Acta* 51, 5112 (2006).
65. Skotak V., Sehnal K., Banas D., Stankova M., Hosnedlova B., Ruttkay-Nedecky B., Kepinska M., Parak T., Kizek R.: *Czech. Chem. Soc. Symp. Ser. (72. sjezd chemických společností)* 18, 131 (2020).
66. Hubaux A., Vos G.: *Anal. Chem.* 42, 849 (1970).
67. Kolthoff I. M., Yamashita K., Hie T. B., Kanbe A.: *J. Electroanal. Chem.* 58, 375 (1975).
68. Kolthoff I. M., Yamashita K., Hie T. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2044 (1975).
69. Kolthoff I. M., Stricks W., Tanaka N.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 4739 (1955).
70. Banica F. G., Spataru N., Spataru T.: *Electroanalysis* 9, 1341 (1997).
71. Banica F. G., Fogg A. G., Moreira J. C.: *Analyst* 119, 2343 (1994).
72. El Hourch M., Dudoit A., Amiard J. C.: *Electrochim. Acta* 48, 4083 (2003).
73. Prusa R., Blastik O., Potesil D., Trnkova L., Zehnalek J., Adam V., Petrlova J., Jelen F., Kizek R.: *Clin. Chem.* 51, A (2005).
74. Skotak V., Hosnedlova B., Ruttkay-Nedecky B., Parak T., Kizek R.: *Spring Electrochemical Meeting*, organised by the Czechoslovak Student Chapter of the Electrochemical Society, 20. 5. 2021, str. 1.
75. Skotak V., Hosnedlova B., Kepinska M., Jakubek M., Parak T., Kizek R.: *XL. Moderní elektrochemické metody*, Sborník přednášek, Jeřichovice, 8.-12. listopadu 2021, str. 218.
76. Douglas-Jones A. G., Schmid, K. W. S., Bier B., Horgan K., Lyons K., Dallimore N. D., Moneypenny I. J., Jasani B.: *Hum. Pathol.* 26, 217 (1995).
77. Joseph M. G., Banerjee D., Kocha W., Feld R., Stitt L. W., Cherian M. G.: *Cancer* 92, 836 (2001).

L. Melich^a, M. Fořtová^a, B. Hosnedlová^b, J. Podhajský^a, O. Rychlý^a, J. Werle^a, K. Burešová^a, L. Vysloužilová^c, K. Dunovská^a, E. Klapková^a, K. Kotaška^a, J. Čepová^a, B. Jedličková^a, O. Štěpánková^c, R. Průša^a, and R. Kizek^a (^a Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, ^b BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, Vestec, ^c Department of Bio-medical Engineering and Assistive Technology, Czech Institute of Informatics, Robotics and Cybernetics, Czech Technical University, Prague, Czech Republic): **Study of Metallothionein Levels in the Serum of Patients with Malignant Tumour**

Metallothionein (MT) is a low molecular weight intracellular protein, the primary function of which is to maintain the homeostasis of heavy metals in living organisms. Only a few research has been carried on the topic molecular mechanism of MT. Recent research points to its significant relationship to carcinogenesis, spontaneous mutagenesis, and the effectiveness of antitumor drugs. Increased level of MT is studied as a potential indicator of increased metabolic activity in cancer. Electrochemical methods are a suitable analytical tool for MT detection. Temperature-denatured blood serum samples of patients diagnosed with cancer were studied using electrochemical analysis (Brdicka's reaction). The obtained voltammograms were evaluated as the area under the curve (AUC response). To compare normal and abnormal MT levels, control serum of healthy probands ($n = 38$) with an average MT amount of $2.2 \mu\text{g L}^{-1}$, median $2.1 \mu\text{g L}^{-1}$ was used. In all evaluated blood serum samples of cancer patients ($n = 228$), the average amount of MT was $22.7 \mu\text{g L}^{-1}$, and the median was $18.1 \mu\text{g L}^{-1}$. The difference (10-fold) between groups was highly statistically significant. The data obtained from the pilot experiment suggest that the levels of thiol compounds such as MT may have clinical potential in cancer patients.

Keywords: metallomics, cancer of the liver, pancreas, gall bladder, diagnosis, prognostic marker, electrochemical analysis, Brdicka's reaction

HUMINOVÉ LÁTKY, CHARAKTERIZACE A NÁZVOSLOVNÉ DOPORUČENÍ

PAVEL DRAŠAR^a, JOSEF KOZLER^c a OLDŘICH PALETA^b

^a Ústav chemie přírodních látek, ^b Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c MikroChem LKT spol. s.r.o., Přesecka 52, 379 01 Třeboň, Česká republika
drasarp@vscht.cz, kozler@mikrochem.cz, paletao@vscht.cz

Klíčová slova: huminové látky, humin, huminové a humové kyseliny, fulvinové a fulvové kyseliny, fulvokyseliny

Huminové látky (dále jen HS; Humic Substances)¹ jsou látky, které jsou známy a využívány pro svou vysokou chemickou a biochemickou aktivitu, neboť jsou schopny svou přítomností výrazně ovlivňovat mnohé chemické a biochemické procesy. Struktura, chemické a fyzikální vlastnosti a biologická aktivita HS jsou stále předmětem intenzivního výzkumu. Tyto parametry jsou závislé na původu HS a způsobu jejich izolace z výchozích (přírodních) surovin. Pro HS existuje určité sjednocující hledisko (jedná se o makromolekulární sloučeniny, řada shodných funkčních skupin, rozpustnost v alkalickém prostředí a omezená rozpustnost v kyselém prostředí, schopnost vázání vícemocných kationtů atd.), ale existuje též řada kvalitativních parametrů (strukturních, fyzikálních, chemických, biologických atd.), v nichž se HS liší, jako důvody jsou buď původ z různých přírodních zdrojů nebo užití různých postupů jejich přípravy.

Obecně je možno říci, že dosavadní výzkum využití HS je založen převážně na empirické bázi. Důvodem jsou chybějící komplexní znalosti o strukturních parametrech HS. Tím je poměrně značně omezeno vyvozování exaktních závěrů a prognóz o principech jejich působení v biochemických a chemických procesech.

Významným zdrojem HS jsou kaustobiolity – rašelina, lignit a zejména zoxidovaná mladá hnědá uhlí, tzv. oxyhumolity. V České republice jsou jedny z nejkvalitnějších oxyhumolitů na světě. Molekulová hmotnost HS se pohybuje v rozmezí 2 000 až 200 000 g mol⁻¹. Zpravidla bývají v přírodních surovinách hlavní složkou HS humové kyseliny (dříve huminové, dále jen HA), vedlejší složkou fulvové kyseliny (dříve fulvokyseliny, dále jen FA). FA jsou ve vodě rozpustné, HA jsou ve vodě jen omezeně rozpustné a jejich rozpustnost stoupá se zvyšujícím se pH.

HS jsou tvořeny řadou stavebních jednotek, přičemž vedle větších fragmentů ligninu, polysacharidů, jednoduchých cukrů a proteinů mají ve svých molekulách především aromatické polykarboxylové kyseliny, struktury se skupinami –OH, chinony, heterocykly obsahující O a N a různé aminokyseliny. Tyto části molekul jsou propojeny různými můstky (–O–, –NH–, –N=, –CH₂–, –C(=O)–, –S– a také delšími uhlovodíkovými řetězci), jejichž množství je ve velmi rozdílném poměru.

Chemická struktura přírodních HA je velmi složitá. Strukturní vzorce, resp. části strukturních vzorců, jsou konstruovány na základě kvantitativního stanovení základních stavebních jednotek a funkčních skupin. Wilson² publikoval 8 komplexních fragmentů, které předpokládá ze studií huminových látek z jihovýchodní Georgie pomocí NMR. Pro HS pocházející z přírodních zdrojů v ČR nebyla dosud taková studie prováděna, lze však předpokládat vysoký stupeň podobnosti.

Obsah karboxylových a fenolových hydroxyskupin, tzv. aktivního vodíku, se u HS pohybuje v rozmezí 3 až 10 meq g⁻¹ v závislosti na původu uhlíkaté suroviny a způsobu jejího zpracování. Přítomnost chinoidních skupin vysvětluje schopnost HS vázat aminokyseliny, např. vodíkovou vazbou. V chemických a fyzikálních procesech se uplatňuje schopnost HS vázat velmi ochotně ionty a plyny s volnými elektronovými páry. HS se chovají díky svým karboxylovým a kyselým fenolickým funkčním skupinám jako slabě kyselé katexy s vysokou výměnnou kapacitou. Pevnost vazby anorganických kationtů na HS se výrazně liší a je ovlivněna mocností a velikostí hydratačních obalů kationtů.

Částice obsahující HS mají velký vnitřní povrch, jehož dutiny jsou vzájemně pospojovány kanálky, ve kterých se zachycují ionty i molekuly. Ty jsou zde vázány nekovalentními interakcemi. Sorpční vlastnosti umožňují HS vytvářet velmi stabilní agregáty s jíly, např. bentonity a zeolity. Humáty alkalických kovů jsou dobře rozpustné ve vodě.

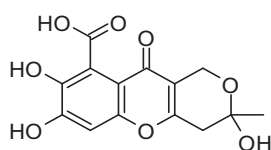
Vzhledem k jejich komplexní struktuře jsou data o jejich biologických účincích omezená, přesto ale ukazují na řadu zajímavých efektů. V roce 2000 schválil Center for Food Safety and Applied Nutrition (US Food and Drug Administration – FDA) humifulvát (produkt získávaný alkalickou extrakcí rašeliny těžené v oblasti Balatonu) jako bezpečné dietetikum (Dietary Ingredient) a povolil prodej těchto preparátů ve Spojených státech³. Podobné látky jsou k dispozici jako dietetika také ve většině států Evropy. Jedná se obvykle o humát (humifulvát) draselný nebo jeho chelát s řadou dalších stopových prvků. Evropská unie povolila přidávání humové kyseliny a její sodné soli do krmiv pro všechny druhy zvířat určených

k produkci potravin⁴, případně jako hnojiva a půdní přípravky^{5,6}. HS se uplatňují i v medicíně a kosmetice⁷.

Humínové látky (HS) nejsou prozatím, stran nomenklatury, kodifikovány na základě názvoslovných doporučení IUPAC. Pokud se obrátíme na angličtinu, která je do značné míry kodifikována zápisem názvů do registru CAS, uvidíme zde termíny: humic substances (HS), humin, humic acids (HA), fulvic acids (FA), fulvic acid, fulvonic acid, fulvic acid a fulvic substances. Ale ani tam to není jednoduché a není to však jednoduché ani v češtině⁸.

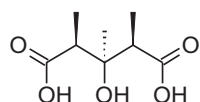
Podívejme se nejprve na anglické termíny. International Humic Substance Society (IHSS) používá termíny Humic a Fulvic Acids⁹. Pokud se týče strukturních předstáv, jsou různorodé¹⁰ a u složitějších látek spíše navozují představu, z jakých komponent se dané látky mohou skládat.

U dalších látek je to složitější. Fulvic acid je v CA citována více než 25 000×, ale její CAS RN 479-66-3 jen 1200× v pracích, které mají vztah k rašelině a rozkladným produktům rostlin. Je spojována s látkou se systematickým názvem 4,10-dihydro-3,7,8-trihydroxy-3-methyl-10-oxo-1*H*,3*H*-pyrano[4,3-*b*]benzo-pyran-9-karboxylová kyselina. PubChem spojuje termín fulvic acid s výše popsanou látkou a ukazuje na 1820 prací a 793 patentů.



4,10-dihydro-3,7,8-trihydroxy-3-methyl-10-oxo-1*H*,3*H*-pyrano[4,3-*b*]benzo-pyran-9-karboxylová kyselina

Podívejme se i na názvoslovně příbuzné termíny. Fulvic acid (necic acid, 2,4-dideoxy-2,4-dimethyl-3-*C*-methylxylarová kyselina) je registrována pod CAS RN 41478-07-3.



2,4-dideoxy-2,4-dimethyl-3-*C*-methylxylarová kyselina

Tato látka je v CA uváděna v 17 pracích, z nichž značná část má souvislost s půdou a huminovými látkami. Termín fulvic acid v PubChem vede na strukturu a název fulvic acid.

Fulvonic acid (CAS RN 11029-39-3, bez struktury a bližší definice) se vyskytuje v CA v 9 pracích, z nichž některé mají vztah k rašelině a rozkladným produktům rostlin. V PubChem termín fulvonic acid zobrazují 3 maďarské patenty související s rozkladem rostlinného materiálu.

Termín fulvic acids je registrován jako CAS RN 308066-67-3, bez bližší definice a není k němu přiřazen

žádný dokument. Fulvic acids vede v PubChem na 758 prací a 45 patentů.

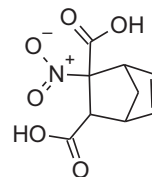
Fulvic substances též jako CAS RN 308066-67-3, Oxi-fulvic acid, Soil organic matter, a není k němu přiřazen žádný dokument. V PubChem vede tento název na 20 citací, souvisejících s rozkladem rostlinného materiálu.

V literatuře se vyskytující termín fulvo acid není v CA registrován, protože je zkracován na FA a týká se huminových látek; usuzujeme, že je ekvivalentem českého fulvokyseliny.

CAS RN 1561845-42-8 má přidělen termín fulvol acetate s jednou citací, přičemž fulvol registrován není a ten, který je součástí fulvol acetate, je norseskviterpen.

Termín humic acids má CAS RN 1415-93-6 (ulmic acids, soil organic matter, humic acid, humic substances) a není k němu přiřazen žádný dokument. Termín je popisován jako: *The brown polymeric product from the decomposition of organic matter, particularly dead plants. This combination of polymers may contain aromatic and heterocyclic structures, carboxy groups, and nitrogen.* Termín je však obsažen v 54 registracích CAS jako součást směsí a vede na 4062 citací. Humic acid vede v PubChem na CAS RN 308067-45-0, které v CAS vede na termín humic acids, nitro-, nitrohumic bez přiřazených citací.

V PubChem je reprezentován jako 2-nitrobicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dikarboxylová kyselina s 5630 citacemi a 2426 patenty.



2-nitrobicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dikarboxylová kyselina

Pod termínem humin(s) najdeme v CA 7363 článků, termín ale nemá CAS RN a není definován.

V češtině nalezneme pro huminové látky řadu, poťazmo, degenerovaných a z letného překladu z angličtiny vzniklých názvů. Nalezneme názvy jako fulvokyseliny, kyselina fulvicá, fulvicová, fulvinová, fulvonová, fulvová aj., podobně nalezneme názvy jako huminová, humová kyselina a to v dílech lidových i akademických.

Terminologie půdních látek je samozřejmě starého data. Zabýval se jí již Amerling v roce 1854 (cit.¹¹, obr. 1) a pokoušel se dát české terminologii určitý řád a souznění s názvoslovím německým.

Přejdeme tedy k názvoslovnému doporučení, které vychází z anglického Humic a Fulvic Acid a z rozdělení huminových látek podle barvy a rozpustnosti¹². Alkalický extrakt půdního vzorku budí tmavohnědá „směs huminových látek“ a nerozpustný podíl pak černý „humín“ (lat. *humus* – půda). V kyselém prostředí nerozpustná část směsí huminových látek jsou pak černohnědé „humové kyseliny“. Podíl v alkoholu rozpustné minoritní složky

Jestli že jsme pochopili, jak prst povstává, tedy snadno nahlédneme, že jest to směs rozlično-stupenních rozloučenin hmot živočných; prst den co den se mění, vodík uchází a i uhlík v způsobě vody a uhelce.

Dotčené rozličné stupně slují jilmovina (Ulmín), prstovina (Humín), jilmovinec (Ulmínsäure), prstovinec (Humínsäure), zeměkys (Geínsäure), zřídlec (Quellsäure), ssedlinec (Quellsäure), a v tomtěz pořádku jedna hmota z druhé se tvoří; 2 poslední kysy roztekají ve vodě a jsou dílem příčinou, že voda bahnatá a rybní barvu žlutou neb hnědou má; 3 kysy předcházející roztekají toliko tenkrát, když k vodě žiravinu se přidá; ulmín a humín ani vodou ani žiravinami rozpustiti se nedají.

Protož tím slovem prst myslíme si směs hnědých dílem rozpustných, dílem nerozpustných, dílem kyselých, dílem obojetných tlejících hmot, jenž ve vzduchu, světle a vlhku neustále dále se rozlučují a při tom uhlíc č. uhličitec a vodu vydávají.

Obr. 1. Amerlingův text o půdních látkách

humových kyselin je směs „hymatomelanových kyselin“, které jsou hnědé se žlutým nádechem. V kyselém prostředí rozpustná část směsi huminových látek jsou pak „fulvové kyseliny“, jež jsou žluté až hnědožluté (lat. fulvus – hnědožlutý). Doporučujeme termín fulvové kyseliny i tam, kde je dnes používán termín fulvokyseliny. Doporučením termínu humové a fulvové se snažíme udržet souvislost s anglickými termíny humic a fulvic. Zdůrazňujeme použi-

tím množného čísla i fakt, že se jedná o směsi látek, jejichž chemické složení může být proměnlivé, a to i přesto, že mají registrační čísla CAS.

Toto názvoslovné doporučení vychází z per členů názvoslovné komise pro organickou chemii ČSCH (OP a PD) a celoživotního specialisty na dotčenou oblast (JK) a předpokládá, alespoň pro češtinu, utřídění názvoslovných termínů.

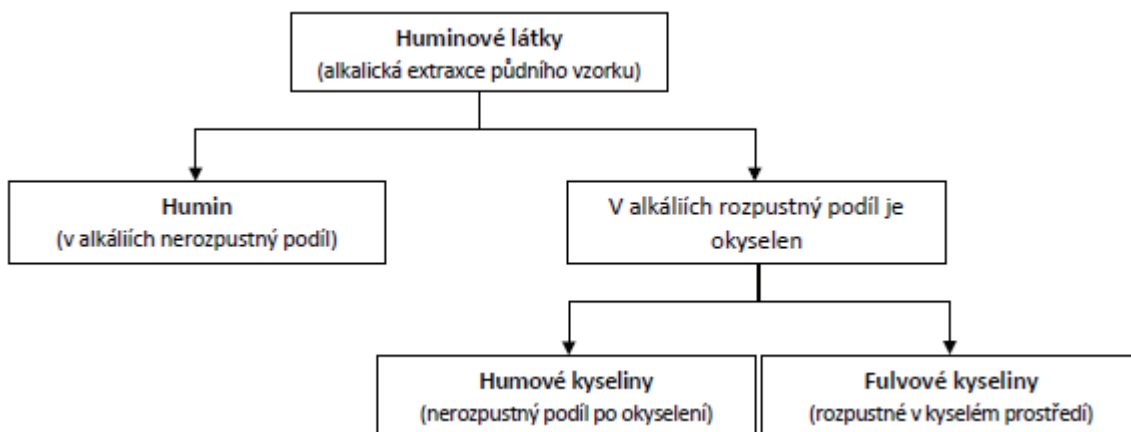


Schéma 1.

LITERATURA

1. Hessen D. O., Tranvik L. J. (ed.): *Aquatic Humic Substances, Ecology and Biogeochemistry*, Springer-Verlag, Berlin 1998.
2. Wilson M. A., Vassallo A. M., Perdue E. M., Reuter J. H.: *Anal. Chem.* 59, 551 (1987).
3. 75-Day Premarket Notifications for New Dietary Ingredients (PDF); <https://www.fda.gov/media/160660/download>, staženo 22. 5. 2023.
4. Nařízení komise (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009.
5. Rozhodnutí komise (EU) 2016/286 ze dne 1. října 2014.
6. Nařízení komise v přenesené pravomoci (EU) 2022/973 ze dne 14. března 2022.
7. Šmídová H.: *Průzkum aplikací huminových kyselin v medicíně a kosmetice. Bakalářská práce*. Vysoké učení technické v Brně, Brno 2010.
8. Tyl P., Řimnáč M., Špánek R., Štuller J., Linková Z., Kozler J., Antošová B., Váňa V.: *Tvorba ontologie huminových látek*, Technical report No. 1098, Institute of Computer Science, Academy of Sciences of the Czech Republic, Praha 2010; <https://invenio.nusl.cz/record/42373/files/content.csg.pdf>, staženo 22. 5. 2023.
9. <https://humic-substances.org/>, staženo 4. 8. 2022.
10. Jurášek M., Cabalka J., Drašar P.: *Chem. Listy* 117, 547 (2023).
11. Amerling K.: *Lučební základové hospodářství a řemeslnictví. Ku prospěchu čekatelům promyslných škol. Lučba organická*. B. Rohlíček, Praha 1854.
12. Stevenson F.J.: *Humus Chemistry*. John Wiley and Sons, New York 1982.

PARAMETRY A POTENCIÁL REVITALIZACE NEVYUŽÍVANÝCH PRŮMYSLOVÝCH PLOCH (BROWNFIELDŮ) PRO VÝROBU VODÍKU

PETR POLÍVKA a MARTIN ŠILHAN

Centrum výzkumu Řež s.r.o., Hlavní 130, 250 68 Husinec-Řež, Česká republika
petr.polivka@cvrez.cz

Došlo 8.3.23, přijato 18.6.23

Článek charakterizuje existující nevyužívané průmyslové plochy, tzv. brownfieldy, z hlediska jejich aplikovatelnosti pro výrobu vodíku, se zaměřením na elektrolytickou výrobu vodíku. Článek také odhaduje budoucí plochy brownfieldů pro zajištění výroby vodíku v ČR.

Klíčová slova: brownfield, vodík, elektrolyza, obnovitelné zdroje energie

Obsah

1. Úvod
2. Charakterizace brownfieldů
 - 2.1. Dopravní konektivita brownfieldů
 - 2.2. Síťová vybavenost a datová konektivita brownfieldů
 - 2.2.1. Distribuční síť elektrické energie
 - 2.2.2. Vytápění
 - 2.2.3. Chlazení
 - 2.2.4. Vodovod
 - 2.2.5. Kanalizace
 - 2.2.6. Datová konektivita
 - 2.2.7. Zdroj elektřiny
3. Databáze brownfieldů v ČR
4. Potřebná plocha brownfieldů v ČR
5. Závěr

1. Úvod

Výroba nízkoemisního vodíku a rozvoj vodíkových technologií jsou klíčové pro snižování emisí skleníkových plynů v energetice, průmyslu a dopravě. Předkládaná publikace je zaměřena na charakterizaci průmyslových ploch, tzv. brownfieldů a na návrh kritérií pro výběr vhodné lokality pro výrobu vodíku, především technologií elektrolyzy vody. Elektrolytická výroba vodíku je nenáročná z hlediska požadavků na vybavenost lokality. Ve spojení s nízkoemisním zdrojem energie, jako je fotovoltaická elektrárna (FVE), produkuje elektrolyza nízkoemisní vodík.

Podle Vodíkové strategie České republiky¹ se očekává budoucí značný význam a rozvoj elektrolytické výroby vodíku jako záměna za fosilní paliva. Těto technologií je zde věnována zvýšená pozornost pro možnosti využití potenciálu stávajících brownfieldů.

2. Charakterizace brownfieldů

Brownfieldy je možné definovat jako nemovitosti, které jsou morálně zastaralé a již se nevyužívají, jsou zanedbané anebo mohou být (chemicky, biologicky, popř. radiačně) kontaminovány. Nemovitost může tvořit samotný pozemek, objekt, areál, soubor průmyslových areálů či zemědělská území. Brownfield obvykle vzniká jako pozůstatek průmyslové, zemědělské, rezidenční, vojenské či jiné aktivity a bývá v nedostatečně využívaném stavu nebo odstaven a zakonzervován. Potom nelze brownfield vhodně a efektivně využívat. K opětovnému používání brownfieldu je nutná jeho regenerace či revitalizace, jejímž cílem je odpovědné zacházení s půdním fondem, zabránění znehodnocování kvalitní zemědělské půdy a naopak vdechnutí nového života starým průmyslovým areálům. Základní parametry pro využitelnost brownfieldu představují dostupnost a konektivita místa.

2.1. Dopravní konektivita brownfieldů

Brownfieldy jsou obvykle dobře dostupné pro silniční dopravu, někdy mají také formálně nebo plně funkční železniční vlečku, popřípadě přístav. Prostor brownfieldů lze využít buď pro výrobu vodíku jako paliva, pro plnění vodíku do vozidel nebo pro oba případy současně. Dopravní konektivita je jedním ze zásadních aspektů, pokud nebude vytvářen samostatný „ostrovni“ výrobní systém, který představuje výrobu a spotřebu vodíku v jednom místě. Zároveň je lokalizačním faktorem také blízkost dalších významných přepravních tras, aby byl zajištěn odbyt vodíku pro dopravu.

Podle Vodíkové strategie České republiky¹ se očekává, že velmi významná část vodíku bude spotřebována nákladní dopravou. Z tohoto důvodu je pro brownfield klíčové umístění poblíž frekventované silnice, ideálně

u dálnice nebo silnice I. třídy, frekventované silnice II. třídy nebo u městských aglomerací. Výroba vodíku přímo v místě brownfieldu výrazně snižuje vzdálenost pro přepravu vodíku a s ní spojené finanční náklady, emise přepravy a uhlíkovou stopu.

Pro využití plochy brownfieldu pro transport vodíku je vhodná existence železniční vlečky. Při její přítomnosti existuje možnost využití pro plnění vodíkových vlakových souprav nebo posunovacích lokomotiv, pokud se v blízkosti nachází neelektrifikovaná trať. Pro import nízkoemisního vodíku z oblasti Severního moře lze v ČR teoreticky uvažovat o lodní dopravě po splavných úsecích Labe a o využití nepoužívaných ploch v přístavech na této trase.

2.2. Síťová vybavenost a datová konektivita brownfieldů

2.2.1. Distribuční síť elektrické energie

Přístup ke zdroji elektřiny má zásadní význam pro využitelnost brownfieldu. Elektřina může pocházet z lokálního zdroje, např. FVE nebo z distribuční sítě elektrické energie.

V případě elektrolytické výroby vodíku z vody se předpokládá, že největší podíl spotřeby elektrické energie (tj. elektřina pro elektrolyzu) nebude pocházet z distribuční sítě, ale z lokálního nízkoemisního zdroje, jako je např. FVE, bioplynová stanice, vodní, popřípadě větrná elektrárna nebo geotermální energie. Zároveň se předpokládá, že dodávky elektřiny z obnovitelného zdroje elektřiny (OZE) mohou mít přerušovaný provoz, a proto nedojde k plnému odpojení brownfieldu od distribuční elektrické sítě pro zachování stability dodávek pro regulační a pomocné prvky, které je z mnoha důvodů výhodné provozovat kontinuálně a pro které postačuje zlomkové množství elektrické energie oproti elektrolytickému procesu. Výhodou zde nastíněného uspořádání je prakticky úplná absence poplatků za distribuci elektrické energie při výrobě vodíku a zároveň kontinuální dodávka nezbytného množství elektrické energie pro regulační a pomocné prvky. Úplného oddělení od distribuční sítě (ostrovní systém) lze dosáhnout instalací dostatečně dimenzované akumulace elektřiny, která však investičními náklady vysoce přesahuje kombinaci elektřiny z OZE pro elektrolyzu doplněnou o elektřinu z distribuční sítě pro regulační prvky.

V případě lokálních OZE je také možné uvažovat o nadvýrobě elektrické energie. Prodej přebytků elektrické energie z OZE do distribuční sítě je obvykle usnadněn, pokud je brownfield vybaven vlastním transformátorem, který obvykle pracuje na napěťové hladině 22/0,4 kV. Připojení pomocí vlastního transformátoru nemá vliv na výkupní cenu elektrické energie, ale obvykle usnadní připojení do distribuční sítě – na napěťové hladině 22 kV existuje větší variabilita pro přípojná místa než na hladině 400 V, navíc je možné transformátor (22/0,4 kV) na tržní bázi pronajmout dalším subjektům a využít tak energetické synergie. V případě velkých přebytků elektrické energie a blízkosti sítě vyšší napěťové hladiny (110 kV) je možné uvažovat i o využití transformátoru (110/22 kV). To je ale

již značně nákladné zařízení, pro které je nutné nalézt odpovídající využití. Vždy je nutné zjistit lokální podmínky a možnost umístění lokálního nízkoemisního zdroje, který vyžaduje mimo jiné soulad s územním plánem obce, souhlas dotčené obce, souhlas distributora elektrické energie apod.

2.2.2. Vytápění

Výroba vodíku elektrolyzou je endotermický proces. Pro nízkoteplotní elektrolyzu je vytápění poměrně nevýznamný faktor celkové bilance. Důležité je, aby voda v elektrolyzáru nezmrzla, tj. aby byl elektrolyzáru uchovávan v teplotách nad bodem mrazu. K podobnému nežádoucímu provoznímu stavu může dojít v zimním období, kdy na FVE napadne vrstva sněhu a elektrárna přestane dodávat elektřinu. Pak je nutné elektrolyzáry vyhřívat nebo odstavit. Pro vysokoteplotní elektrolyzu představuje klíčový zdroj tepelné energie vodní pára, která může být i nízkopotenciálová s využitelnou teplotou² od 150 °C.

2.2.3. Chlazení

Proces nízkoteplotní elektrolyzy vyžaduje chlazení aktivních komponent, které se ohřívají v důsledku ohmických (rezistence vodičů) a faradayovských ztrát (přepětí). Spotřeba vody v chladicím okruhu pro elektrolyzáru o výkonu 1 MWe je typicky 200 t/h pro rozdíl teplot mezi chladnou a ohřátou vodou 15 °C, úměrně menší spotřeba chladicí vody je pak nutná při větším rozdílu teplot. Elektrolyzáry menších výkonů lze obvykle uchladiť volným prouděním okolního vzduchu. U vysokoteplotní elektrolyzy bez ohledu na velikost jednotky není nutné chlazení, protože obsahuje dostatečně dimenzované součásti s velkou teplosměnnou plochou, které se uchladiť vysokým teplotním gradientem a prouděním okolního vzduchu.

2.2.4. Vodovod

Pro elektrolyzu je nutný zdroj pitné vody, z které se další úpravou (typicky procesem reverzní osmózy) odstraní rozpuštěné soli a vyrobí kvalitní odsolená voda. Potřebné stechiometrické množství demineralizované (DEMI) vody se pohybuje okolo 9 kg/kg H₂. Pro výrobu DEMI vody reverzní osmózou (tj. membránovou separací) pitné vody je pak celková spotřeba pitné vody cca 60 kg/kg H₂, v závislosti na tvrdosti vstupní vody. Technologie není energeticky náročná, využívá tlak vody z rozvodu. Očekává se, že v budoucnu bude měrná spotřeba pitné vody pro výrobu vodíku klesat spolu s tím, jak poroste účinnost membránových separačních technologií. Některá brownfieldová místa, obvykle větší areály, mají historicky vybudované vlastní vodní studně, případně technologii pro úpravu vody. Dostupnost pitné vody z vodovodního řádu je však v ČR obvykle dobrá. V brownfieldech situovaných ve velkých areálech lze také využít šedou nebo technologickou vodu, které mohou snížit náklady na výrobu vodíku. Náklady³ na čištění vody jsou při elektrolytické výrobě poměrně nízké v porovnání s celkovými provozními náklady.

2.2.5. Kanalizace

Z procesu výroby DEMI vody vystupují zasolené odpadní vody v množství 50 kg/kg H₂, kromě vyššího zasolení jde o poměrně čistou vodu. Pokud není dostupná kanalizace, je možné vodu dále použít. Podle našeho názoru je tuto vodu možné v určité míře využít pro vsakování do zemědělské půdy nebo pro umělé závlahy (skleníky, venkovní zelenina). Výhodou je, že výroba fotovoltaické elektrárny obvykle koreluje s potřebou zavlažování. Průmyslové brownfieldy byly dále často napojeny na čistírnu odpadních vod, která může parametry vypouštěné vody dále upravit.

2.2.6. Datová konektivita

Pro měření, regulaci a řízení ovládacích systémů je vhodná datová konektivita. Díky širokému rozšíření se v současné době předpokládá velmi dobrý přístup k telekomunikacím (mobilní telefony) a informačním sítím (internet, WiFi) na 97 % území ČR. Výjimkou jsou obvykle zastíněná místa, rokle a odlehlé lesní porosty v horských oblastech.

2.2.7. Zdroj elektřiny

Jako zdroj elektrické energie pro elektrolýzu lze využít elektřinu z distribuční sítě, která z hlediska skladby zdrojů a také emisí skleníkových plynů odpovídá energetickému mixu České republiky. Předpokládáme, že takové řešení je dočasné do doby, než se plně rozvine bezemisní výroba vodíku nebo bude významně podpořena výstavba nových jednotek, vyrábějících bezemisní vodík, který někdy bývá označován jako zelený vodík.

Značnou výhodou může být také umístění nízkoemisního zdroje (např. FVE) v bezprostředním sousedství brownfieldu a přímé propojení obou míst, tj. buď přímo polohou nebo vodičem (metalická konektivita). Výhoda takového konceptu je, že brownfield pak může být velmi malý, využívaný pouze pro výrobu a zpracování vodíku. Realizace nové FVE je po legislativní stránce jednodušší než renovace brownfieldu, který zahrnuje získání mnoha různých povolení pro vybudování chemického provozu. FVE není považována za brownfield a v principu může také být součástí konceptu agrifotovoltaiky, tj. kombinované produkce elektrické energie a zemědělské produkce, například na zemědělské půdě horší bonity anebo v trvalých kulturách (např. vlnice, sady). Tento koncept bude pravděpodobně v ČR podporován podobně jako v zemích EU. Očekává se, že v budoucnu budou možné instalace panelů FVE na zemědělskou půdu s nízkou bonitou nebo ve spojení s určitým využitím zemědělské půdy, kde jsou panely FVE nikoli zátěží nýbrž přínosem.

3. Databáze brownfieldů v ČR

V ČR existuje přehledná národní databáze, kterou spravuje organizace Czechinvest. Je určena pro investory a komerční firmy, které plánují rozšiřování průmyslové činnosti. V databázi Czechinvest lze vyhledávat podle

krajů, okresů, typu lokality a konkrétního místa a dalších technických parametrů. Podrobně charakterizuje jednotlivé lokality a jejich velikost, vybavení a možné připojovací uzly. Odkaz na přehlednou databázi brownfieldů lze nalézt na <http://www.brownfieldy.eu/>.

Uvedená databáze neobsahuje všechny brownfieldy v ČR. Existuje řada brownfieldů obvykle v blízkosti větších areálů, které dosud nejsou zařazeny do seznamu, avšak svým charakterem splňují kritéria brownfieldu. Jejich majitelé je obvykle nechtějí uvolnit převážně ze strategických důvodů, naopak pro ně hledají, a to ať již aktivně či pasivně, další využití. Další potenciální plochy představují nevyužívané části současných komerčně aktivních areálů. Plocha potenciálních brownfieldů tak může být větší. Podle staršího odhadu Czechinvestu existuje v ČR cca 38 000 ha brownfieldů⁴.

4. Potřebná plocha brownfieldů v ČR

Vodíková strategie České republiky¹ uvádí, že na základě odhadů se očekává roční spotřeba 1728 tis. tun nízkoemisního vodíku v roce 2050. Na výrobu tohoto množství vodíku elektrolýzou vody bude potřeba 95 TWh elektrické energie. Další možností je dovést toto množství nízkoemisního vodíku pomocí plynárenské soustavy ze zahraničí. Lze očekávat kombinaci obou způsobů, kdy část bude vyrobena v ČR a část dovezena. Podle současné prognózy scénářů spotřeby vodíku po odvětvích většinu takto produkovaného vodíku spotřebuje nákladní doprava (49 % roční spotřeby vodíku v ČR), kde dominantní budou nákladní automobily a tahače. Dalšími obory spotřeby jsou hutnictví železa (21 %), chemický průmysl (9 %), průmysl (bez hutnictví a chemického průmyslu) (9 %), výroba elektřiny a tepla (9 %) a domácnosti (5 %).

Pro přibližný odhad využití výměr brownfieldů předpokládáme, že:

- veškerý uvedený vodík bude vyráběn na brownfieldech z FVE a elektrolýzou,
- veškerý uvedený vodík bude vyroben pomocí elektřiny z FVE,
- ČR bude právě soběstačná ve výrobě vodíku (tj. výroba vodíku v ČR nebude ani deficitní ani přebytečná),
- 1 ha FVE znamená instalovaný špičkový výkon 1 MWe a výrobu 1,1 GWh/rok.

Z našich odhadů vychází, že pro výrobu 95 TWh (tj. 95 000 GWh) elektrické energie, tj. pro zajištění výroby vodíku v areálech brownfieldů, bude v roce 2050 nutná výměra 86 400 ha. Další plocha (odhadem dalších 30 %) je nutná pro zpracování a transport vodíku. Celkem předpokládáme potřebnou plochu brownfieldů cca 120–150 tis. ha, tj. 1200–1500 km². Tuto hodnotu ploch lze považovat za maximální a zahrnuje také plochy FVE. Jak bylo zmíněno dříve, aktuálně je v ČR dostupných cca 38 tis. ha brownfieldů. Lze tak předpokládat nutnost, že významné plochy FVE budou umístěny na jiných plochách (např. střechách, stěnách budov, plotech apod.).

Při využití technologie nízkoteplotní elektrolýzy pro hypotetickou výrobu 95 TWh elektrické energie, kde se uvažuje plocha⁵ pro technologii včetně příslušenství 60 m²/MW. Zde bude nutná celková plocha 570 ha a pro vhodně (tj. trojnásobně) předdimenzované FVE bude nutná rozloha 3 × 95 tis. ha.

V EU panuje obecná shoda, že pro nastartování vodíkových technologií je vhodné začít vyrábět jakýkoli snadno dostupný vodík. A v dalším období se očekává zaměření na nízkoemisní výrobu. Při využití technologie parního reformingu zemního plynu pro hypotetickou výrobu 95 TWh elektrické energie se uvažuje plocha pro technologii včetně příslušenství srovnatelná s technologií nízkoteplotní elektrolýzy. Zde bude nutná celková plocha dle kvalifikovaného odhadu do 1000 ha. Navíc proces reformingu zahráté páry, ve spojení s ukládáním nebo využitím vznikajícího oxidu uhličitého, může produkovat nízkoemisní vodík.

Otázkou zůstává budoucí legislativní podpora a požadavky na výrobu nízkoemisního nebo zeleného vodíku a s tím spojené požadavky na prostor výroby a skladování. Další otázkou je využití ploch brownfieldů resp. počet elektrolytických výrob umístěných na jedné lokalitě.

5. Závěr

V ČR je připravováno několik projektů na výrobu, transport a distribuci (plnicí stanice) nízkoemisního vodíku. Obecně se uvažuje silné rozšíření technologií do roku 2050. Ale již nyní je trend vyhledávat umístění pro nové technologie. Brownfieldy představují významný prostor. Velikou předností bude možnost využití ostatních ploch nebo pozemků s nízkou bonitou (např. vhodné na zatravnění) pro instalaci fotovoltaických elektráren v blízké vzdálenosti od elektrolyzérů. U brownfieldů se předpokládá naopak velmi dobrá dopravní dostupnost pro nákladní i osobní automobilovou dopravu. Další alternativou jsou železniční a lodní doprava. V blízké budoucnosti se v EU očekává významný rozvoj vodíkových technologií, jako je elektrolytická výroba vodíku z vody a jeho distribuce pro dopravu a následně také pro průmysl. Výroba a využívání nízkoemisního vodíku tak představuje vysoký potenciál k rozvoji bezemisních zdrojů energie. V databázi Czechinvestu je uveden aktuální přehled nevyužitých brownfieldů. Dále však existuje řada dalších ploch nebo málo využívaných brownfieldů např. jako součástí průmyslových areálů, u výrobních objektů, skladovacích ploch, bývalých zemědělských staveb, střech, plochy u čerpacích benzino-

vých stanic apod., které majitelé veřejně neuvádí a které mají velký potenciál pro výrobu vodíku. Brownfieldy je možné využít, ale bude nutné je doplnit ještě o další plochy, které jsou nyní součástí aktivních výrobních areálů, ostatních ploch apod. Pokud bychom uvažovali, že veškerá nízkoemisní elektrická energie 95 TWh bude spotřebována na výrobu vodíku, pak hypotetická potřebná plocha pro elektrolýzu bude 570 až 1000 ha a pro FVE rozloha 3 × 95 tis. ha. Ideálním řešením se jeví umístění FVE na málo bonitním poli a elektrolýzy na přilehlém menším brownfieldu.

LITERATURA

1. *Vodíková strategie České republiky*, verze, Ministerstvo průmyslu a obchodu, https://www.mpo.cz/assets/cz/rozcestnik/pro-media/tiskove-zpravy/2021/8/Vodikova-strategie_CZ_G_2021-26-07_2.pdf, staženo 7. 3. 2023.
2. [https://www.sunfire.de/files/sunfire/images/content/Sunfire.de%20\(neu\)/Sunfire-Factsheet-HyLink-SOEC-20210303.pdf](https://www.sunfire.de/files/sunfire/images/content/Sunfire.de%20(neu)/Sunfire-Factsheet-HyLink-SOEC-20210303.pdf), staženo 7. 3. 2023.
3. Tocháčková A., Laciok A., Šilhan M.: *Chem. Listy 115*, 623 (2021).
4. <https://www.ceskovdatech.cz/clanek/59-zeme-brownfieldu-v-cesku-je-temer-500-lokalit-pripravenych-pro-investory/>, staženo 7. 3. 2023.
5. IRENA (2020), *Green Hydrogen Cost Reduction: Scaling up Electrolysers to Meet the 1.5 °C Climate Goal*, International Renewable Energy Agency, Abu Dhabi https://www.irena.org/-/media/Files/IRENA/Agency/Publication/2020/Dec/IRENA_Green_hydrogen_cost_2020.pdf, staženo 7. 3. 2023.

P. Polívka and M. Šilhan, (Research Centre Řež, Czech Republic): Parameters and Potential of Revitalization of Unused Industrial Areas (Brownfields) for Hydrogen Production

The article characterizes existing unused industrial areas, the so-called brownfields, in terms of their usability for hydrogen production, with a focus on electrolytic hydrogen production. The paper also estimates future brownfield areas to ensure hydrogen production.

Keywords: brownfield, hydrogen, electrolysis, renewable energy

Metrohm demonstrační laboratoř na Univerzitě Karlově



 **Metrohm**
Česká republika



www.metrohm.cz



Česká společnost chemická, Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1
tel.: 221 082 383, redakce tel. 221 082 370
e-mail: chem.spol@csvts.cz
http://www.csch.cz

Členské služby a výhody | Česká společnost chemická

Zapojení v České chemické společnosti, členu Asociace českých chemických společností, EuCheMS, ECTN-A a ČSVTS přináší individuálním chemikům, kromě vlastního členství v největší a nejstarší české profesní organizaci chemiků (zal. 1866):

ROZŠÍŘTE SVÉ KONTAKTY

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCh,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění,...
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC, a z toho plynoucí sleva u nakladatelství Blackwell a na konferencích sponzorovaných IUPAC, členové IUPAC dostávají časopis Chemistry International,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),

ZÚČASTNĚTE SE NÁRODNÍCH SJEZDŮ

- možnost zúčastnit se národních sjezdů s významnou slevou pro členy, které jsou pořádány každoročně, jednou na Slovensku jednou v ČR,

ZLEPŠETE SVOJI INFORMOVANOST

- možnost dostávat 4x ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů v tištěné či elektronické podobě,
- možnost dostávat 4x ročně, cestou elektronické pošty, členské upozornění na nejdůležitější události a aktuality,
- volný přístup k členskému magazínu ChemViews (<http://www.chemistryviews.org/>), jehož je ČSCh spoluvlastníkem, a to i na vašem mobilním telefonu apod.,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě,
- informace o dění v evropských strukturách, jako např. EuCheMS, ECTN, EC2E2N a podobně,
- přístup k elektronickým informačním médiím Společnosti,
- volný přístup k tištěným verzím časopisů ChemPubSoc Europe v „knihovně ČSCh“, kterou po dohodě s PřF UK Praha zřídila ČSCh v Knihovně chemie (sídlicí v budově Hlavova 8/2030, Praha 2, Albertov, přízemí, v místnostech č. 148, 149, 150).

ZAPOJTE SE DO ŘEŠENÍ GRANTŮ EU

- možnost participovat na řešení grantů s evropskými partnery, jako např. ECTN a partnerskými národními společnostmi.

UŠETŘETE PENÍZE

- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCh,
- významnou slevu (ca 90 %) na předplatné časopisu Chemistry – A European Journal, a dalších evropských časopisů konsorcia ChemPubSoc Europe, jichž je ČSCh spolumajitelem,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCh,
- slevu při zapůjčení automobilu (až 35 %) u společností AVIS a HERTZ na celém světě, kromě Austrálie, a použití těchto automobilů na akcích v ČR za speciální tarify,
- sleva 20 % z publikačních poplatků v časopise ChemOpenChem, který společnost spoluvlastní.

ZDŮRAZNĚTE SVOJI PROFESIONALITU

- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu EurChem, platného v celé EU,

BUĎTE VIDĚNI

- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- a řadu dalších služeb, které se teprve sjednávají,

PRO FIRMY A PODNIKATELE

- Firmám, podnikům, institucím a dalším právnickým osobám nabízí ČSCh mimo jiné i tzv. „kolektivní členství“, při kterém se ve vzájemné smlouvě sjedná to, čím mohou pomoci jedna strana druhé. Podrobnosti na dotaz.

OBSAH**ÚVODNÍK**

- Konečně září, konečně chemie** 537
P. Šmejkal

REFERÁTY

- Elektrochemická depozice mikro- a nano-
struktur Pubovoľného tvaru** 539
D. Haluška, O. Lyutakov a V. Švorčík
O síle paňdžábského asfaltu 547
M. Jurášek, J. Cabalka a P. Drašar
**Elektroanalýza insulínu na nanokompozitních
elektrodách** 551
L. Trnková a I. Třísková

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

- Studium hladiny metalothioneinu v séru
pacientů se zhoubným nádorem** 573
L. Melich, M. Fořtová, B. Hosnedlová, J. Podhajský,
O. Rychlý, J. Werle, K. Burešová, L. Vysloužilová,
K. Dunovská, E. Klapková, K. Kotaška, J. Čepová,
B. Jedličková, O. Štěpánková, R. Průša a R. Kizek

NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE

- Humicové látky, charakterizace a názvoslovné
doporučení** 581
P. Drašar, J. Kozler a O. Paleta

CHEMICKÝ PRŮMYSL

- Parametry a potenciál revitalizace
nevyužívaných průmyslových ploch (brownfieldů)
pro výrobu vodíku** 585
P. Polívka a M. Šilhan

CONTENTS**EDITORIAL**

- September, at Last, Chemistry,.... at Long Last!** 537
P. Šmejkal

REVIEW ARTICLES

- Electrochemical Deposition of Micro-
and Nanostructures of Any Shape** 539
D. Haluška, O. Lyutakov, and V. Švorčík
On the Strength of Punjabi Asphalt 547
M. Jurášek, J. Cabalka, and P. Drašar
**Electroanalysis of Insulin on Nanocomposite
Electrodes** 551
L. Trnková and I. Třísková

ORIGINAL AND METHODOLOGICAL PAPERS

- Study of Metallothionein Levels in the Serum
of Patients with Malignant Tumour** 573
L. Melich, M. Fořtová, B. Hosnedlová, J. Podhajský,
O. Rychlý, J. Werle, K. Burešová, L. Vysloužilová,
K. Dunovská, E. Klapková, K. Kotaška, J. Čepová,
B. Jedličková, O. Štěpánková, R. Průša, and R. Kizek

NOMENCLATURE AND TERMINOLOGY

- Humic Substances: Characterisation
and Nomenclatural Recommendations** 581
P. Drašar, J. Kozler, and O. Paleta

CHEMICAL INDUSTRY

- Parameters and Potential of Revitalization
of Unused Industrial Areas (Brownfields)
for Hydrogen Production** 585
P. Polívka and M. Šilhan

Odborná skupina termické analýzy České společnosti chemické



pořádá

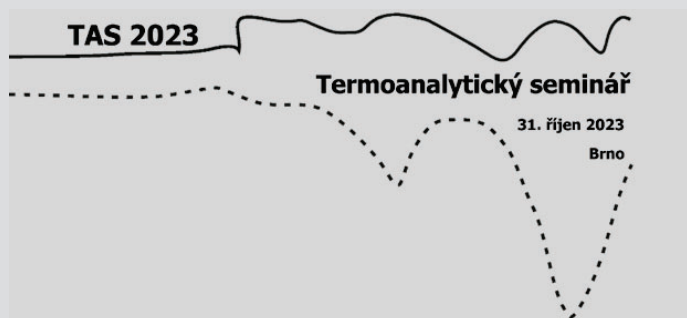
TERMOANALYTICKÝ SEMINÁŘ

31. říjen 2023

Ústav fyziky materiálů AVČR, v.v.i,
Brno

Další informace: <http://www.thermal-analysis.cz>

Kontakt na organizátory: petra.sulcova@upce.cz



CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 117 (2023), čís./no. 9 • **LISTY CHEMICKÉ**, roč./vol. 147, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 133 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCh • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA, ČR) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffer, J. Hanika, Z. Havlas, M. Hof, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, P. Konvalinka, J. Kotek, J. Koubek, J. Málek, P. Matějka, K. Melzoch, V. Pačes, M. Pospíšil, V. Růžička, P. Slaviček, I. Stibor, J. Zima, T. Zima • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného Lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCh, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 221 082 383, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCh, Chemické listy • Copyright © 2023 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2023 (12 čísel) 1810 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCh 900 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 96 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCh 73 EUR (doručování via SCHS), 96 EUR + poštovné (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://casi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zaslány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCh a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: V. Spiwok • Dáno do tisku 28.8.2023.

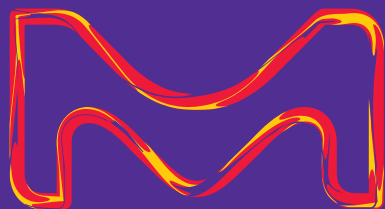


CHEM BEADS

Solid Catalyst-Coated Glass Beads

We'll keep your work flowing with a variety of ChemBeads to help you reach new frontiers in your research and development. ChemBeads are small chemical coated glass beads created for work where submilligram amounts of solids need to be delivered efficiently and accurately for chemical synthesis.

Discover more at:
SigmaAldrich.com/ChemBeads



The Life Science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®
 Lab & Production Materials