

O atributech chemického vzdělávání

Je s podivem, kolik se vyplývá času, energie a adrenalinu na věci, které by měly být normální a přirozené. Vezměme si například takové vysokoškolské vzdělávání v chemii. Na vysokých školách a univerzitách (úmyslně je rozlišuji, neboť na „univerzitě“ je nutno vyučovat mj. filozofii, práva, lékařství a náboženství) se vyučuje materialismus, lučba a chemie, které v historii patřily pod onu filozofii (prvotní chemici si říkali „přírodní filosofové“), již přes 200 let. Je to tak dlouho, že na dobrých školách vědí, co a jak učit, ba má to i kdo učit. Na dobrých školách vidí, že potřebují jak špičkové profesory na vybrané předměty, tak techniky na to, aby fungovala výuka v laboratořích, asistenty a docenty na každodenní výuku. Vědí, že nelze oddělit bádavou vědu od nauk průmyslově orientovaných a obě pak od výuky bakalářů až doktorů. Důležitost toho druhého aspektu je esenciální a například na Akademii věd v Bělorusku, které je mnohými považováno za zaostalý kout Evropy, ale očitý svědek ví, že tomu tak není, prostě zřídili u ústavů Akademie plnoprávné vysokoškolské katedry (možná namísto bývalých útvarů jako byl „омдэн кадров“). Studenti na nich studují a zároveň pracují; navíc nikdo nelicituje o zbytečnosti Akademie, která v tomto případě má vlastní pyramidální strukturu dorostu. Nelze oddělit ani „haute chimie“ od výroby a obchodu.

Ba pohříchu, jsou tací, kdo si myslí, že kterákoliv z těchto kategorií může existovat oddělena od těch dalších. Jářku jde to, ale „dře to“, a jen na chvíli a na úrovni, která není souměřitelná ani s jakýmkoliv „průměrem“; padá totiž za krátký čas pod tento průměr, bez ohledu na peníze, které se do takového mlýna nasypou. Navíc pak, aby to vše fungovalo, školy vysoké musí být řízeny stavem, který je toho hoděn a mocen, a to po všech stránkách.

Úvodníky a fejetony se obvykle píšou ne proto, aby popisovaly neutěšený stav, ale aby poskytly nitku k zamyšlení a náznak východiska. Já předestírám obě, i když vím, že se po jejich přečtení vyskytnou výkřiky nevole i „vole“. Domnívám se, že školství zasluhuje výraznou změnu. Hovoří o tom i recentně zpracovaná studie tzv. Evropské tematické sítě pro chemii (ECTN) o zaměstnatelnosti absolventů chemických škol na bakalářské úrovni¹ i studie o profesně orientovaném vzdělávání². Ke změnám výuky, zejména na rozhraní sekundárního a terciárního vzdělávání v chemii, směřuje i další projekt, téměř ze stejné kuchyně³.

A co tedy vidím? Jako sůl je třeba pokračovat v nastoupené cestě (akreditaci) Evropských známek označujících kvalitu, ať již kvalitu výuky (EuroLabels), kreditního systému (ECTS), případně jednotlivých chemiků (CChem, EurChem) a pod., jakkoliv to znamená určitou administrativní zátěž. Pokud je mi známo, dvě vysoké školy u nás dosáhly na „EuroLabels“, žádná na akreditaci kreditního systému ECTS a celá řada chemiků dosáhla na profesionální statut na úrovni „regulované profese“. Je to

cesta k vytváření, za minulého režimu nelibě nesených, elit. Ano, bude-li mít polovina Evropanů vysokoškolský diplom, jak si přeje evropská administrativa, musíme tuto masu rozdělit (a to i v rámci samotných bakalářů) na dobré, lepší a nejlepší (jak říká jeden můj bývalý spolužák: „pro nás Němce, jen to nejlepší je dost dobré“). Mají-li být odlišeni absolventi, musí být rozlišeny i školy a pan ministr Liška na takovou myšlenku slyšel a lze jen doufat, že i jeho nástupci slyšet budou. Rozlišeny právy, povinnostmi a financemi. Takto rozlišené školy by však měli řídit po stránce ekonomické manažeři, kteří vědí něco o ekonomice a práci s lidmi a na druhé straně nikoliv cosi, co připomíná výbory lidu, vzniklé losováním ze všech pracovníků příslušné školy, ale skutečně vědecké či akademické rady hodné tohoto jména, to jest generované minimálně z kolektivu docentů, profesorů a doktorů věd (DrSc i DSc !!), neboť tito lidé před přísným zrakem komisí a kolegií předvedli, že jsou „mocni alespoň základních početních úkonů“, jak praví klasik. Řízeny vedoucími pracovníky, kteří jsou k tomu povoláni jak svým vnitřním hlasem, tak svojí kvalitou lidskou a profesionální. Povolání a konkurzem prověření (bezespou klidně každé jakkoliv rozumné zvolené období znova), a tedy ne na chvíli jmenování tak, aby až jim funkční období skončí, se úloha vedoucího cyklicky dostala i na paní z kantýny. Těžko si totiž dovedu představit, co by vybudovali pánové Lukeš, Šorm, a jim podobní, kdyby věděli, že za rok za dva musí své řídicí práce nechat, aby se dostalo na jiné. Proč pomíjí inženýry, magistry, kandidáty věd a doktory filozofie? Inu proto, aby měli dostatek času a energie na to, aby si doplnili vzdělání, pokud budou chtít otáčet zeměkouli.

Při vytváření dojmů o kvalitních pracovních nesmíme uklouznout, a protože nedosáhneme na kritéria světová, stvořit kritéria naše, lepší, a taková, do kterých se vejde i ten, který na světově uznávaná kritéria nedosáhne⁴ anebo ještě hůře, který pomalu nic nedělá.

Špičková kvalita však musí jít ruku v ruce se snahou o porozumění jak lidem (nemůže být nehumánní), tak nečekanému. Opět parafrázuji své přátele, stejně jako dnes málokdo dá zlamanou grešli na studenou fízi, i když na použité palladiové destičce bylo prokázáno předtím tam nevyskytující se stříbro a při zkoumání Fleischmannova-Ponsova jevu (vidíte, jsem opatrný) byly detegovány pomalé neutrony, rentgenové záření a teplo, tak by asi dala „Agentura Grandů“ málokomu peníze na zkoumání toho, že bude do vody kapat rtuť a ještě přitom měřit potenciál. Možná by dostali (a také vskutku dostávají) peníze buď od Armády, nebo od „venture kapitálu“, který dává peníze vědcům pod jedinou podmínkou, že budou zkoumat to, co je bavi.

Je třeba dále rozvíjet souručenství badatelské sféry, výrobních a obchodních firem (ty lze těžko odlišit), které spolu se školami, a podotýkám, že toto platí již od škol

středních, v symbióze pečují o to, aby absolventi dotčených vzdělávacích ústavů až dostudují, dosáhli také na pořádné zaměstnání, budou-li ovšem chtít. Ne každý chemik může totiž být ministrem financí.

Vzhledem k tomu, že vše souvisí se vším, mělo by budoucí uspořádání (chemického) vzdělávání splňovat nejen atribut, mezi které patří mj. vizionářství, tvrdá řehole, poctivost, pohled na svět bez koňských klapek na očích, touha po kvalitě, hledání užitečnosti a mnoho dalších, přičemž opakují a to citátem mého oblíbeného sibiřského lovce z národa Goldů, stopaře Dersu Uzaly, že sám považuje za prvotní atribut požadavek, že každý člověk musí být „lidi“.

Pavel Drašar

LITERATURA

1. *Employability of the Chemistry First Cycle Graduates* (Begitt K., Drašar P., ed.). ECTN & ČSCH, Prague and Frankfurt 2009.
2. *Chemical Education for a Competitive and Dynamic Europe* (Cooke M., Gros L., Horz M., Zeller W., ed.), FACE, Idstein and Vienna 2004.
3. CITIES, Chemistry and Industry for Teachers in European Schools, <http://cities.eu.org/> (staženo 31.3. 2009).
4. Červený L.: Chem. Listy 103, 183 (2009).

ZAHRADA

**FOTOELEKTRONOVÁ
SPEKTROSKOPIE VE TŘETÍM
TISÍCILETÍ**
ZDENĚK BASTL
Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Praha 8

Došlo 4.8.08, přijato 18.12.08.

 Klíčová slova: ultrafialová fotoelektronová spektroskopie, laserová fotoelektronová spektroskopie, rentgenová fotoelektronová spektroskopie

Obsah

1. Úvod
2. Metody fotoelektronové spektroskopie
 - 2.1. Metody ultrafialové fotoelektronové spektroskopie
 - 2.2. Metody laserové fotoelektronové spektroskopie
 - 2.3. Rentgenová fotoelektronová spektroskopie
3. Závěr

1. Úvod

Fotoelektronová spektroskopie je, jak název napovídá, založena na fotoelektrickém jevu. Tento jev pozoroval poprvé v roce 1887 Heinrich Hertz při experimentech zaměřených na verifikaci Maxwellovy klasické teorie elektromagnetismu. Podstatu fotoelektrického jevu vysvětlil s použitím Planckovy kvantové teorie v r. 1905 A. Einstein, za což mu byla v r. 1921 udělena Nobelova cena. Energetická bilance fotoemise, na které je fotoelektronová spektroskopie založena, je dána známým vztahem, nazývaným někdy Einsteinova rovnice:

$$h\nu = E_B + E_K \quad (1)$$

kde $h\nu$ je energie fotonu, E_B vazebná energie elektronu ve studovaném materiálu a E_K kinetická energie fotoemitovaného elektronu.

Fotoemise se řídí dipólovým výběrovým pravidlem. Vzhledem k tomu, že elektron v kontinuu může nést libovolný orbitální moment, je toto pravidlo vždy splněno. Odtud též vyplývá, že pravděpodobnost fotoionizace je podobně jako u jiných dipólových přechodů úměrná druhé mocnině transičního momentu.

Fotoelektronová spektra molekul v plynné fázi excitovaná UV zářením byla získána počátkem 60. let minulého století nezávisle Turnerem¹ a Vilesovem². O rozvoj

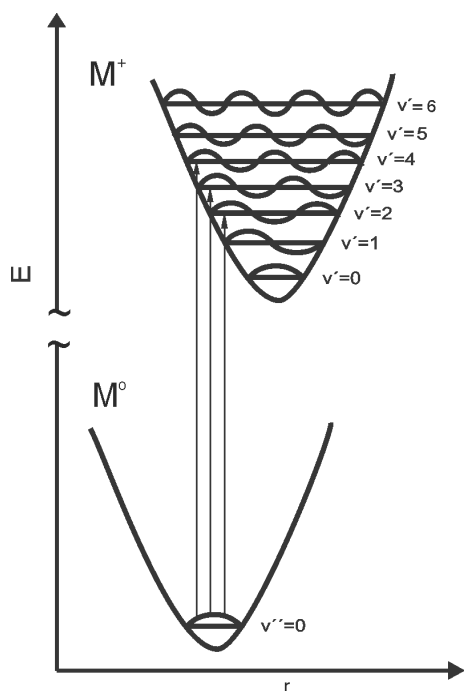
fotoelektronové spektroskopie s excitací elektronů rentgenovým zářením se zasloužil především Kai Siegbahn (Nobelova cena udělena v r. 1981), který dokázal podstatně zvýšit rozlišení spektrometru a tím rozlišit spektrální linie náležející neekvivalentním chemickým stavům atomů ve studovaném vzorku přítomných prvků³. Od Siegbahna pochází též akronym ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis). Zájemce o detailní historii vývoje fotoelektronové spektroskopie v letech 1910–1960 lze odkázat na reprezentativní přehledný článek australských autorů⁴. První komerčně dostupné fotoelektronové spektrometry byly k dispozici na přelomu 60. a 70. let minulého století. V ČR byl první spektrometr umožňující studium fotoelektronů excitovaných UV i rentgenovým zářením instalován v r. 1977 v Ústavu fyzikální chemie a elektrochemie J. Heyrovského, ČSAV.

Metody fotoelektronové spektroskopie patří tedy k relativně novějším experimentálním spektroskopickým technikám. V posledních dvou desetiletích prodělaly tyto metody dramatický rozvoj, který souvisel zejména s rozvojem vakuové techniky, mikroelektroniky, výpočetní techniky a vývojem nových zdrojů záření, zejména laserů a synchrotronů třetí generace (tj. synchrotronů s undulátory a wigglerly). V důsledku tohoto rozvoje se významně rozšířil počet laboratoří ve světě, ve kterých jsou tyto metody používány a podstatným způsobem vzrostl i okruh jejich aplikací. Metoda XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) se stala v současnosti již rutinní metodou charakterizace povrchů pevných látek.

Je nemožné rozvoj všech metod fotoelektronové spektroskopie v posledních desetiletích popsat a zhodnotit v krátkém a zdaleka ne vyčerpávajícím článku a autor tohoto příspěvku si ani takové ambice nečiní.

2. Metody fotoelektronové spektroskopie
2.1. Metody ultrafialové fotoelektronové spektroskopie

Tradičně se fotoelektronová spektroskopie dělí podle energie fotonů excitačního záření na UPS (Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy) a XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy). Zatímco energie fotonů UV záření postačuje pouze k ionizaci valenčních elektronů, energie fotonů rentgenového záření dovoluje studovat i ionizaci vnitřních, na atomech lokalizovaných elektronů („core levels“). Metoda UPS je používána ke studiu elektronové struktury molekul v plynné fázi, molekul adsorbovaných na povrchu pevných látek a pásové struktury povrchových vrstev pevných látek. Tato metoda byla nazývána experimentální kvantovou chemií, neboť výsledky experimentů byly v souladu s Mullikenovou názornou představou molekulárních orbitalů (MO).



Obr. 1. Křivky potenciální energie hypotetické molekuly v základním stavu a iontu s vibračními hladinami ilustrující vertikální přechody a původ vibrační struktury v UP spektrech. Přechod $v''=0 \rightarrow v'=0$ odpovídá adiabatickému ionizačnímu potenciálu

V současnosti s rostoucím využíváním přeladitelného synchrotronového záření ke studiu fotoemise se však hranice mezi metodami UPS a XPS ztrácí.

Fotoemisní proces lze popsat vztahem:



kde M^0 je studovaný objekt (atom, molekula) v základním stavu a M^+ vzniklý ion. Ve spektrech jednoduchých molekul lze často pozorovat vibrační strukturu, odrážející vibrační hladiny iontu. Původ vibrační struktury spekter je zřejmý z obr. 1. Intenzity vibračních linií jsou úměrné čtverci překryvového integrálu vibračních vlnových funkcí počátečního a konečného stavu (Franck-Condonův princip).

Dojde-li k fotoemisi elektronu z některé z vnitřních hladin, vznikne ion v excitovaném stavu, který deexcituje emisí fotonu („X-ray fluorescence“) nebo Augerovým procesem, spočívajícím v nezářivém přenosu deexcitační energie na jiný elektron, který je též emitován (obr. 2). Fotoemise je velmi rychlý proces, trvající řádově 10^{-15} s a může být doprovázena excitací dalších elektronů, řídicí se monopólovými výběrovými pravidly („shake-up“ přechody).

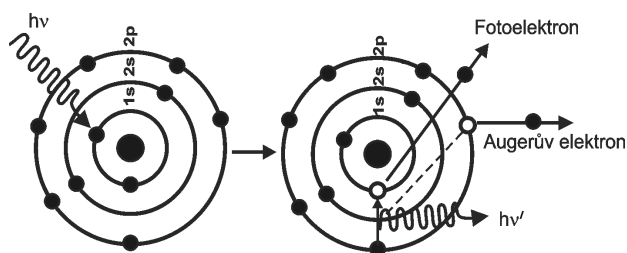
Hodnota vazebné energie elektronu je obecně dána rozdílem celkové energie $N-1$ elektronového systému po ionizaci a N elektronového systému ve výchozím stavu

(viz obr. 3):

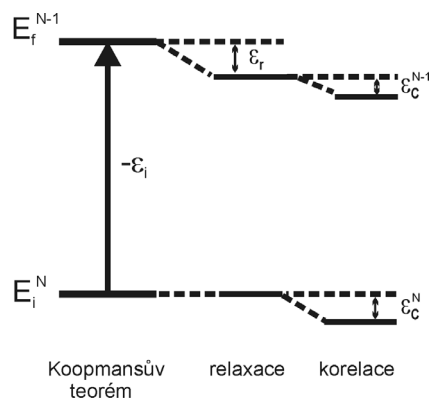
$$E_B = E_f^{N-1} - E_i^N = -\varepsilon_i - \varepsilon_r + \varepsilon_c \quad (3)$$

U atomů a molekul je vazebná energie E_B elektronu totožná s ionizační energií.

Zanedbáme-li odezvu ostatních elektronů na lokální změnu potenciálu způsobenou fotoemisí, je vazebná energie rovna záporně vzaté energii orbitalu, ze kterého je elektron emitován. Fotoelektronová spektra molekul v tomto přiblížení představují repliku obsazených molekulárních orbitalů s intenzitami fotoemisních linií úměrnými pravděpodobnosti fotoemise z jednotlivých orbitalů. Toto přiblížení je známo jako Koopmansův teorém. Uvedená aproximace však platí pouze pro přibližný model elektronové struktury molekul, který je známý jako SCF (Self-Consistent Field) model. Není proto překvapující, že v mnoha případech poskytuje výsledky, které se dosti liší od výsledků experimentu. Změřené hodnoty vazebných (resp. ionizačních energií) jsou zpravidla nižší, než hodnoty získané v aproximaci Koopmansova teorému. Je to způsobeno zanedbáním reorganizace ostatních elektronů při fotoemisi. V důsledku reorganizace zbývajících elektronů je energie konečného stavu E_f^{N-1} snížena o hodnotu relaxační energie ε_r . Korelační energie ε_c má význam rozdílu mezi minimální energií získanou SCF výpočtem a energií experimentální a je úměrná počtu elektronů. Je tedy vyšší



Obr. 2. Fotoemise 1s elektronu z atomu, deexcitace emisí fotonu a Augerovým procesem



Obr. 3. Vazebná energie elektronu v Koopmansově přiblížení, vliv relaxační (ε_r) a korelační ($\varepsilon_c = |\varepsilon_c^N - \varepsilon_c^{N-1}|$) energie

pro N elektronový systém než pro $N-1$ elektronový systém a částečně kompenzuje vliv relaxace. Poznamenejme, že v rovn. (3) nejsou zahrnuty relativistické efekty, které jsou s výjimkou těžkých atomů často zanedbávány.

Problémy při interpretaci fotoelektronových spekter na základě výpočtů orbitálních energií tedy spočívají ve skutečnosti, že experiment poskytuje výpověď o mnohaelektronových základních a excitovaných stavech molekul, zatímco při výpočtu orbitálních energií používáme jednoelektronové aproximace. Zahrnutí relaxace a korelace elektronů, případně i relativistických efektů, výpočet značně komplikuje. Díky rozvoji výpočetních metod a výpočetní techniky lze však v současné době vypočítat fotoelektronová spektra velkého počtu molekul včetně jejich vibrační a satelitní struktury s velkou přesností. U jednoduchých molekul bylo možno spolehlivě interpretovat jejich fotoelektronová spektra získaná excitací zářením He I ($h\nu = 21,2$ eV) na základě výpočtů *ab initio* již v 80. letech minulého století⁵.

Technika UPS je dosud chemiky používána zejména ke studiu částic s krátkou dobou života (např. při pyrolyze nebo výbojích v plynech) a semiempirických korelací orbitálních energií s vlastnostmi a reaktivitou molekul. Spektrální rozlišení této metody činí 10 meV, ve speciálních případech (použití molekulového svazku, mikrovláknového výboje jako zdroje záření a analyzátoru elektronů s vysokým rozlišením) lze dosáhnout rozlišení 2–3 meV. Vzhledem k rozvoji laserových metod poskytujících mnohem vyšší rozlišení je metoda UPS ke studiu valenčních elektronů volných molekul užívána v posledních letech méně často.

To však neplatí o studiu elektronové struktury povrchu pevných látek a molekul, adsorbovaných na monokrystalických površích pevných látek. K těmto studiím je nejčastěji používáno synchrotronové záření, které lze přeladovat vhodným monochromátorem a které je polarizované, což v kombinaci se studiem difrakce fotoelektronů umožňuje určit např. orientaci a způsob vazby molekul adsorbovaných na povrchu pevné látky. Při použití Mottova detektoru, který využívá závislosti rozptylu elektronů na jejich spinu, lze určit i spin fotoemitovaného elektronu a studovat závislost polarizace elektronů na jejich vazebné energii⁶. Hlavními objekty těchto studií jsou magnetické povrchy, mezifáze a tenké vrstvy. Studium závislosti polarizace fotoemitovaných elektronů na vloženém vnějším magnetickém poli lze získat hysterezní křivky pro povrchové vrstvy o tloušťce několika atomárních vrstev. Tloušťku studované vrstvy lze měnit změnou energie fotonů excitačního záření.

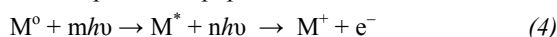
Fotoemise excitovaná UV zářením je v poslední době používána i k mikroskopickým studiím (PEEM – Photoelectron Emission Microscopy), tj. k zobrazení povrchu fotoexcitovanými elektrony. Rozlišení těchto mikroskopů závisí na vlastnostech použitého elektronově-optického systému a typu vzorku – za rutinní se považují hodnoty 100–300 nm. Použití laditelného zdroje světla, obvykle synchrotronu případně laseru na volných elektronech, umožňuje i určení prahových fotoionizačních energií. Zaji-

vané výsledky byly získány např. při studiu biologických materiálů, u kterých kromě jejich zobrazení lze sledovat i lokální ionizační potenciály. Příkladem může být použití metody⁷ UV FEL PEEM (UV Free Electron Laser Photoelectron Emission Microscopy) k určení fotoionizačního potenciálu některých biologických pigmentů, u kterých touto metodou zjištěné hodnoty byly v souladu s výsledky elektrochemických měření⁸. Metoda PEEM tedy poskytuje současně mikroskopickou, chemickou i strukturní informaci.

2.2. Metody laserové fotoelektronové spektroskopie

Dalším krokem ve vývoji molekulárních fotoelektronových spektroskopii jsou metody, používající k excitaci a ionizaci molekul záření pulzních laserů a TOF (Time of Flight) analyzátoru elektronů. Z nich patří k neznámější metoda⁹ REMPI (Resonantly Enhanced Multiphoton Ionization) a metoda¹⁰ ZEKE (Zero Kinetic Energy). Posledně zmíněná metoda poskytuje rozlišení až 0,01 meV, což je téměř o 3 řády vyšší rozlišení než u „klasické“ UPS a umožňuje proto i studium rotačně-vibračních stavů u větších molekul.

REMPI proces lze popsat vztahem:



kde M^0 je základní stav molekuly, M^* rezonanční excitovaný stav molekuly a M^+ konečný stav iontu po emisi elektronu. Metoda dovoluje volbou rezonančního stavu získat spektroskopickou informaci o excitovaném stavu molekuly a stavu iontu. U této metody však, podobně jako u klasické UPS, je nutné měřit kinetické energie emitovaných elektronů a nejlepší dosažené rozlišení činilo 0,5 až 1 meV u REMPI spekter *n*-propylbenzenu. Takové rozlišení však nelze dosáhnout rutinně u libovolného vzorku. Multifotonová excitace umožňuje studovat dynamické chování excitovaných stavů a stavy, které jsou pro excitaci jedním fotonem zakázané. Byla rovněž úspěšně použita ke studiu van der Waalových komplexů a klastrů v supersonických svazcích.

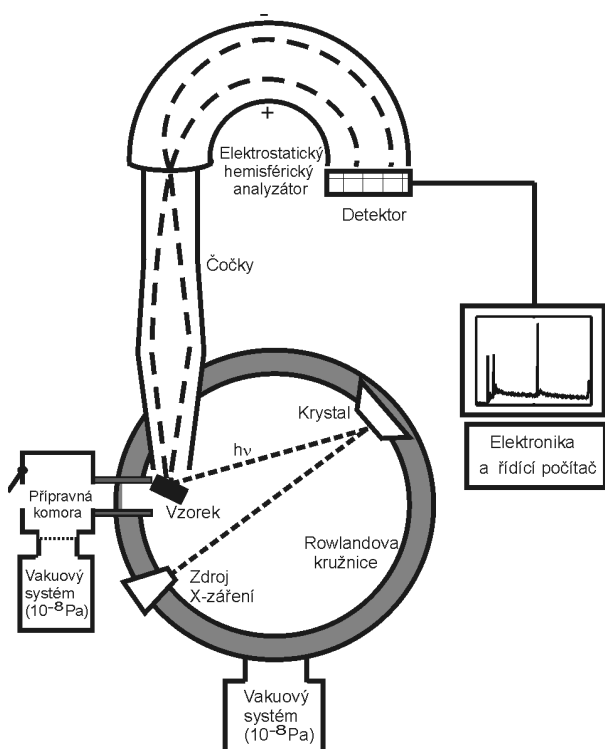
Původní myšlenka, na které je založena metoda ZEKE, je prostá – namísto měření distribuce fotoemitovaných elektronů, které vede k malému rozlišení, přeladovat zdroj budícího záření a měřit prahové energie fotoemise. Takto získané spektrum představuje závislost ionizačních prahů na vlnové délce záření. K výraznému zvýšení rozlišení vedlo použití přeladitelných laserů s úzkou distribucí energií emitovaných fotonů. Při metodě ZEKE je excitovaným stavem některý z výše ležících Rydbergových stavů, ze kterého je ZEKE elektron získán aplikací pulzu elektrického pole v krátké době (cca několik μ s) po excitaci. Tímto způsobem lze snadno oddělit elektrony s nulovou a nenulovou kinetickou energií a metoda se proto nazývá obvykle PFI (Pulse Field Ionization) ZEKE. Překvapujícím zjištěním byla neočekávaně dlouhá doba života Rydbergových stavů, vysvětlená později vlivem parazitních polí ve spektrometru a nehomogenními, časově závislými elektrickými poli, generovanými ionizací vzniklými ionty. ZEKE spektroskopie byla použita ke studiu řady

molekulárních iontů, van der Waalsových komplexů a klastrů. Tato metoda dovoluje studovat i intermediáty chemických reakcí s velmi krátkou dobou života. Podrobnější informace o metodě ZEKE a jejich aplikacích lze nalézt v knize E.W. Schlaga¹⁰.

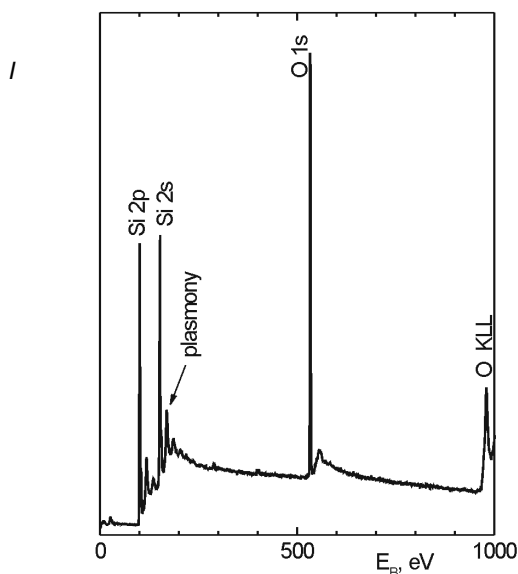
2.3. Rentgenová fotoelektronová spektroskopie

V další části tohoto příspěvku se budeme věnovat metodě XPS, která je v současné době nejčastěji používanou nedestruktivní metodou charakterizace povrchů, mezifází a tenkých vrstev. Praktický význam takových studií je zřejmý. Na površích probíhá řada procesů, z nichž k nejznámějším patří adsorpce, adheze, heterogenní katalýza, elektrokatalýza a koroze. Chemické složení povrchu implantátů předurčuje, zda bude implantát organismem akceptován. K porozumění povrchovým procesům a optimalizaci povrchového složení z hlediska zamýšlené aplikace je důležité znát chemické složení povrchových vrstev a způsob vazby přítomných atomů. K získání těchto informací existuje v současné době několik experimentálních metod, z nichž většina je založena na studiu interakce fotonů, elektronů, iontů příp. metastabilních atomů se studovanými povrchy. Mezi těmito metodami nepochybně k nejvýznamnějším patří metoda XPS.

Při metodě XPS je studovaný vzorek ozařován měkkým rentgenovým zářením. Obvykle je používána linie



Obr. 4. Schéma fotoelektronového spektrometru pro excitaci elektronů monochromatickým rentgenovým zářením



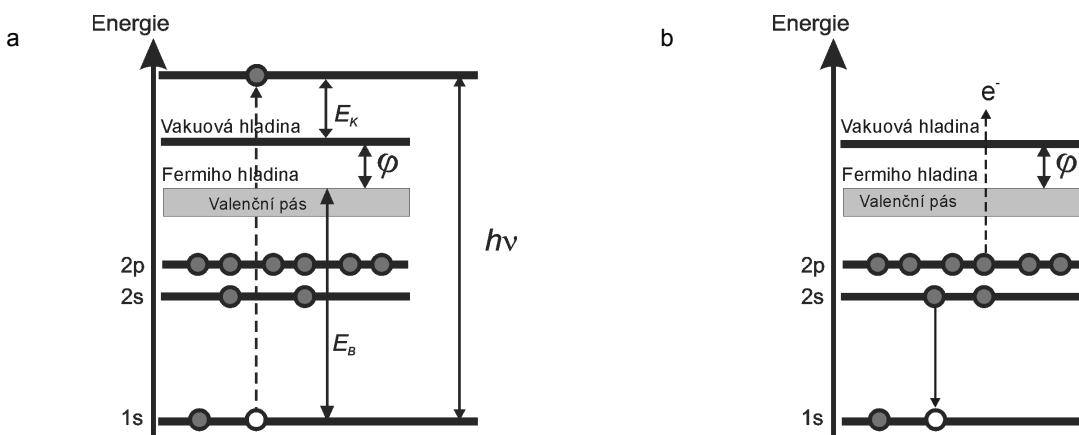
Obr. 5. XP spektrum krystalu Si s povrchovou vrstvou nativního oxidu změřené v oboru vazebných energií 0–1000 eV

$AlK\alpha$ s energií fotonů $h\nu = 1486,6$ eV, příp. $Mg K\alpha$ s $h\nu = 1253,6$ eV, jejichž průniková hloubka do pevných látek činí několik μm . Schéma spektrometru je uvedeno na obr. 4. Energie fotonů postačuje nejen k ionizaci valenčních elektronů, ale i k ionizaci vnitřních elektronů ve studovaném vzorku přítomných atomů. Změřené fotoelektronové spektrum je tedy, podobně jako v metodě UPS, replikou obsazených elektronových stavů ve vzorku přítomných prvků, pro které platí $E_B < h\nu$ (viz příklad na obr. 5). Fotoemisi elektronu z některé z vnitřních slupek atomu vznikne ion v excitovaném stavu, který deexcituje emisí fotonu nebo Augerovým procesem (viz obr. 6). Fotoionizace elektronů vnitřních tak vede k emisi více elektronů – fotoelektronu a Augerových elektronů. U prvků s atomovým číslem nižším než 20 je pravděpodobnost Augerovy deexcitace vyšší než deexcitace vyzářením fotonu. Augerův proces je tedy tříhladinový a kinetická energie E_K Augerových elektronů přechodu uvedeného na obr. 6 je dána vztahem:

$$E_K = E_B(1s) - E_B(2s) - E_B(2p) - U + \epsilon_r \quad (5)$$

kde U je energie coulombické interakce dvou děr v konečném stavu a ϵ_r je relaxační energie, zahrnující intraatomární a extraatomární relaxaci. Z historických důvodů se u Augerových přechodů používá jiné nomenklatury než u fotoemise a přechod $1s2s2p$ znázorněný na obr. 5 se v literatuře označuje jako přechod KL_1L_{23} .

Fotoemise z pevných látek bývá často doprovázena excitací dalších elektronů, řídící se monopólovými výběrovými pravidly nebo excitacemi kolektivních oscilací vodivostních elektronů. Tyto oscilace mají frekvence charakteristické pro daný materiál, a proto se projevují ve spektrech separátním pásem jako tzv. charakteristické plasmové ztráty. (viz obr. 5). Hodnota vazebné energie elektro-



Obr. 6. Schéma a) fotoemise 1s elektronu z kovu a b) deexcitace fotoemisí vzniklé díry Augerovým KL_1L_{23} přechodem vedoucí k emisi L_{23} elektronu. ϕ je výstupní práce kovu

nů E_B je u pevných látek obvykle definována k Fermiho hladině. Tato definice přináší určité problémy u polovodičů a izolátorů, u kterých na rozdíl od kovů Fermiho hladina nekoincduje s nejvyšší obsazenou hladinou.

U elektricky špatně vodivých materiálů navíc dochází při fotoemisi ke vzniku statického povrchového náboje, který posouvá vazebné energie k vyšším hodnotám. U moderních spektrometrů je tento problém řešen pomocí zdroje pomalých elektronů, které neutralizují povrchový náboj nebo kombinací zdroje pomalých elektronů a pomalých iontů (obvykle Ar^+).

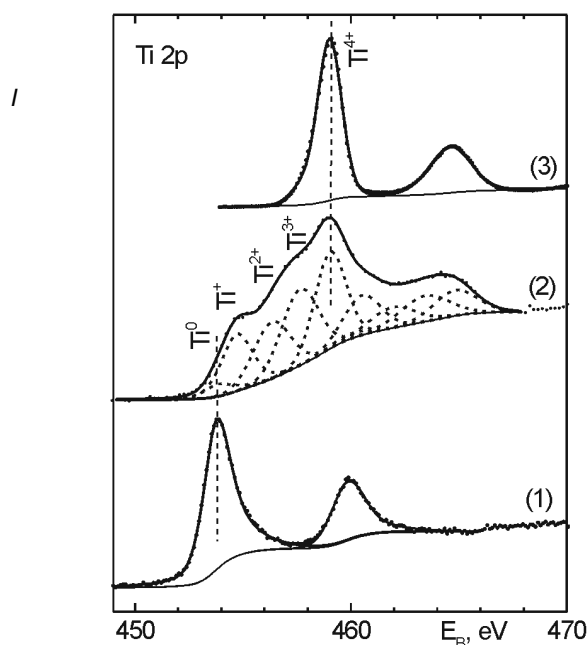
Hodnoty vazebné energie elektronů vnitřních slupek závisí na lokálním náboji a chemickém okolí emitujících atomů, což dovoluje rozlišit ve spektrech neekvivalentní chemické stavy atomů, např. různé oxidační stavy sledovaného prvku nebo identifikovat funkční skupiny přítomné v povrchové vrstvě vzorku (obr. 7). Vzhledem k narušené symetrii u povrchu vzorku se liší i hodnoty vazebných energií elektronů povrchových atomů od hodnot v podpovrchových vrstvách. V současnosti již existují rozsáhlé databáze hodnot vazebných energií (databáze¹¹ NIST obsahuje 29 000 dat) pro chemicky odlišné stavy prvků, které jsou užitečné pro určení způsobu vazby atomů prvků přítomných ve studovaném vzorku.

Přesný výpočet vazebných energií zahrnující vliv relaxační a korelační energie je, jak bylo již dříve uvedeno, náročný, a proto byla vypracována řada přibližných metod, které díky své názornosti umožnily pochopit některé empirické a semiempirické korelace. Z nich je nejznámější elektrostatický model CPM (Charge Potential Model) pocházející od Siegbahna, který kvalitativně objasňuje často pozorovanou korelaci vazebné energie elektronů vnitřních hladin a lokálního náboje na atomu.

Podle tohoto modelu je vazebná energie elektronu na vnitřní slupce atomu i E_B^i dána vztahem:

$$E_B^i = E_0^i + kq_i + \sum_j q_j / r_{ij} \quad (i \neq j) \quad (6)$$

kde E_0^i je referenční energie, q_i náboj na atomu i , r_{ij} vzdálenosti atomu i od sousedních atomů, $\sum_j q_j / r_{ij}$ je potenciál na atomu i vyvolaný působením sousedních atomů (nazývaný někdy Madelungův potenciál). Hodnoty nábojů na atomech lze získat populační analýzou. Tento model zanedbává relaxaci a je proto vhodný pro interpretaci změn vazebných energií u série podobných sloučenin.



Obr. 7. Spektra Ti 2p fotoelektronů emitovaných z Ti s atomárně čistým povrchem (1), Ti po oxidaci ionty kyslíku (2) a TiO₂ (3)

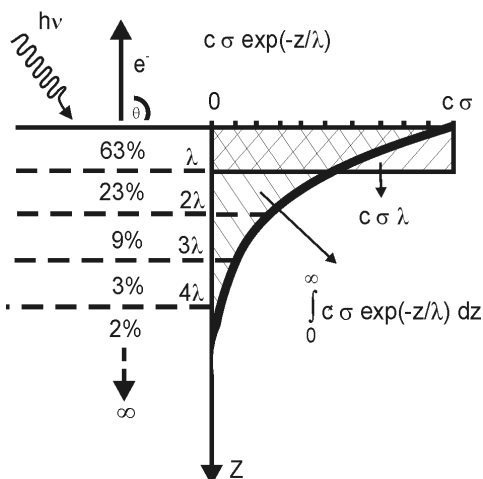
V současné době výkonných počítačů mají tyto přibližné metody omezený význam, jsou však stále pro svoji jednoduchost a názornost úspěšně používány, např. pro interpretaci vazebných energií C 1s elektronů série polymerů¹². Většina výpočtů vazebných energií se v současnosti provádí obvykle některou z variant DFT (Density Functional Theory) metod¹³.

Prvním krokem fotoemise je excitace elektronu v penetrační hloubce rentgenového záření. Dalším krokem je transport elektronu k povrchu vzorku. Přitom elektrony z hlubších vrstev ztrácejí část své kinetické energie v důsledku neelastického rozptylu. Pouze elektrony generované v povrchové vrstvě o tloušťce srovnatelné s jejich střední volnou dráhou λ ve studovaném materiálu mohou být emitovány bez ztráty energie. Hodnota λ závisí na chemickém složení vzorku a pohybuje se řádově v nm. Odtud vyplývá již dříve zmíněná povrchová selektivita metody XPS. Povrchovou citlivost lze ještě řádově zvýšit, dopadá-li záření na vzorek pod velmi malým úhlem ($\sim 1^\circ$) a dochází k totální reflexi (metoda je známá jako TRXPS, Total Reflection X-ray Photoelectron Spectroscopy).

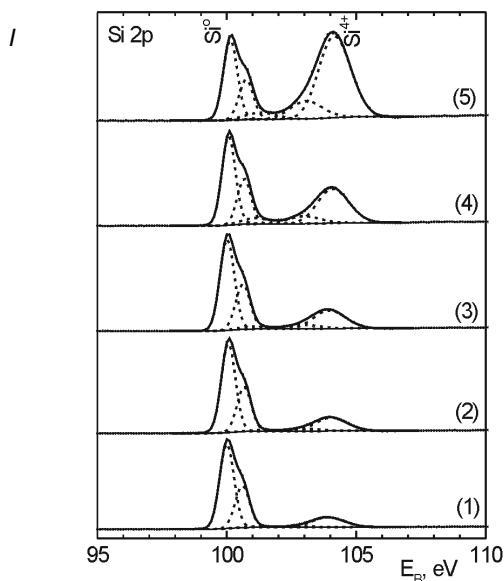
Intenzita fotoemisní linie i prvku A je úměrná konvoluci koncentračního hloubkového profilu $c(z)$ a pravděpodobností, že fotoelektron z hloubky z opustí vzorek bez ztráty kinetické energie (obr. 8):

$$I_A^i = K\sigma \int_0^\infty c(z) \exp(-z/\lambda_A \sin \theta) dz \quad (7)$$

kde K zahrnuje aparaturní faktory (tok fotonů, velikost ozařované plochy, transmisí analyzátoru elektronů, geometrie vzorku ve spektrometru, atd.), σ je parciální fotoionizační průřez, $c(z)$ koncentrace prvku A, která se obecně od povrchu do objemu vzorku mění, θ úhel měřený od po-



Obr. 8. Exponenciální pokles příspěvku k intenzitě fotoemisní linie se vzdáleností od povrchu do objemu vzorku, při kolmé fotoemisi pochází 95 % fotoelektronů z hloubky 3λ , viz rovn. (7)

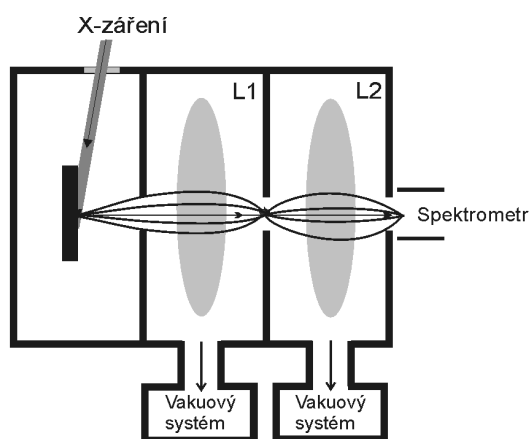


Obr. 9. Závislost intenzit komponent spekter Si 2p fotoelektronů na úhlu emise pro vzorek tvořený vrstvou nativního oxidu křemičitého na křemíku. Detekční úhel 90° (1), 70° (2), 50° (3), 30° (4) a 15° (5)

vrchu vzorku a λ_A je tzv. útlumová délka (attenuation length), která bývá často nahrazována jejich střední volnou dráhou. V současné době lze hodnoty λ_A získat pro prvky i jejich různé kombinace z databáze¹⁴ NIST. Jejich velikost se obvykle pohybuje od 1 do 5 nm. Povšimněme si, že rovn. (7) má tvar Laplaceovy transformace funkce $c(z)$ a koncentrační hloubkový profil je dán inverzní Laplaceovou transformací. Rovn. (7) umožňuje vypočítat intenzitu linie pro známý koncentrační profil. Naopak z intenzit spektrálních linií změřených u planárních vzorků pro několik detekčních úhlů lze v principu určit povrchový koncentrační gradient přítomných prvků (např. difuzní profil) nebo tloušťku vrstvy na povrchu vzorku (obr. 9). Pro obecný koncentrační profil je nutno řešení hledat numericky. Tato metoda má však řadu omezení, diskutovaných podrobně v literatuře¹⁵. Nejdůležitější z nich jsou podmínka rovinnosti povrchu vzorku a zanedbatelná refrakce a difrakce fotoelektronů.

Alternativní možnost nedestruktivního určení koncentračního hloubkového profilu a morfologie povrchových nanostruktur je založena na detailní analýze tvaru fotoemisní linie, který v důsledku neelastického rozptylu fotoelektronů závisí na hloubce, ze které je elektron emitován, a na nehomogenitě ve složení povrchové vrstvy¹⁶.

V posledních deseti letech došlo ke značným technickým zdokonalením XPS spektrometrů. Prakticky všechny spektrometry již používají fokusované, monochromatizované záření. Zdroj záření, vzorek, analyzátor i detektor jsou umístěny v komorách, které jsou čerpány obvykle turbomolekulárními a iontovými vývěvami do ultravysok-



Obr. 10. Systém čerpaných komor s elektrostatickými čočkami, umožňující měření fotoelektronových spekter za tlaku plynné fáze nad vzorkem $p \leq 5$ mbar

kého vakua řádu $\sim 10^{-8}$ Pa. K podstatnému zdokonalení došlo u analyzátorů elektronů a vstupních elektrostatických čoček. Současné spektrometry jsou standardně vybaveny mnohakanálovými detektory. V důsledku těchto technických zdokonalení lze měřit spektra elektronů, emitovaných z plochy o velikosti několika μm^2 a získat chemickou mapu vybrané oblasti na povrchu vzorku, t.j. laterální rozložení daného prvku nebo jeho určitého chemického stavu¹⁷. V r. 2007 byl uveden do prodeje spektrometr, který představuje kombinaci fotoelektronového emisního mikroskopu a dvou sériově spojených hemisférických analyzátorů a který dosahuje laterálního rozlišení 650 nm s klasickým zdrojem Al K α záření. Při použití synchrotronového záření je možné dosáhnout rozlišení až 150 nm. V blízké budoucnosti lze očekávat¹⁸ rozlišení lepší než 5 nm. V kombinaci s měřením úhlově rozlišených spekter tak lze u planárních vzorků získat trojrozměrnou informaci o distribuci vybraného prvku případně jeho chemického stavu.

V poslední době dochází k růstu zájmu o fotoelektronovou spektroskopii s vyššími excitačními energiemi (3 až 15 keV), označovanou¹⁹ HAXPES nebo HXPS (Hard X-ray Photoelectron Spectroscopy). Lze ji využít ke studiu elektronové struktury a chemického složení v hlubších vrstvách materiálů a potlačit tak výrazně příspěvek povrchu, který je dominující při energiích fotonů do 2 keV. Vzhledem k tomu, že fotoionizační průřez klesá s třetí mocninou energie fotonů budícího záření, jsou pro tato studia jako zdroj záření používány synchrotrony třetí generace a zdokonalené detektory elektronů.

Většina prakticky důležitých povrchových procesů však neprobíhá ve vakuu, ale za vyšších tlaků nebo dokonce v mezifázi kapalina/pevná látka. Střední volná dráha elektronů v plynu klesá s rostoucím tlakem a pro energie, připadající v úvahu u metody XPS již při tlaku 1 mbar, činí jen několik mm. Díky neelastickým srážkám elektro-

nů s molekulami plynu by měření spekter nebylo možné. Spektrometry určené pro měření za vyšších tlaků proto používají diferenciální čerpání, při kterém je vzorek oddělen od analyzátoru elektronů několika separátně čerpanými komorami opatřenými aperturou pro průchod fotoelektronů. Tato konstrukce byla podstatně zdokonalena instalací elektrostatických čoček, fokusujících elektrony na apertury^{20,21} (viz obr. 10). V současné době existují pouze dva spektrometry tohoto zdokonaleného typu (v Berlíně a v Berkeley), umožňující měření XP spekter za tlaku plynné fáze do 5 mbar a používající k excitaci fotoelektronů synchrotronové záření. Touto novou technikou, nazývanou někdy APPEs (Ambient Pressure Photoelectron Spectroscopy) bylo možno mj. potvrdit MD simulacemi předpovězené²² obohacení povrchu vodných roztoků alkaliálních halogenidů anionty (Br⁻, I⁻) či popsat na molekulární úrovni mechanismus kondenzace vody na povrchu některých oxidů. Metoda byla rovněž úspěšně použita ke studiu povrchových a katalytických reakcí. Její výhoda spočívá v možnosti sledovat při jednom experimentu kromě změn povrchu katalyzátoru při reakci i změny plynné fáze nad katalyzátorem. Omezení spočívají v možnosti ovlivnění studovaného vzorku intenzivním synchrotronovým zářením a v některých případech v problémech spojených s povrchovým statickým nábojem. Metoda APPEs má velmi rozsáhlé možnosti využití při studiu katalyzátorů a biologických materiálů, které však vzhledem k tomu, že jde o novou metodu, nemohly být dosud plně využity.

3. Závěr

V příspěvku je podán stručný přehled základů, současného stavu a některých možností využití metod ultrafialové, laserové a rentgenové fotoelektronové spektroskopie známých pod zkratkami UPS, PEEM, REMPI, ZEKE, XPS, HXPS a APPEs. Pozornost je též věnována vztahu měřených a vypočtených hodnot ionizačních a vazebných energií elektronů. U metody XPS jsou diskutovány současné možnosti jejího využití ke studiu povrchových nanostruktur a povrchů kapalné a tuhé fáze za zvýšeného tlaku plynné fáze. Nástup nové generace spektrometrů a zdrojů záření v posledních letech významně rozšířil znalosti v řadě důležitých oblastí, zahrnujících mimo jiné elektronovou strukturu molekul, molekulárních iontů a komplexů, klastrů, intermediátů chemických reakcí, fyziku a chemii povrchových vrstev a nanostruktur, biochemii, atmosférickou chemii a chemii životního prostředí.

Práce byla podpořena projekty AV ČR IET400400413 a GA ČR 106/06/0761. Autor děkuje Ing. I. Spirovové za pomoc při úpravě obrázků.

LITERATURA

1. Al-Joboury M. I., Turner D. W.: J. Chem. Soc. 1963, 5141.
2. Vilesov F. I., Kurbatov B. C., Terenin A. N.: Dokl.

- Akad. Nauk SSSR 138, 1329 (1961).
3. Siegbahn K., Nordling C., Fahlman A., Nordberg R., Hamrin K., Hedman J., Johansson G., Bergmark T., Karlsson S.-E., Lindgren I., Lindberg B.: *ESCA. Atomic, Molecular and Solid State Structure Studied By Means of Electron Spectroscopy*. Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis, Ser. IV., Vol. 20, Almquist and Wiksells, Uppsala 1967.
 4. Jenkin J. G., Riley J. D., Liesegang J., Leckey R. C. G.: J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 14, 477 (1978).
 5. Kimura K., Katsumata S., Achiba Y., Yamazaki T., Iwata S.: *Handbook of HeI Photoelectron Spectra of Fundamental Organic Molecules*. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo 1981.
 6. Johnson P. D.: Rept. Progr. Phys. 60, 1217 (1997).
 7. Ade H., Yang W., English S. L., Hartman J., Davis R. F., Nemanich R. J., Litvinenko V. N., Pinayev I. V., Wu Y., Madey J. M. J.: Surface Rev. Lett. 5, 1257 (1998).
 8. Samokhvalov A., Garguilo J., Yang W.-C., Edwards G. S., Nemanich R. J., Simon J. D.: J. Phys. Chem., B 108, 16334 (2004).
 9. Kimura K.: J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 100, 273 (1999).
 10. Schlag E. W.: *ZEKE Spectroscopy*. Cambridge Univ. Press, Cambridge 1998.
 11. *NIST X-Ray Photoelectron Spectroscopy Database: Version 4.0*, Standard Reference Data Program, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899-2310, 2008.
 12. Hoffmann E. A., Körtevényesi T., Wilusz E., Korugic-Karasz L. S., Karasz F. E., Fekete Z. A.: Theochem- J. Mol. Struct. 725, 5 (2005).
 13. Fiolhais C., Nogueira F., Marques M. (ed.): *A Primer in Density Functional Theory*. Springer-Verlag, Berlin 2003.
 14. *NIST Electron Inelastic Mean Free Path Database Ver. 1.1.*, NIST Standard Reference Database 71, NIST, Gaithersburg 2000.
 15. Cumpson P. J.: J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 73, 25 (1995).
 16. Tougaard S.: Surface Interface Anal. 26, 249 (1998).
 17. Bastl Z.: Čs. Čas. Fyz. 55, 621 (2005).
 18. Günther S., Kaulich B., Gregoratti L., Kiskinova M.: Progr. Surf. Sci. 70, 187 (2002).
 19. Metodě HAXPES je věnováno celé číslo časopisu Nucl. Instrum. Meth., A 547 (2005)
 20. Ogletree D. F., Bluhm H., Lebedev G., Fadley C., Hussain Z., Salmeron M.: Rev. Sci. Instrum. 73, 3872 (2002).
 21. Ghosal S., Hemminger J. C., Bluhm H., Mun B. S., Hebenstreit E. L. D., Ketteler G., Ogletree D. F., Requejo F. G., Salmeron M.: Science 307, 563 (2005).
 22. Jungwirth P., Tobias D. J.: J. Phys. Chem., B 106, 6361 (2002).

Z. Bastl (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*):
Photoelectron Spectroscopy in Third Millennium

The present review gives a concise overview of fundamentals, the present state and potential applications of ultraviolet, laser and X-ray photoelectron spectral methods such as UPS, PEEM, REMPI, ZEKE, XPS, HXPS and APPES are currently used. Attention is also paid to relations between the measured and calculated electron ionization and binding energies. The potentials of XPS methods to study surfaces and surface nanostructures at ambient pressure are highlighted. The advent of a new generation of photoelectron spectrometers and of new radiation sources significantly increased our knowledge in many important areas of chemistry and physics including electron structure of molecules, molecular ions and complexes, clusters, reaction intermediates in atmospheric and environmental chemistry, biochemistry, materials science and nanoscience.

VYUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE ZALOŽENÉ NA HYDROFILNÍCH INTERAKCÍCH PRO SEPARACE POLÁRNÍCH LÁTEK

JAN VACEK, LUCIA ONOFREJOVÁ, BOŘIVOJ KLEJDUS a VLASTIMIL KUBÁŇ

Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
kuban@mendelu.cz, jan.vacek@ibp.cz

Došlo 17.3.08, přepracováno 5.6.08, přijato 18.8.08.

Klíčová slova: HILIC, polární látky, separace, zwitterion, stacionární fáze, eluce, acetonitril, aminokyseliny, peptidy, DNA

Obsah

1. Úvod
2. Separace na polárních fázích a HILIC
3. Základní mechanismus separace HILIC
4. Aplikace HILIC
 - 4.1. Metabolity a farmakopreparáty
 - 4.2. Oligonukleotidy a složky nukleových kyselin
 - 4.3. Aminokyseliny a peptidy
 - 4.4. Proteiny
5. Závěry a perspektivy

1. Úvod

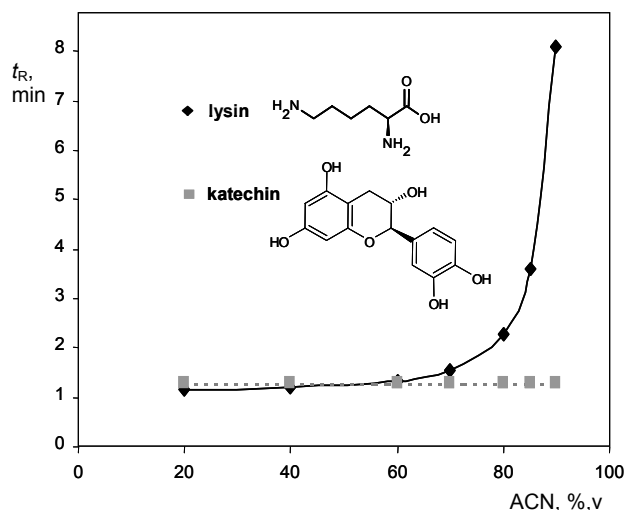
Kapalinová chromatografie byla použita pro separaci biologicky aktivních látek před více než 100 lety (cit.^{1,2}). V původně navržené kapalinové chromatografii na normální fázi (NPLC) se používá polární stacionární fáze a nevodná mobilní fáze, jako je aceton, chloroform, benzen atd. Uvedené chromatografické uspořádání bylo postupně nahrazeno separacemi na reverzních fázích (RPLC), u kterých je separační účinnost (při vhodné zvolených experimentálních podmínkách) výrazně vyšší, a to hlavně pro nepolární látky^{1–3}. V mnoha případech je značně komplikované separovat na klasických reverzních fázích (nejčastěji s vázanými alifatickými řetězci, oktadecyly C₁₈) polární analyty. V případech separace polárních i vysoce polárních látek dochází k jejich eluci v mrtvém retenčním čase. Separační instrumentace a experimentální uspořádání, které by řešilo problém separace polárních látek, bylo nalezeno až v roce 1990, kdy byla v odborném tisku prezentována metoda kapalinové chromatografie založená na hydrofilních interakcích mezi stacionární fází a separovanými látkami (HILIC: hydrophilic interaction liquid chromatography)^{4,5}. Nutno však podotknout, že A. Alpert, který termín „HILIC“ zavedl, nepoužil toto experimentální uspořádání jako první (detaily viz doktor-

ská práce P. Hemströma⁶).

O problematice separací HILIC nebylo v české literatuře doposud souborně referováno. Předpokládáme proto, že tento text bude vhodným úvodem do problematiky, která je dnes velmi aktuálním tématem řady bioanalytických laboratoří, o čemž svědčí enormní nárůst prací publikovaných o HILIC v minulém roce. Cílem práce je poskytnout základní informace o principech HILIC separace a poskytnout čtenáři přehled vybraných nejnovějších aplikací. Ucelené monografické zpracování⁷ a detailní studie⁸ byly publikovány dříve.

2. Separace na polárních fázích a HILIC

Polární stacionární fáze byly dříve široce rozšířeny a využívány pro chromatografii na tenké vrstvě (v plošném uspořádání). Kromě normálního fázového systému lze však tyto stacionární fáze využít i pro separace v reverzním módu, o čemž svědčí nedávno publikované práce (např. HPLC separace naftodianthronů, floroglucinolů^{9–11}, fenolických kyselin a flavonoidů¹²). Pro detailní pochopení separace na polárních stacionárních fázích a jejich uplatnění v RP a NPLC lze doporučit studie^{13,14}. Autoři se zde zabývali separací derivátů fenolu, hydrochinonu, chinolinu a anilinu.

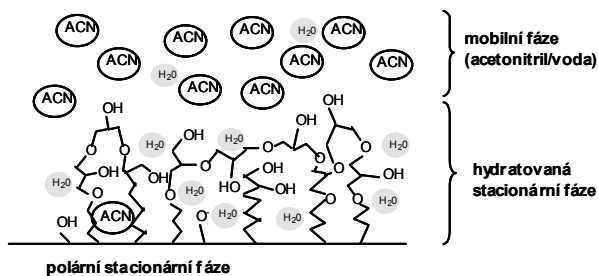


Obr. 1. Závislost retenčního času lysinu a (+)-katechinu na obsahu acetonitrilu (ACN) v mobilní fázi; experimentální podmínky: izokratická eluce, kolona Phenomenex, Luna HILIC, 5 μ m, 2,0 \times 100 mm, mobilní fáze: acetonitril/100 mmol dm⁻³ mravenčan amonný (vodný roztok); rychlost průtoku 0,3 ml min⁻¹, teplota kolony 25 °C; detektor negativní ESI/MS (SIM: lysin 145, katechin 289 m/z; koncentrace standardů 10 μ g/nástřík; \blacklozenge lysin, \blacksquare katechin

V jistém ohledu lze separaci HILIC označit za metodu, která vznikla spojením NPLC a RPLC. Avšak separace je zde zaměřena pouze na polární, ve vodě dobře rozpustné látky. K HILIC separacím se používají polární stacionární fáze a vodné mobilní fáze, které obsahují vysoký podíl organického rozpouštědla (více jak 60 %). Stacionární fáze musí být polárnější než fáze mobilní. Díky tomuto uspořádání je možné s vysokým rozlišením dělit polární analyty, přičemž nepolární látky, které nevykazují afinitu ke stacionární fázi, nejsou zadržovány. Uvedená situace je znázorněna na obr. 1, kde je aminokyselina lysin v závislosti na procentickém zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi zadržována polární stacionární fázi tvořenou kovalentně propojenými diolovými skupinami (obr. 2). V případě ve vodě méně rozpustného (+)-katechinu není zadržována a dochází k jeho eluci při mrtvém retenčním objemu (obr. 1).

Běžně je možné se setkat s polárními chemicky vázanými fázemi na partikulárním nebo monolitickém nosiči. Nejčastěji se jedná o klasickou silikagelovou stacionární fázi nebo fáze modifikované diolovými ($-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$), kyanovými ($-\text{CN}$), aminovými ($-\text{NH}_2$), amidovými ($-\text{CONH}_2$) funkčními skupinami (obr. 3a). Další možností je použití silikagel modifikovaný hydrofilními polymery, jako jsou poly(hydroxyethyl) nebo poly(sulfoethyl) (obr. 3b). Mezi nejnovější stacionární fáze pro HILIC patří také tzv. zwitteriontové stacionární fáze (ZIC[®]-HILIC, pozn.: ZIC: zwitterionic), viz obr. 3c. V takovýchto případech jde o chemicky vázané funkční skupiny nesoucí pozitivní a negativní náboj, které se vyznačují vysokou polaritou a vysokou afinitou k vodě^{15,16}. Zavedeny byly také sorbenty s chemicky vázanými jednotkami oligosacharidů¹⁷.

Při experimentální práci je nutné uvedené pravidlo týkající se vysokého zastoupení organického solventu v mobilní fázi striktně dodržet. Pokud není uvedena podmínka dodržena, nedochází již výhradně k hydrofilním interakcím mezi separovanými složkami a stacionární fází. V případě, že by mobilní fáze obsahovala pouze organické rozpouštědlo, jednalo by se o NPLC. Z těchto důvodů je HILIC také někdy označována jako chromatografie s vodnou normální fází nebo reverzní/reverz ní kapalinová chromatografie. Výše uvedené bývá nesprávně interpretováno i v odborné literatuře a často dochází k chybnému označení a interpretaci metody HILIC.



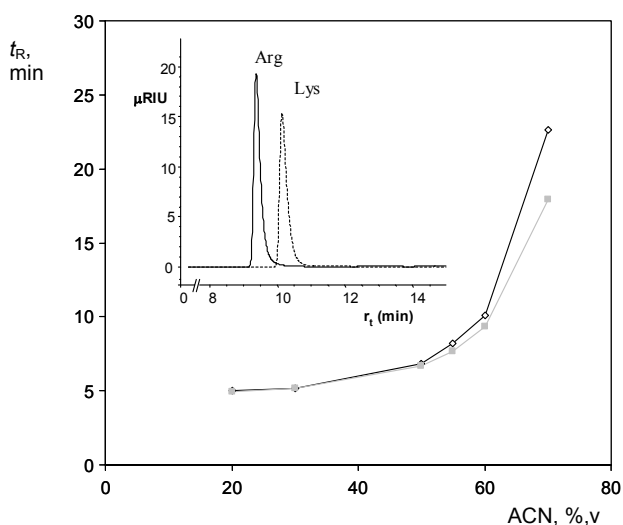
Obr. 2. Schéma dioly modifikované stacionární fáze

stacionární fáze	chemická struktura
a. silikagel	$-\text{OH}$
kyanopropyl	$-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$
aminopropyl	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
diol	$-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{OH}$
b. PAC	$-(\text{CH}_2-\underset{\text{C=O}}{\underset{\text{OH}}{\text{CH}}})_n-$
c. ZIC	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{N}^{\oplus}}}(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^{\ominus}$

Obr. 3. Stacionární fáze používané při HILIC; PAC – polymerní aniontová fáze, ZIC – zwitteriontová fáze

3. Základní mechanismus separace HILIC

Separace HILIC je v ideálním případě řízena hydrofilní interakcí mezi solutem a polární stacionární fází (tzv. primární interakce). V průběhu separace se ovšem uplatňují i druhotné interakce (např. elektrostatické interakce aj.), přičemž podmínkou je, aby zadrž solutu byla primárně řízena hydrofilními interakcemi. Předpokládá se, že k tomu, aby mohlo k hydrofilní interakci dojít, je potřeba, aby se na povrchu sorbentu stacionární fáze vytvořila hydratovaná vrstva (z angl. „water-rich layer“, viz též obr. 2). Mechanismus zadrž polárních látek v systému HILIC je dobře patrný při konstrukci retenčních map (závislostí retenčního času nebo faktoru na zastoupení organického solventu v mobilní fázi (viz obr. 1 a 4). Elektrostatické odpuzování separovaných složek (druhotné interakce) je možné omezit přidáním amonných solí organických kyselin, jako je např. mravenčan nebo octan amonný. Uvedené platí především pro negativně nabitou stacionární fázi na bázi silikagelu. Obvykle se amonné soli používají v milimolárních koncentracích, přičemž kation NH_4^+ je schopný kompenzovat negativní náboj stacionární fáze. Volba vhodné amonné soli je důležitá z hlediska její rozpustnosti v mobilní fázi (dosažení požadované iontové síly I) s vysokým obsahem organického rozpouštědla. V závislosti na vlastnostech, které od separačního média vyžadujeme, můžeme optimalizovat i další parametry, např. pro zvýšení ionizace při hmotnostně spektrometrické detekci je možné obohatit mobilní fázi přísadkou organické kyseliny (např. kyseliny mravenčí). Retence může být ovlivněna teplotou, aciditou mobilní fáze, koncentrací použité soli v mobilní fázi. Detailní informace o modelu retence doposud publikovány nebyly, nicméně původní práce A. Alperta⁵ upřednostňuje model rozdělovací (partition), oproti tomu v souhrnné práci P. Hemströma⁷ jsou prezentovány výsledky svědčící



Obr. 4. Separace lysinu a argininu na silikagelové stacionární fázi; závislost retenčních časů aminokyselin na procentickém zastoupení acetonitrilu (ACN) v mobilní fázi. Vložený obrázek: chromatogram argininu (Arg) a lysinu (Lys); izokratická eluce: ACN/vodný roztok mravenčanu amonného (100 mmol dm⁻³), 60/40 (% v/v). Experimentální podmínky: kolona Atlantis HILIC silica 3 μm, 4,6 × 150 mm, rychlost průtoku mobilní fáze 0,5 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C; refraktometrický detektor (teplota optické jednotky 30 °C); koncentrace aminokyselin 10 μg/nástřik; ■ Arg, ◇ Lys

spíše ve prospěch adsorpčního modelu. Model retence byl mnohokrát diskutován v případě RPLC¹⁸, avšak podobně jako u HILIC nebyl mechanismus retence detailně objasněn.

4. Aplikace HILIC

Na základě publikací, které se věnují využití HILIC, lze předpokládat, že přednostně bude metoda uplatňována pro separaci aminokyselin¹⁹ a peptidů²⁰. Pro tyto účely byly nalezeny vhodné podmínky v různých systémech izokratické a gradientové eluce. V případě gradientové eluce lze měnit zastoupení organického solventu nebo soli v mobilní fázi. Svě uplatnění nalézá HILIC i v separaci oligonukleotidů^{21,22}, složek nukleových kyselin a cukrů (oligo- a polysacharidů). Kromě možností, které HILIC poskytuje v analýzách ve vodě dobře rozpustných biopolymerů, byly uveřejněny práce zaměřené na separaci nízkomolekulárních organických látek. Mnohé z těchto sloučenin nacházejí uplatnění v biomedicíně a farmakochemii.

4.1. Metabolity a farmakopreparáty

Pomocí HILIC bylo separováno celé spektrum farmaceuticky využívaných látek v komplexních matricích vzorků krve, moči, plasmu a ve vybraných homogenátech tkání. Jednalo se o separaci kyseliny listové a jejich solí²³,

dále separace kokainu a dalších derivátů alkaloidů (např. morfinu)²⁴. Byly také separovány aminoglykosidové farmakopreparáty (amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, paromomycin, tobramycin)²⁵, cholin a acetylcholin²⁶, uridin, uracyl²⁷ a další organické sloučeniny. Uvedený výčet představuje komplexní skupinu polárních metabolitů a léčiv²⁸. Detailně byla retence polárních sloučenin s malou molekulovou hmotností studována na klasické silikagelové stacionární fázi a na fázích s vázanými amidovými, aminovými a sulfobetainovými skupinami. Za různých experimentálních podmínek a různého složení mobilní fáze byla separována kyselina salicylová, aspirin a cytosin⁸. U uvedených stacionárních fází byly hledány fyzikální i chemické podmínky, které ovlivňují retenci separovaných složek. Vliv teploty byl studován podobně jako u RPLC pomocí van't Hoffovy rovnice a ve většině experimentů byl pozorován pokles retence se vzrůstající teplotou kolony v průběhu separace. Jak bylo prokázáno, je vliv pH mobilní fáze na retenci analytů řízen primárně disociačními konstantami jednotlivých protonizovaných funkčních skupin (pK_a), které jsou typické pro danou látku. Různý stupeň protonizace separovaných složek tedy určuje jejich afinitu ke stacionární fázi.

4.2. Oligonukleotidy a složky nukleových kyselin

Separace nukleových kyselin na polárních stacionárních fázích byla zmíněna již v původních publikacích o HILIC⁵. Mezi nejnovější aplikace v této oblasti separace HILIC patří práce^{21,22,29}. Monolitická kapilární kolona modifikovaná polárním polymerem kyseliny akrylové byla použita pro separaci nukleosidů (uridinu, guanosinu a adenosinu) elucí mobilní fázi složenou z acetonitrilu a 0,2% vodného roztoku kyseliny mravenčí v poměru 90/10 (% v/v)²⁹. Monolitické kolony byly také použity pro gradientovou separaci oligonukleotidů²¹. Separován byl homooligomer a heteropolymerní sekvence 19-ti a 20-ti merů v mobilní fázi acetonitrilu, vody a octanu triethylaminu. Vysoké separační účinnosti bylo dosaženo také při separacích thyminu, uracilu, uridinu, adenosinu, adeninu, guanosinu a dalších na speciální polymerní stacionární fázi²². V případě retence nukleových kyselin na polárních stacionárních fázích je nutné rozlišit, zda se jedná o nukleosid, nukleotid nebo zda je báze součástí oligo- nebo polynukleotidového řetězce.

4.3. Aminokyseliny a peptidy

Pomocí HILIC je možné separovat všechny proteino- genní aminokyseliny a mnohé z jejich derivátů. Obecně nejvyšší zádrž mají polární aminokyseliny (Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu). Separacím ve vodě dobře rozpustného cysteinu se většina autorů vyhýbá, jelikož tato aminokyselina podléhá v přítomnosti kyslíku a v závislosti na pH mobilní fáze oxidaci na méně rozpustný cystin. Komplexní separaci proteino- genních aminokyselin se ve své práci věnoval Langrock a spol.¹⁹. Pomocí gradientové eluce acetonitrilu a vodného roztoku octanu amonného byly

aminokyseliny rozděleny v pořadí Trp, Phe, Leu, Ile, Met, Tyr, Val, Pro, Ala, Thr, Gly, Glu, Asp, Ser, Gln a Asn. Během gradientové eluce byl postupně zvyšován podíl vody v mobilní fázi, přičemž polární asparagin vykazoval nejvyšší afinitu k amidové stacionární fázi. Pomocí HILIC byl také analyzován ornitin³⁰. Rozdělení aminokyselin lysinu a argininu je naznačeno na obr. 4, kde za uvedených podmínek arginin vykazuje nižší afinitu k silikagelové stacionární fázi než lysin. Jak z obrázku vyplývá, k dobrému rozdělení aminokyselin je potřeba, aby mobilní fáze obsahovala více než 60 % acetonitrilu.

V případě separace peptidů byla studována rozsáhlá skupina oligopeptidů s různou primární strukturou a různým zastoupením polárních aminokyselinových zbytků²⁰. Mezi polární a ve vodě dobře rozpustné peptidy patří glutathion (γ -Glu-Cys-Gly), který zastává řadu fyziologických homeostatických a detoxikačních funkcí³¹. Tento tripeptid byl separován na silikagelové stacionární fázi³² a pomocí HILIC bylo možné studovat jeho postupnou oxidaci na glutathion disulfid³³. Peptidy obsahující zbytky kyseliny glutamové (γ -Glu-Leu, γ -Glu-Val, γ -Glu-Cys- β -Ala, γ -Glu-Cys-Gly)³⁴ byly separovány na HILIC semipreparativních a preparativních kolonách.

4.4. Proteiny

Mezi první práce, které se věnovaly problematice HILIC separace proteinů, byla publikace Lindnera a spol.³⁵, kteří studovali acetylaci lysinů v *N*-koncev doméně histonů. Histony byly před nástřikem na kolonu HILIC izolovány metodou RPLC. K tomuto účelu autoři použili kolonu SynChropak CM 300 a gradientovou eluci směsnými rozpouštědly složenými z acetonitrilu a vodného roztoku fosforečnanu triethylaminu a NaClO₄. Ve frakcích RPLC byly pomocí HILIC identifikovány jednotlivé modifikace histonů H2A a H4. Tyto vysoce polární, hydrofilní a na svém povrchu převážně kladně nabitě bílkoviny jsou součástí chromatinového komplexu a podílejí se na expresi genů a řízení buněčného cyklu. K identifikaci jednotlivých histonů byla použita fotometrická detekce při 210 nm, při kterých absorbují peptidické vazby. ZIC/HILIC mikrokolonová separace byla také použita pro analýzy glykosylovaných proteinů a ke studiu jejich deglykosylace³⁶. K identifikaci proteinů byla použita tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Dá se předpokládat, že HILIC nalezne uplatnění v separaci vybraných proteinů podléhajících post-translačním modifikacím, které jsou dobře rozpustné ve vodě.

5. Závěry a perspektivy

Byly navrženy různé strategie pro separaci polárních látek. V případě RPLC je běžně využíván mechanismus tvorby iontových párů³⁷. Iontově-párové činidlo (např. kyselina trifluoroctová, TFA) interaguje v mobilní fázi se separovanými molekulami a zvyšuje jejich afinitu k povrchu reverzní fáze. Na druhou stranu, přítomnost TFA

v mobilní fázi rapidně snižuje citlivost MS detekce při použití ionizace elektrosprejem. Další možností je použít jinou stacionární fázi, což je i případ HILIC. Jak je patrné z předchozího textu, není HILIC doposud dostatečně prozkoumanou oblastí a samotné vymezení pojmu hydrofilní interakce přináší pro chromatografickou separaci řadu nových nevyřešených problémů. Důvodem je komplexnost separačních dějů a různý podíl jednotlivých interakcí a v neposlední řadě i faktorů, které se uplatňují v závislosti na složení mobilní fáze. I přesto lze použitím HILIC velmi efektivně separovat řadu polárních látek a dá se předpokládat její další vývoj a zvyšující se počet aplikací, včetně jejího využití ve spojení s jinými chromatografickými technikami v 2-D systémech. Perspektivní využití je zřejmě i v kombinaci s hmotnostními detektory³⁸ a nukleární magnetickou rezonancí³⁹.

Již na základě stávajícího vývoje HILIC lze předpokládat její širší uplatnění pro separace na monolitických nosičích, a také se začínají objevovat nové modifikace a materiály¹⁷ vhodné pro HILIC stacionární fáze. V tomto roce byla také zveřejněna práce zaměřená na separaci peptidů, která je založena na hydrofilních interakcích, ale také na elektrostatickém odpuzováním separovaných složek se stacionární fázi (iontové interakce). Byla tak navržena hybridní separace vycházející z HILIC a iontově výměnné chromatografie⁴⁰. Autor práce metodu označil jako ERLIC (electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography).

LITERATURA

1. Abraham M. H.: *J. Chromatogr.*, A 1061, 113 (2004).
2. Engelhardt H.: *J. Chromatogr.*, B 800, 3 (2004).
3. Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M.: *Chem. Listy* 101, 190 (2007).
4. Alpert A. J.: *J. Chromatogr.* 444, 269 (1988).
5. Alpert A. J.: *J. Chromatogr.* 499, 177 (1990).
6. Hemström P.: *PhD. disertace*. Umeå University, Švédsko, s. 24, Umeå 2007.
7. Hemström P., Irgum K.: *J. Sep. Sci.* 29, 1784 (2006).
8. Guo Y., Gaiki S.: *J. Chromatogr.*, A 1074, 71 (2005).
9. Pavlík M., Vacek J., Klejdus B., Kubáň V.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 6147 (2007).
10. Vacek J., Klejdus B., Kubáň V.: *Čes. Slov. Farm.* 56, 62 (2007).
11. Pavlík M., Vacek J., Klejdus B., Kubáň V.: *Chem. Listy* 101, 556 (2007).
12. Vacek J., Klejdus B., Lojková L., Kubáň V.: *J. Sep. Sci.* 31, 2054 (2008).
13. Petruczynik A., Waksmundzka-Hajnos M., Hawryl A., Ziolkowska A.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 48, 881 (2003).
14. Waksmundzka-Hajnos M., Petruczynik A., Soczewiński E., Hawryl A.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 47, 483 (2002).
15. Idborg H., Zamani L., Edlund P. O., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S. P.: *J. Chromatogr.*, B 828, 9 (2005).

16. Idborg H., Zamani L., Edlund P. O., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S. P.: *J. Chromatogr.*, B 828, 14 (2005).
17. Guo Z. M., Lei A. W., Zhang Y. P., Xu Q., Xue X. Y., Zhang F. F., Liang X. M.: *Chem. Commun.* 2007, 2491.
18. Vailaya A., Horváth C.: *J. Chromatogr.*, A 829, 1 (1998).
19. Langrock T., Czihal P., Hoffmann R.: *Amino Acids* 30, 291 (2006).
20. Yoshida T.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 60, 265 (2004).
21. Holdšvendová P., Suchánková J., Bunček M., Bačkovská V., Coufal P.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 23 (2007).
22. Hosoya K., Hira N., Yamamoto K., Nishimura M., Tanaka N.: *Anal. Chem.* 78, 5729 (2006).
23. Garbis S. D., Melse-Boonstra A., West C. E., van Breemen R. B.: *Anal. Chem.* 73, 5358 (2001).
24. Giroud C., Michaud K., Sporkert F., Eap C., Augsburg M., Cardinal P., Mangin P.: *J. Anal. Toxicol.* 28, 464 (2004).
25. Oertel R., Neumeister V., Kirch W.: *J. Chromatogr.*, A 1058, 197 (2004).
26. Uutela P., Reinila R., Piepponen P., Ketola R. A., Kostiaainen R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 2950 (2005).
27. Beumer J. H., Joseph E., Egorin M. J., Covey J. M., Eiseman J. L.: *J. Chromatogr.*, B 831, 147 (2006).
28. Iwasaki Y., Ishii Y., Ito R., Saito K., Nakazawa H.: *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 30, 2117 (2007).
29. Horie K., Ikegami T., Hosoya K., Saad N., Fiehn O., Tanaka N.: *J. Chromatogr.*, A 1164, 198 (2007).
30. Martens-Lobenhoffer J., Postel S., Troger U., Bode-Boger S. M.: *J. Chromatogr.*, B 855, 271 (2007).
31. Vacek J., Havel L.: *Biol. Listy* 70, 169 (2005).
32. Vacek J., Klejdus B., Petrlová J., Lojtková L., Kubáň V.: *Analyst* 131, 1167 (2006).
33. Iwasaki Y., Hoshi M., Ito R., Saito K., Nakazawa H.: *J. Chromatogr.*, B 839, 74 (2006).
34. Dunkel A., Koster J., Hofmann T.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 6712 (2007).
35. Lindner H., Sarg B., Meraner C., Helliger W.: *J. Chromatogr.*, A 743, 137 (1996).
36. Hagglund P., Bunkenborg J., Elortza F., Jensen O. N., Roepstorff P.: *J. Proteome Res.* 3, 556 (2004).
37. Shibue M., Mant C. T., Hodges R. S.: *J. Chromatogr.*, A 1080, 68 (2005).
38. Weng N. D.: *J. Chromatogr.*, B 796, 209 (2003).
39. Godejohann M.: *J. Chromatogr.*, A 1156, 87 (2007).
40. Alpert A. J.: *Anal. Chem.* 80, 62 (2008).

J. Vacek, L. Onofrejevá, B. Klejdus, and V. Kubáň
(*Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography in Separation of Polar Compounds**

Applicability of classical procedures based on reverse-phase liquid chromatography in separation of water-soluble polar substances is generally limited. In many cases, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is able to separate highly polar substances using polar stationary phases and aqueous mobile phases containing increased amounts of organic solvents. Separation of amino acids, peptides, nucleic acids and other organic substances with special emphasis on explanation of basic principles are discussed in the present review.

ZMĚNA GLYKOSYLACE NA SÉROVÝCH GLYKOPROTEINECH U PACIENTEK S RAKOVINOU VAJEČNÍKU PRAVDĚPODOBĚ PŘÍSPÍVÁ K PATOGENEZI NEMOCI

**RADKA ŠALDOVÁ^a, PAULINE M. RUDD^a
a JAN KÁŠ^b**

^a *Dublin-Oxford Glycobiology Laboratory, NIBRT, Conway Institute, UCD, Dublin 4, Irská republika,*

^b *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika
radka.saldova@nibr.t.ie, pauline.rudd@nibr.t.ie,
Jan.Kas@vscht.cz*

Došlo 7.5.08, přijato 6.8.08.

Klíčová slova: glykosylace sérových proteinů, rakovina vaječnicku, imunoglobuliny, biomarker

Obsah

1. Úvod
2. Změna glykosylace u rakoviny
 - 2.1. Změny glykosylace u pacientek s rakovinou vaječnicku
3. Změny koncentrace proteinů akutní fáze v krvi při zánětu a jejich glykosylace
 - 3.1. Haptoglobin
 - 3.2. α 1-Kyselý glykoprotein
 - 3.3. α 1-Antichymotrypsin
 - 3.4. Zvýšená koncentrace pozitivních proteinů akutní fáze v plasmě
4. Glykosylace molekul imunitního systému
 - 4.1. Snížený obsah galaktosy a sialových kyselin na IgG má vliv na jeho funkci
5. Funkce imunitní odpovědi
6. Závěr

1. Úvod

Rakovina vaječnicku je nečastější příčinou úmrtí ze všech gynekologických rakovin podle Britské statistiky úmrtnosti¹. Většina pacientek je diagnostikována v pokročilém stádiu nemoci². 90 % pacientek diagnostikovaných v raném stádiu se dožije víc než 5 let, zatímco pokud jsou diagnostikovány v stádiu III nebo IV, déle než 5 let žije jen 30 % pacientek². Podle statistiky České gynekologické společnosti (<http://www.linkos.cz/pacienti/gynekologie.php?t=6>) je v České republice rakovina vaječnicku na druhém místě gynekologických rakovin po rakovině děložního hrdla.

Rakovina vaječnicku se většinou nachází na povrchu ovaria³. Rizikové faktory jsou: více let ovulace, zánět

v oblasti pohlavních orgánů, vystavení asbestu, endometrióza⁴, rodinná historie rakoviny vaječnicku, prsu nebo jiné rakoviny reprodukčních orgánů, také rakoviny střeva⁵ a hormonální terapie estrogenem po menopauze trvající více než 10 let⁶.

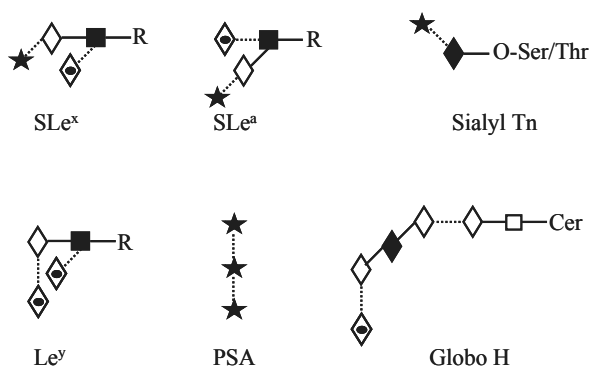
Rakovina vaječnicku je diagnostikována většinou pomocí ultrasonografie, sérového biomarkeru CA125 nebo kombinací obou². CA125 je zvýšený u 80-90 % pacientek s rakovinou vaječnicku, odpovídá stádiu nemoci, ale není spolehlivý při detekci časného stádia rakoviny. Falešně pozitivní výsledky mohou být obdrženy v případech nezhoubných nádorů, těhotenství a nebo jiných typů rakoviny². Proto je třeba dalších biomarkerů, které by doplnily CA125. Potenciální biomarkery v současné době zahrnují polypeptidový specifický antigen, lysofosfatidovou kyselinu, inhibin, kallikreiny a další bioaktivní sloučeniny^{2,7}. Dále i přístup proteomiky může být užitečný k objevení nových biomarkerů pro rakovinu vaječnicku⁸⁻¹¹.

U pacientek s rakovinou vaječnicku byly nalezeny změny v glykosylaci proteinů akutní fáze haptoglobinu, α 1-antitrypsinu¹², α 2-makroglobulinu, transferinu¹³ a IgG¹⁴ a také zvýšené množství glykosylovaných forem neurotoxinu z eosinofilů a C-koncové peptidy z osteopontinu¹⁰.

2. Změna glykosylace u rakoviny

Změna v glykosylaci nastává v případech imunodeficiency, rakoviny a při autoimunitních onemocněních. V případě rakoviny jsou to buď zvýšený nebo snížený obsah přirozeně se vyskytujících sacharidů a také výskyt nových sacharidů, které se za normálních okolností vyskytují pouze u embryonálních tkání¹⁵. Tyto změny jsou způsobeny změnou hladiny exprese glykosyltransferas v Golgiho aparátu rakovinných buněk¹⁵. Změny v hladině glykosyltransferas vedou k modifikacím ve struktuře *N*-a *O*-vázaných sacharidů¹⁵.

Jednou z nejčastějších změn je nárůst velikosti a větvení *N*-vázaných sacharidů¹⁵. Enzym, který je zodpovědný za nárůst větvení sacharidů je *N*-acetylglukosaminyltransferasa V (GlcNAc-TV), který vede k β 1,6GlcNAc větvení¹⁶. Zvýšené větvení tvoří více míst k připojení terminálních sialových kyselin a spolu se zvýšenou produkcí sialyltransferas tvoří sacharidy s více sialovými kyselina-mi¹⁷. Tyto změny odrážejí změny v expresních hladinách sialyltransferas a fukosyltransferas v Golgiho aparátu¹⁵ a korelují se stádiem pokročilé rakoviny, vývojem nádoru a metastázemi¹⁷. Většinou se mění množství určitých sacharidů spíše, než se vyskytují nové struktury sacharidů¹⁸. Zvýšené větvení a obsah sialových kyselin u sacharidů se také vyskytuje v případě chronických zánětů¹⁹. Jelikož chronický zánět je často pozorován u rakoviny²⁰, tyto změny mohou být spojeny se zánětem.



Legenda

○	Manosa	Pozice vazby	
□	Glukosa		
■	<i>N</i> -acetylglukosamin	Typ vazby α -vazba — β -vazba ~ neznámá vazba
◊	Fukosa (deoxygalaktosa)		
◇	Galaktosa		
◆	<i>N</i> -acetylgalaktosamin		
★	<i>N</i> -acetylneuraminová kyselina		

Obr. 1. Nádorové antigeny – sialyl Lewis x (SLe^x), sialyl Lewis a (SLe^a), sialyl Tn, Lewis y (Le^y), polysialová kyselina (PSA) a globo H²⁵; R indikuje, kde je sacharid připojen k polypeptidovému řetězci a ceramidu, tedy ke glykolipidovému řetězci

Za povšimnutí stojí, že nebyly nalezeny žádné změny glykosylace sérových proteinů u pacientů s rakovinou kůže, kteří měli nízkou hladinu zánětlivých procesů¹⁸.

Nejčastější struktury epitopů nalezené na glykoproteinech na povrchu rakovinných buněk jsou: sialyl Lewis x (SLe^x), sialyl Lewis a (Le^a), sialyl Tn, Globo H, Lewis y a polysialová kyselina (PSA)^{21–28} (obr. 1). Metastáze jsou zprostředkovány adhezí mezi rakovinnými buňkami a krevními destičkami ke vzdáleným endotelním buňkám v krevním oběhu²⁹. Selektiny vážou SLe^x na nádorových buňkách a přispívají k rozšíření nádorových buněk do vzdálených orgánů³⁰.

SLe^x epitop se skládá ze sialové kyseliny vázané α 2,3 ke galaktose, která je vázaná β 1–4 k GlcNAc, a k tomuto GlcNAc je také vázaná fukosa α 1,3 vazbou. Tento epitop byl poprvé popsán v gangliosidové frakci lidských ledvin³¹ a stopové množství bylo nalezeno v lidském mléce³². SLe^x je také exprimován na haptoglobinu, α 1-kyselém glykoproteinu, α 1-antichymotrypsinu³³ a na neutrofilních granulocytech³⁴ během zánětu. SLe^x epitop byl nalezen v několika případech lidské rakoviny²⁶ (na obr. 2 na sacharidu se třemi anténami). Zvýšená koncentrace SLe^x nastává pravděpodobně změnou regulace fukosyltransferas v jaterních hepatocytech. Aby vznikl tento epitop, prekurzor musí být nejdříve sialován a pak fukosylován pomocí

α 1,3/1,4) fukosyltransferas^{26,35}. Zvýšená koncentrace SLe^x epitopu koreluje se sníženou expresí α -1,2-fukosyltransferasy, enzymu, který soutěží s α -2,3-sialyltransferasou o stejný substrát³⁶ a zvýšenou expresí α -(1,3/1,4)-fukosyltransferas^{35,37}.

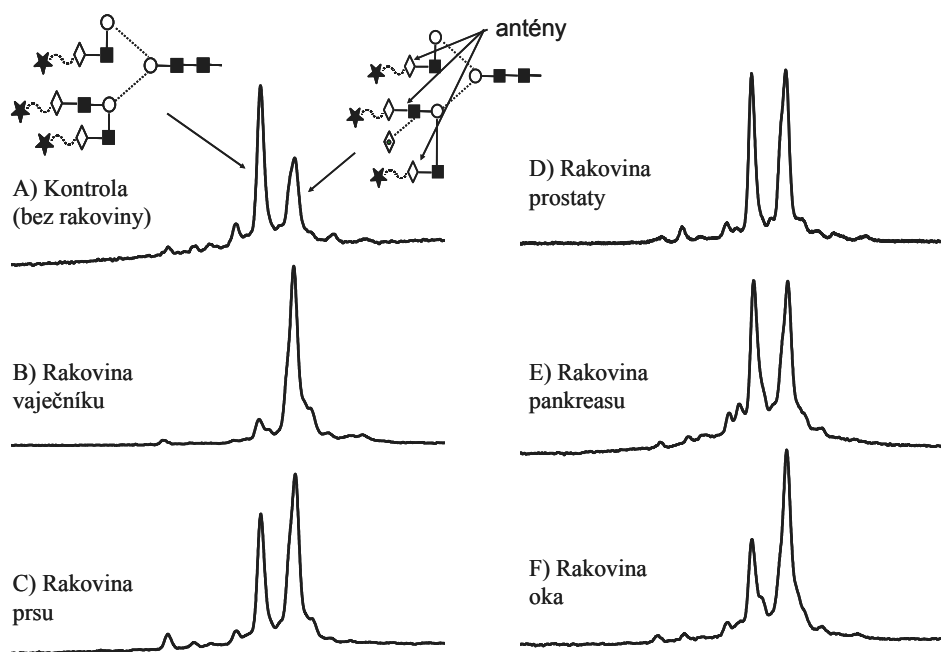
2.1. Změna glykosylace u pacientek s rakovinou vaječníku

U rakoviny vaječníku dochází ke zvýšení větvení a obsahu sialových kyselin na sacharidech sérových glykoproteinů¹⁸. Nejvýraznější změny zahrnují zvýšené množství sacharidu bez galaktosy s dvěma anténami (pochází z IgG) a SLe^x epitopu (z haptoglobinu β -řetězce, α 1-kyselém glykoproteinu a α 1-antichymotrypsinu)¹⁸. Tyto změny odrážejí chronický zánět pozorovaný u rakoviny. Bylo prokázáno, že zánět v dané oblasti zvyšuje metastatický potenciál rakovinných buněk³⁸. Zvýšená koncentrace SLe^x epitopu není specifická pro rakovinu, ale také byla nalezena v případě zánětu^{19,33,39}. I tak měření koncentrace SLe^x může být užitečné pro dlouhodobé studium pacientek a monitorování průběhu nemoci. Také byl pozorován nárůst ve vazbě sialové kyseliny α 2,3 vzhledem k α 2,6 na glykoproteinech v séru pacientek s rakovinou vaječníku¹⁸. Tato změna je konzistentní s přechodím zjištěním snížené mRNA exprese α -2,3-sialyltransferas a zvýšené mRNA exprese α -2,6-sialyltransferasy v tkáních pacientek s rakovinou vaječníku⁴⁰. Nádorové buňky z ovaria produkují cytokiny^{41,42}, které mohou ovlivnit tvorbu sacharidů jak v nádorových buňkách, tak v okolních tkáních^{43,44} a mohou také ovlivnit glykosylační proces v játrech a způsobit změnu v glykosylaci sérových glykoproteinů.

3. Změna koncentrace proteinů akutní fáze v krvi při zánětu a jejich glykosylace

Zánět je komplexní obranný mechanismus, kdy leukocyty putují do poškozené tkáně zneškodnit zdroj, který způsobil zranění tkáně⁴⁵. Akutní zánět je limitovaná krátkodobá odpověď, obzvláště během infekce, zatímco chronický zánět je dlouhodobý fenomén, který může vést až k poškození tkáně⁴⁵. Při akutním zánětu se většinou vyskytují neutrofilní leukocyty, ale za 1 až 2 dny převládají monocyty⁴⁵. Chronický zánět je spojen s přítomností mononukleárních buněk, jako jsou makrofágy a lymfocyty⁴⁵. Cytokiny hrají důležitou roli při odpovědi na zánět⁴⁵.

Při akutní zánětlivé odpovědi se zvyšuje koncentrace proteinů akutní fáze, jako je C-reaktivní protein, serum amyloid A, haptoglobin, α 1-kyselý glykoprotein, α 1-antitrypsin, α 1-antichymotrypsin a fibrinogen (pozitivní proteiny akutní fáze) nebo se snižuje koncentrace albuminu a transferinu (negativní proteiny akutní fáze). Tyto změny se vrací k normálu během 2 týdnů⁴⁶. Chronický zánět spojený s rakovinou také navozuje zánětlivou odpověď, ale tyto změny v koncentraci sérových proteinů trvají déle. Cytokiny jsou hlavními stimulanty produkce proteinů



Obr. 2. Typické NP HPLC chromatogramy sacharidů z frakce sacharidů obsahující tři sialové kyseliny (a tři antény) rozdělené WAX HPLC z A) kontroly (sérum ze zdravého jedince), a séra pacientů s rakovinou B) vaječníku, C) prsu, D) prostaty, E) pankreatu a F) oka

akutní fáze⁴⁶. Jsou produkovány během zánětlivého procesu řadou buněk, nejdůležitějším zdrojem jsou makrofágy a monocyty na zánětlivých místech⁴⁶.

V séru pacientek v pokročilém stádiu rakoviny vaječníku byla identifikována změna v glykosylaci na haptoglobinu, α 1-kyselém glykoproteinu, α 1-antichymotrypsinu a α 1-antitrypsinu¹⁸.

3.1. Haptoglobin

Haptoglobin má kapacitu vázat hemoglobin a je vylučován z jater do plasmy^{47,48}. Po degradaci erytrocytů váže volný hemoglobin předtím, než se dostane do ledvin, a tak je chrání před poškozením a zabraňuje ztrátě železa⁴⁹. Jeho syntéza je indukována prozánětlivými cytokiny, jako jsou IL-6, IL-1 a TNF faktor (tumour necrosis factor)⁴⁷. Tento protein akutní fáze má také bakteriostatické vlastnosti, inhibuje syntézu prostaglandinu, vývoj krevních a lymfatických tkání⁵⁰ a chrání před volnými radikály⁵¹.

Lidský haptoglobin je tetramer, skládá se ze dvou α a dvou β řetězců⁵². β řetězec obsahuje čtyři místa pro *N*-glykosylaci, všechna mohou být obsazena^{52,53}. Přibližně 19 % haptoglobinu β je glykosylováno⁵³. Haptoglobin obsahuje neutrální komplexní sacharidy se dvěma anténami, s jednou nebo dvěma sialovými kyselinami a komplexní sacharidy s třemi anténami a s dvěma nebo třemi sialovými kyselinami⁵⁴.

Sacharidové složení haptoglobinu se mění v průběhu onemocnění. Expresní hladina haptoglobinu β je v případě rakoviny vaječníku zvýšená, klesá v průběhu chemoterapie a odpovídá koncentraci CA125 (cit.⁵). Zvýšený obsah fukosy, sialylových kyselin a větvení byl popsán u rakoviny prsu⁵⁵, vaječníku^{18,56,57}, plic⁵⁸, pankreatu⁵⁹, a prostaty⁶⁰. Obsah fukosy roste s velikostí nádoru⁵⁶. Vysoký obsah sialových kyselin na haptoglobinu byl nalezen v případě Crohnovy nemoci⁵⁵.

3.2. α 1-Kyselý glykoprotein

α 1-Kyselý glykoprotein je protein akutní fáze, který je syntetizován hlavně v hepatocytech, ale byla publikována i jeho syntéza mimo tyto buňky⁶¹. Koncentrace α 1-kyselého glykoproteinu stoupá dvakrát až pětkrát při odpovědi na akutní zánět. Syntéza proteinu a glykosylace α 1-kyselého glykoproteinu jsou nezávisle regulovány^{62,63} jak cytokiny (hlavně IL-1 a IL-6), tak i glukokortikoidy⁶⁴⁻⁶⁷. α 1-Kyselý glykoprotein moduluje imunitní a zánětlivou odpověď⁶⁸, stimuluje vylučování cytokinů a tak přispívá k zánětlivé odpovědi. Tento efekt může být umocněn místní produkcí α 1-kyselého glykoproteinu monocyty jako odpověď na některé tyto cytokiny⁶⁹. α 1-Kyselý glykoprotein má prospěšný efekt na hojení ran, chrání proti poškození tkání a účastní se indukce nespecifické rezistence proti infekci⁶⁹.

α 1-Kyselý glykoprotein je glykosylovaný ze 45 % (cit.⁷⁰), u lidského proteinu je navázáno pět *N*-vázaných sacharidů⁷¹. Každé z *N*-glykosylovaných míst na α 1-kyselém glykoproteinu může exprimovat sacharidy, které mohou mít dvě, tři nebo čtyři antény⁶¹. α 1-Kyselý glykoprotein je negativně nabitý (*pI* je 2,7–3,2) díky přítomnosti sialových kyselin (12 % z celkového sacharidového složení)⁶⁹.

Při zánětu se mění jeho glykosylace, např. zvýšením obsahu SLe^x. Při akutním zánětu relativně roste hladina α 1-kyselého glykoproteinu, který obsahuje sacharidy se dvěma anténami, obsah těchto sacharidů však relativně klesá během chronického zánětu, při těhotenství, podávání estrogenu nebo poškození jater^{19,72}. Změny v glykosylacích mohou ovlivnit biologické vlastnosti α 1-kyselého glykoproteinu⁶¹. α 1-Kyselý glykoprotein, který obsahuje větvené sacharidy, je efektivnější v inhibici rozšiřování lymfocytů⁷³ a desialovaný α 1-kyselý glykoprotein snižuje hromadění krevních destiček⁷⁴. Nárůst SLe^x na sacharidech z α 1-kyselého glykoproteinu indukovaný zánětem reprezentuje mechanismus pro zpětnou inhibici pronikání granulocytů do zanícených tkání⁶¹.

3.3. α 1-Antichymotrypsin

Lidský α 1-antichymotrypsin je protein akutní fáze vylučovaný játry do plasmy, patří do serpinů⁷⁵ a obsahuje 24 % sacharidů⁷⁶. Jeho koncentrace se zvyšuje víc jak čtyřikrát během několika hodin jako odpověď na zánětlivý podnět⁷⁷ a jeho koncentrace je také zvýšená při rakovině⁷⁸. α 1-Antichymotrypsin inhibuje chymotrypsinu podobné proteasy⁷⁹, reguluje aktivitu katepsinu G (cit.⁸⁰), moduluje buněčné funkce neutrofilů⁸¹ a lymfocytů⁸² a inhibuje syntézu faktoru pro aktivaci krevních destiček⁸³.

α 1-Antichymotrypsin má šest potenciálních *N*-glykosylačních míst, na kterých byly identifikovány sacharidy se dvěma sialovými kyselinami a dvěma anténami, se třemi sialovými kyselinami a třemi anténami, se třemi a čtyřmi anténami⁸⁴. Koncentrace SLe^x na α 1-antichymotrypsinu je zvýšená u pacientek s rakovinou vaječníku¹⁸.

3.4. Zvýšená koncentrace pozitivních proteinů akutní fáze v plasmě

Zvýšené množství SLe^x bylo pozorováno na β -řetězci haptoglobinu, α 1-kyselém glykoproteinu a α 1-antichymotrypsinu¹⁸. SLe^x je také exprimován během zánětu na všech těchto glykoproteinech³³. Koncová sialová kyselina a fukosa na SLe^x glykoproteínů inhibuje množství volné galaktosy přístupné pro sialoglykoprotein a receptory na Kupfferových buňkách⁸⁵ v játrech a tím může prodloužit dobu odstranění těchto glykoproteinů z oběhu, výsledkem je pak jejich zvýšená koncentrace v plasmě⁸⁶. Přítomnost SLe^x na sacharidech z β -řetězce haptoglobinu, α 1-kyselém glykoproteinu a α 1-antichymotrypsinu při rakovině a také při zánětu naznačuje, že koncentrace těchto proteinů akut-

ní fáze je regulována. Biologický význam zvýšených koncentrací spočívá ve zvýšení jejich vlastností působit proti apoptóze⁸⁷ a zánětu⁸⁸. Tyto vlastnosti působit proti apoptóze možná napomáhají rakovině k metastázám. Glykosylace těchto sérových proteinů pochází z glykosylačního procesu během jejich biosyntézy v jaterních parenchymálních buňkách. V regulaci těchto změn jsou zapojeny cytokiny podporující zánět, kortikosteroidy a růstové faktory⁸⁹.

4. Glykosylace molekul imunitního systému

Skoro všechny klíčové molekuly zahrnuté ve vrozené a adaptivní imunitní odpovědi jsou glykoproteiny. V humorálním imunitním systému jsou glykosylovány všechny imunoglobuliny a většina komponent komplementu⁹⁰.

Imunoglobuliny jsou glykoproteiny a hlavní sekreční produkty adaptivního imunitního systému^{91,92}. Poskytují dlouhodobou obranyschopnost proti cizím antigenům⁹¹. V lidském organismu se nachází pět tříd imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgE a IgD; mají podobnou strukturu a skládají se z imunoglobulinových domén⁹³. Imunoglobuliny se liší v lokalizaci a počtu míst pro *N*-vázané glykoproteiny, které se nachází na Fc a Fab regionu a sacharidy připojené k imunoglobulinům jsou veliké přibližně 2 kDa (cit.⁹¹).

4.1. Snížený obsah galaktosy a sialových kyselin na IgG má vliv na jeho funkci

Lidský sérový imunoglobulin G se skládá ze čtyř podtříd, které se liší v jejich sekvencích v γ -řetězci a v disulfidových můstcích. Nejběžnější sérový imunoglobulin je IgG₁, který cirkuluje v krvi v koncentraci 10 až 15 mg ml⁻¹ (cit.⁹¹). Všechny IgG molekuly obsahují dvě *N*-glykosylační místa, která mohou být různě glykosylována⁹¹. Sacharidy napomáhají udržet kvartérní strukturu a stabilitu Fc regionu^{94,95}. Abnormální glykosylace na imunoglobulinech je spojena s nemocí a patogenezi, např. zvýšený výskyt forem IgG bez galaktosy při revmatickém zánětu⁹¹.

V séru pacientek s rakovinou vaječníku je výrazně snížena koncentrace galaktosy a sialových kyselin na IgG (cit.¹⁸). Zvýšený výskyt sacharidů bez galaktosy na IgG je způsoben sníženou aktivitou galaktosyltransferasy v buňkách produkujících IgG (cit.⁹⁶) nebo zvýšenou produkcí specifických podskupin těchto buněk s nízkou expresní hladinou galaktosyltransferasy⁹⁷. Různé sacharidy na IgG mohou ovlivňovat jeho afinitu pro ligandy^{94,98-101}. Při revmatickém zánětu je zvýšená koncentrace formy IgG obsahující sacharidy bez galaktosy (IgG-G0) v séru¹⁰². Pokud je koncový GlcNAc sacharidu na Fc regionu tohoto typu IgG seskupen na cílových buňkách, tak může být poznán lektinem vázajícím mannosu (MBL) a výsledkem je aktivace komplementu⁹⁹. Kaneko a spol.⁹⁸ dokázal, že přítomnost sialových kyselin na IgG redukuje jeho cytotoxicitu k buňkám typu přirozených zabijáčů (natural killer cells), projevující protizánětlivý efekt. Snížený obsah ga-

laktosy a sialových kyselin na IgG u pacientek s rakovinou vaječníku tak může zvýšit jeho cytotoxicitu a aktivaci komplementu přes MBL. Zvýšený výskyt forem IgG bez galaktosy byl prokázán v souvislosti s vývojem nádoru a metastáz u rakoviny žaludku a plic¹⁰³, ale také při chronických zánětlivých onemocněních jako jsou např. revmatický zánět, tuberkulóza nebo záněty střeva^{96,102} a cév¹⁰⁴. Pokles v množství sialových kyselin vázaných na sacharidech IgG byl nalezen také při revmatickém zánětu¹⁰⁵. Nárůst v počtu sacharidů bez galaktosy na IgG v séru pacientek s rakovinou vaječníku tak může indikovat zánět.

5. Funkce imunitní odpovědi

Lidský imunitní systém rozpozná rakovinu jako zánětlivý proces a podle toho reaguje. Produkuje proteiny akutní fáze, které také působí proti apoptóze. Při zánětu toto pomáhá obnovit poškozenou tkáň, ale rakovinu to chrání a podporuje rakovinné bujení, neboť rakovinné buňky považuje za své poškozené buňky. Pokud je toto tvrzení správné, tak léky proti zánětu by měly mít silný účinek v léčbě rakoviny. A opravdu, nesteroidní léky proti zánětu (NSAID) mají pozitivní efekt jak na prevenci¹⁰⁶, tak i ochranu při vývoji a rozšíření rakoviny¹⁰⁷.

6. Závěr

Změny v glykosylaci hrají důležitou roli při rakovině vaječníku, poskytují jak biomarkery, tak náhled do patogeneze rakoviny. Změny v hladinách glykosyltransferas a/ nebo nukleotidových donorů vedou k modifikaci jak *N*-tak *O*-vázaných sacharidů. Nejvýraznější změny na sérových glykoproteinech pacientek s rakovinou vaječníku jsou zvýšený obsah SLe^x a sacharidu se dvěma anténami bez galaktosy. Zvýšený obsah SLe^x byl nalezen na β-řetězci haptoglobinu, α1-kyselém glykoproteinu a α1-antichymotrypsinu. Koncentrace těchto pozitivních proteinů akutní fáze je zvýšená při akutní zánětlivé odpovědi a může být ovlivněna změnou v glykosylacích. Pokles obsahu galaktosy a sialových kyselin na IgG moduluje jeho funkci. Tyto fakta naznačují, že rakovina reguluje určité dráhy rekrutující proteiny, které podporují buněčný růst a metastáze tím, že napodobuje zánět. Proto nádory, co přežijí imunitní odpověď hostitele, jsou ty, co udělaly změny přispívající k jejich šanci na přežití.

Seznam zkratk

CA125	cancer antigen 125 (rakovinný antigen)
GlcNAc-TV	<i>N</i> -acetylglukosaminyltransferasa V
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
NP HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s normální fází
WAX HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie se slabou výměnou aniontů

IL	interleukin
Le ^a	Lewis a
MBL	lektin vázající mannosu
NSAID	nesteroidní léky proti zánětu
PSA	polysialová kyselina
SLe ^x	sialyl Lewis x
TNF faktor	tumour necrosis factor

LITERATURA

1. <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/mortality/cancerdeaths/>, Cancer Research UK, staženo 25.4. 2007.
2. Duffy M. J., Bonfrer J. M., Kulpa J., Rustin G. J., Soletormos G., Torre G. C., Tuxen M. K., Zwirner M.: *Int. J. Gynecol. Cancer* 15, 679 (2005).
3. Piver M. S., Baker T. R., Piedmonte M., Sandecki A. M.: *Semin. Oncol.* 18, 177 (1991).
4. Ness R. B., Cottreau C.: *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1459 (1999).
5. Liede A., Karlan B. Y., Baldwin R. L., Platt L. D., Kuperstein G., Narod S. A.: *J. Clin. Oncol.* 20, 1570 (2002).
6. Rodriguez C., Patel A. V., Calle E. E., Jacob E. J., Thun M. J.: *Jama* 285, 1460 (2001).
7. Bast R. C., Jr., Badgwell D., Lu Z., Marquez R., Rosen D., Liu J., Baggerly K. A., Atkinson E. N., Skates S., Zhang Z., Lokshin A., Menon U., Jacobs I., Lu K.: *Int. J. Gynecol. Cancer* 15, 274 (2005).
8. Ahmed N., Oliva K. T., Barker G., Hoffmann P., Reeve S., Smith I. A., Quinn M. A., Rice G. E.: *Proteomics* 5, 4625 (2005).
9. Kozak K. R., Su F., Whitelegge J. P., Faull K., Reddy S., Farias-Eisner R.: *Proteomics* 5, 4589 (2005).
10. Ye B., Skates S., Mok S. C., Horick N. K., Rosenberg H. F., Vitonis A., Edwards D., Sluss P., Han W. K., Berkowitz R. S., Cramer D. W.: *Clin. Cancer Res.* 12, 432 (2006).
11. Bengtsson S., Krogh M., Szogyarto C. A., Uhlen M., Schedvins K., Silfversward C., Linder S., Auer G., Alaiya A., James P.: *J. Proteome Res.* 6, 1440 (2007).
12. Turner G. A., Goodarzi M. T., Thompson S.: *Glycoconj. J.* 12, 211 (1995).
13. Kanikowska D., Madry R., Drozd-Gorska J., Sobieska M., Markowska J., Wiktorowicz K.: *Ginekol. Pol.* 72, 17 (2001).
14. Gercel-Taylor C., Bazzett L. B., Taylor D. D.: *Gynecol. Oncol.* 81, 71 (2001).
15. Dube D. H., Bertozzi C. R.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 477 (2005).
16. Dennis J. W., Laferte S., Waghorne C., Breitman M. L., Kerbel R. S.: *Science* 236, 582 (1987).
17. Kim Y. J., Varki A.: *Glycoconj. J.* 14, 569 (1997).
18. Saldo R., Royle L., Radcliffe C. M., Abd Hamid U. M., Evans R., Arnold J. N., Banks R. E., Hutson R., Harvey D. J., Antrobus R., Petrescu S. M., Dwek

- R. A., Rudd P. M.: *Glycobiology* 17, 1344 (2007).
19. De Graaf T. W., Van der Stelt M. E., Anbergen M. G., van Dijk W.: *J. Exp. Med.* 177, 657 (1993).
 20. Llorca J., Lopez-Diaz M. J., Gonzalez-Juanatey C., Ollier W. E., Martin J., Gonzalez-Gay M. A.: *Semin. Arthritis Rheum.* 37, 31 (2007).
 21. Sell S.: *Hum. Pathol.* 21, 1003 (1990).
 22. Hakomori S., Zhang Y.: *Chem. Biol.* 4, 97 (1997).
 23. Taylor-Papadimitriou J., Epenetos A. A.: *Trends Biotechnol.* 12, 227 (1994).
 24. Ugorski M., Laskowska A.: *Acta Biochim. Pol.* 49, 303 (2002).
 25. Zhang S., Zhang H. S., Reuter V. E., Slovin S. F., Scher H. I., Livingston P. O.: *Clin. Cancer Res.* 4, 295 (1998).
 26. Magnani J. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 426, 122 (2004).
 27. Tabares G., Radcliffe C. M., Barrabes S., Ramirez M., Aleixandre R. N., Hoesel W., Dwek R. A., Rudd P. M., Peracaula R., de Llorens R.: *Glycobiology* 16, 132 (2006).
 28. Brooks S. A., Dwek M. W., Schumacher U.: *Functional & Molecular Glycobiology*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford 2002.
 29. Tang D. G., Honn K. V.: *Invasion Metastasis* 14, 109 (1994).
 30. McEver R. P.: *Glycoconj. J.* 14, 585 (1997).
 31. Rauvala H.: *J. Biol. Chem.* 251, 7517 (1976).
 32. Wang W. T., Lundgren T., Lindh F., Nilsson B., Gronberg G., Brown J. P., Mentzer-Dibert H., Zopf D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 433 (1992).
 33. Brinkman-van der Linden E. C., de Haan P. F., Havenaar E. C., van Dijk W.: *Glycoconj. J.* 15, 177 (1998).
 34. Fukuda M., Spooncer E., Oates J. E., Dell A., Klock J. C.: *J. Biol. Chem.* 259, 10925 (1984).
 35. Aubert M., Panicot-Dubois L., Crotte C., Sbarra V., Lombardo D., Sadoulet M. O., Mas E.: *Int. J. Cancer* 88, 558 (2000).
 36. Aubert M., Panicot L., Crotte C., Gibier P., Lombardo D., Sadoulet M. O., Mas E.: *Cancer Res.* 60, 1449 (2000).
 37. Yazawa S., Madiyalakan R., Piver M. S., Matta K. L.: *Cancer Lett.* 32, 165 (1986).
 38. Robinson-Smith T. M., Isaacsohn I., Mercer C. A., Zhou M., Van Rooijen N., Husseinzadeh N., McFarland-Mancini M. M., Drew A. F.: *Cancer Res.* 67, 5708 (2007).
 39. Gornik O., Royle L., Harvey D. J., Radcliffe C. M., Saldova R., Dwek R. A., Rudd P., Lauc G.: *Glycobiology* 17, 1321 (2007).
 40. Wang P. H., Lee W. L., Juang C. M., Yang Y. H., Lo W. H., Lai C. R., Hsieh S. L., Yuan C. C.: *Gynecol. Oncol.* 99, 631 (2005).
 41. Huleihel M., Maymon E., Piura B., Prinsloo I., Benharroch D., Yanai-Inbar I., Glezerman M.: *Eur. Cytokine Netw.* 8, 179 (1997).
 42. Nilsson M. B., Langley R. R., Fidler I. J.: *Cancer Res.* 65, 10794 (2005).
 43. Partridge E. A., Le Roy C., Di Guglielmo G. M., Pawling J., Cheung P., Granovsky M., Nabi I. R., Wrana J. L., Dennis J. W.: *Science* 306, 120 (2004).
 44. Ishibashi Y., Inouye Y., Okano T., Taniguchi A.: *Glycoconj. J.* 22, 53 (2005).
 45. Gabay C.: *Arthritis Res. Ther.* 8, S3 (2006).
 46. Gabay C., Kushner I.: *N. Engl. J. Med.* 340, 448 (1999).
 47. Bowman B. H., v knize: *Hepatic Plasma Proteins* (Bowman B. H., ed.), Haptoglobin. Academic Press, San Diego 1993.
 48. Schultze H. E., Heremans J. F. (ed.): *Nature and Metabolism of Extracellular Proteins. Molecular Biology of Human Proteins*. Elsevier, Amsterdam 1966.
 49. Giblett E. R.: *Series Haematologica* 1, 3 (1968).
 50. Langlois M. R., Delanghe J. R.: *Clin. Chem.* 42, 1589 (1996).
 51. Van Vlierberghe H., Langlois M., Delanghe J.: *Clin. Chim. Acta* 345, 35 (2004).
 52. Kurosky A., Barnett D. R., Lee T. H., Touchstone B., Hay R. E., Arnott M. S., Bowman B. H., Fitch W. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 3388 (1980).
 53. Black J. A., Chan G. F., Hew C. L., Dixon G. H.: *Can. J. Biochem.* 48, 123 (1970).
 54. He Z., Aristoteli L. P., Kritharides L., Garner B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 496 (2006).
 55. Goodarzi M. T., Turner G. A.: *Glycoconj. J.* 15, 469 (1998).
 56. Thompson S., Turner G. A.: *Br. J. Cancer* 56, 605 (1987).
 57. Thompson S., Dargan E., Turner G. A.: *Cancer Lett.* 66, 43 (1992).
 58. Hoagland L. F. T., Campa M. J., Gottlin E. B., Herdon J. E., 2nd, Patz E. F., Jr.: *Cancer* 110, 2260 (2007).
 59. Okuyama N., Ide Y., Nakano M., Nakagawa T., Yamanaka K., Moriwaki K., Murata K., Ohgashi H., Yokoyama S., Eguchi H., Ishikawa O., Ito T., Kato M., Kasahara A., Kawano S., Gu J., Taniguchi N., Miyoshi E.: *Int. J. Cancer* 118, 2803 (2006).
 60. Fujimura T., Shinohara Y., Tissot B., Pang P. C., Kuroguchi M., Saito S., Arai Y., Sadilek M., Murayama K., Dell A., Nishimura S., Hakomori S. I.: *Int. J. Cancer* 122, 39 (2008).
 61. Fournier T., Medjoubi N. N., Porquet D.: *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 157 (2000).
 62. van Dijk W., Havenaar E. C., Brinkman-van der Linden E. C.: *Glycoconj. J.* 12, 227 (1995).
 63. van Dijk W., Turner G. A., Mackiewicz A.: *Glycosyl. Dis.* 1, 5 (1994).
 64. Mackiewicz A., Ganapathi M. K., Schultz D., Kushner I.: *J. Exp. Med.* 166, 253 (1987).
 65. Mackiewicz A., Kushner I.: *Scand. J. Immunol.* 29, 265 (1989).
 66. Mackiewicz A., Laciak M., Gorny A., Baumann H.:

- Eur. J. Cell Biol. 60, 331 (1993).
67. Azuma Y., Murata M., Matsumoto K.: Clin. Chim. Acta 294, 93 (2000).
 68. Logdberg L., Wester L.: Biochim. Biophys. Acta 1482, 284 (2000).
 69. Hocheppied T., Berger F. G., Baumann H., Libert C.: Cytokine Growth Factor Rev. 14, 25 (2003).
 70. Schmid K., Nimerg R. B., Kimura A., Yamaguchi H., Binette J. P.: Biochim. Biophys. Acta. 492, 291 (1977).
 71. Yoshima H., Matsumoto A., Mizuochi T., Kawasaki T., Kobata A.: J. Biol. Chem. 256, 8476 (1981).
 72. Mackiewicz A., Mackiewicz K.: Glycoconj. J. 12, 241 (1995).
 73. Pos O., Oostendorp R. A., van der Stelt M. E., Schepers R. J., Van Dijk W.: Inflammation 14, 133 (1990).
 74. Costello M., Fiedel B. A., Gewurz H.: Nature 281, 677 (1979).
 75. Travis J., Salvesen G. S.: Annu. Rev. Biochem. 52, 655 (1983).
 76. Laine A., Hayem A.: Biochim. Biophys. Acta 668, 429 (1981).
 77. Arosen K. F., Ekelund G., Kindmark C. O., Laurell C. B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 124, 127 (1972).
 78. Karseladze A. I., Rytin I. E., Matveev V. B.: Arkh. Patol. 67, 30 (2005).
 79. Travis J., Bowen J., Baugh R.: Biochemistry 17, 5651 (1978).
 80. Beatty K., Bieth J., Travis J.: J. Biol. Chem. 255, 3931 (1980).
 81. Kilpatrick L., Johnson J. L., Nickbarg E. B., Wang Z. M., Clifford T. F., Banach M., Cooperman B. S., Douglas S. D., Rubin H.: J. Immunol. 146, 2388 (1991).
 82. Hudig D., Haverty T., Fulcher C., Redelman D., Mendelsohn J.: J. Immunol. 126, 1569 (1981).
 83. Camussi G., Tetta C., Bussolino F., Baglioni C.: J. Exp. Med. 168, 1293 (1988).
 84. Laine A., Hachulla E., Strecker G., Michalski J. C., Wieruszkeski J. M.: Eur. J. Biochem. 197, 209 (1991).
 85. Coombs P. J., Taylor M. E., Drickamer K.: Glycobiology 16, 1C (2006).
 86. Stockert R. J.: Physiol. Rev. 75, 591 (1995).
 87. Daemen M. A., Heemskerk V. H., van't Veer C., Denecker G., Wolfs T. G., Vandenameele P., Buurman W. A.: Circulation 102, 1420 (2000).
 88. Emoto T., Nakamura K., Nagasaka Y., Numa F., Suminami Y., Kato H.: Apoptosis 3, 155 (1998).
 89. Van Dijk W., Mackiewicz A.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 762, 319 (1995).
 90. Rudd P. M., Elliott T., Cresswell P., Wilson I. A., Dwek R. A.: Science 291, 2370 (2001).
 91. Arnold J. N., Wormald M. R., Sim R. B., Rudd P. M., Dwek R. A.: Annu. Rev. Immunol. 25, 21 (2007).
 92. Litman G. W., Anderson M. K., Rast J. P.: Annu. Rev. Immunol. 17, 109 (1999).
 93. Amzel L. M., Poljak R. J.: Annu. Rev. Biochem. 48, 961 (1979).
 94. Mimura Y., Church S., Ghirlando R., Ashton P. R., Dong S., Goodall M., Lund J., Jefferis R.: Mol. Immunol. 37, 697 (2000).
 95. Mimura Y., Sondermann P., Ghirlando R., Lund J., Young S. P., Goodall M., Jefferis R.: J. Biol. Chem. 276, 45539 (2001).
 96. Axford J. S., Sumar N., Alavi A., Isenberg D. A., Young A., Bodman K. B., Roitt I. M.: J. Clin. Invest. 89, 1021 (1992).
 97. Omtvedt L. A., Royle L., Husby G., Sletten K., Radcliffe C. M., Harvey D. J., Dwek R. A., Rudd P. M.: Arthritis Rheum. 54, 3433 (2006).
 98. Kaneko Y., Nimmerjahn F., Ravetch J. V.: Science 313, 670 (2006).
 99. Malhotra R., Wormald M. R., Rudd P. M., Fischer P. B., Dwek R. A., Sim R. B.: Nat. Med. 1, 237 (1995).
 100. Shields R. L., Lai J., Keck R., O'Connell L. Y., Hong K., Meng Y. G., Weikert S. H., Presta L. G.: J. Biol. Chem. 277, 26733 (2002).
 101. Umana P., Jean-Mairet J., Moudry R., Amstutz H., Bailey J. E.: Nat. Biotechnol. 17, 176 (1999).
 102. Parekh R. B., Dwek R. A., Sutton B. J., Fernandes D. L., Leung A., Stanworth D., Rademacher T. W., Mizuochi T., Taniguchi T., Matsuta K., Takeuchi F., Nagano Y., Miyamoto T., Kobata A.: Nature 316, 452 (1985).
 103. Kanoh Y., Mashiko T., Danbara M., Takayama Y., Ohtani S., Imasaki T., Abe T., Akahoshi T.: Oncology 66, 365 (2004).
 104. Holland M., Takada K., Okumoto T., Takahashi N., Kato K., Adu D., Ben-Smith A., Harper L., Savage C. O., Jefferis R.: Clin. Exp. Immunol. 129, 183 (2002).
 105. Matsumoto A., Shikata K., Takeuchi F., Kojima N., Mizuochi T.: J. Biochem. (Tokyo) 128, 621 (2000).
 106. Zhang Y., Coogan P. F., Palmer J. R., Strom B. L., Rosenberg L.: Am. J. Epidemiol. 162, 165 (2005).
 107. Smyth S. S., Patterson C.: J. Cell. Biol. 158, 17 (2002).

R. Šaldová^a, P. M. Rudd^a, and J. Káš^b (^aDublin-Oxford Glycobiology Laboratory, National Institute for Bioprocessing Research and Training, University College Dublin, Ireland; ^bInstitute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic): **Glycosylation Changes of Serum Glycoproteins in Ovarian Cancer May Contribute to Disease Pathogenesis**

Ovarian cancer is the most lethal of all gynecological cancers. Although serum biomarker CA125 is routinely used, there is a need for sensitive and specific complementary biomarkers. N-glycosylation changes in ovarian can-

cer serum glycoproteins include a decrease in galactosylation of IgG and an increase in sialyl Lewis X (SLe^x) on haptoglobin β -chain, α 1-acid glycoprotein and α 1-antichymotrypsin. These changes are also present in chronic inflammations but not in malignant melanoma with low levels of inflammation. Acute phase proteins carrying increased amounts of SLe^x have an increased half-life. Sialylation of acute phase proteins decreases

apoptosis favouring survival of cancer cells. Cancer cells produce inflammatory cytokines which influence glycosylation in liver parenchymal cells. The decreased galactosylation and sialylation of IgG increases cytotoxicity of natural killer cells and complement activation via mannose-binding lectin. Altered glycosylation of acute phase proteins and IgG suggests that cancer regulates certain pathways favouring survival of cancer cells.



Česká společnost chemická
Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha

Pořádají ve dnech 11 až 13. listopadu 2009 mezinárodní konferenci

Polysacharidy V.

Místo konání: Novotného lávka 5, Praha 1, Česká republika

Okruhy:

Produkce polysacharidů a jejich derivátů.

Charakterizace a analýza polysacharidů z přírodních zdrojů.

Fyziologické účinky polysacharidů.

Biodegradabilní plasty na bázi polysacharidů.

Plenární přednášky:

Werner Praznik, Renate Loeppert a Anton Huber (Institut of Chemistry, KF-University, Graz, Austria)
Molecular dimension and structure of water soluble polysaccharides by means of adequate chromatographic techniques with different detection systems.

Gianfranco Venora (Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, Italy) Seeds identification by means of image analysis and linear discriminant analysis: case studies.

Václav Větvíčka (University of Louisville, Department of Pathology, Louisville, Kentucky, USA)
Glucan - magic bullet or big con?

Jazyk: anglický a český

Termín podání abstrakt: 30.6.2009

Termín podání přihlášek: 15.9.2009

Další informace: <http://www.polysaccharides.csch.cz/index.html>

POLYFENOLY JABĽK

MIROSLAV ONDREJOVIČ^{a,b}, TIBOR MALIAR^{a,b}, ĽUDOVÍT POLÍVKA^a
a STANISLAV ŠILHÁR^b

^a Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, J. Herdu 2, 917 01 Trnava,

^b Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Biocentrum, Kostolná 5, 900 01 Modra, Slovensko

ondrejovic@vup.sk

Došlo 17.5.07, prepracované 21.2.08, prijaté 25.2.08.

Kľúčové slová: polyfenoly, jablká, izolácia

Obsah

1. Úvod
2. Polyfenoly jabĺk
 - 2.1. Fenolové kyseliny
 - 2.2. Flavonoidy
3. Metódy izolácie polyfenolov
 - 3.1. Úprava vstupnej suroviny
 - 3.2. Voľba extrakčnej metódy
4. Záver

1. Úvod

Jablká sa zaraďujú do čeľade *Rosaceae* (ružovité), podčeľade *Pomoideae* (jabloňové) a tvoria samostatný rod *Malus* s väčším počtom druhov. Pôvod dnešných kultivarov patrí botanicky do druhu *Malus domestica* Borkh. – jablň domáca¹. Už od nepamäti je jablko súčasťou ľudskej stravy. I keď jablone patria medzi ovocné stromy pestované hlavne v miernom podnebnom pásme a iba výnimočne sa vyskytujú v chladnejších oblastiach, konzumujú sa takmer na celom svete a to tak v natívnom stave ako aj vo forme rôznych jablčných výrobkov (šťavy, mušty, destiláty, džem, ocot).

Z mnohých epidemiologických štúdií vyplýva, že konzumácia ovocia a teda aj jabĺk pomáha pri znižovaní rizika vzniku širokej palety chronických ochorení, akými sú napríklad rakovina, kardiovaskulárne ochorenia, astma a cukrovka^{2,3}. Konzumácia jabĺk sa tiež spája so znižovaním hmotnosti, zlepšením funkcie pľúc⁴ a celkového zdravotného stavu konzumentov⁵.

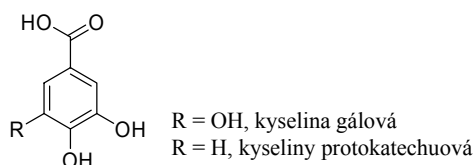
Hlavnými zložkami jabĺk, ktoré sú v literatúre charakterizované ako biologicky významné sekundárne metabolity zodpovedné za pozitívne účinky na ľudské zdravie, sú polyfenolové látky. Tak ako ostatné sekundárne metabolity

rastlín sú i polyfenoly produkované počas bežného vývoja a v odozve na stresové podmienky (infekcia, poranenie, UV žiarenie, zvýšená salinita pôdy a prítomnosť ťažkých kovov v prostredí). Ich biosyntetické dráhy vychádzajú z fenylalanínu a tyrozinu.

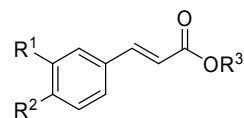
Polyfenoly sú v rastlinách na úrovni pletív, celulárnych a subcelulárnych jednotiek nerovnomerne rozmiestnené. Zatiaľ čo nerozpustné polyfenoly (prevažne ligníny) sú súčasťami bunkových stien a tvoria mechanickú oporu rastlinnej hmoty⁶, rozpustné fenolové látky sú začlenené vo vakuolách a špeciálnych plastidoch^{7,8}. V rastlinách tieto látky pôsobia ako ochrana voči UV žiareniu ale tiež ako fytoalexíny, antifeedanty, atraktanty pre opel'ovačov, pigmenty a antioxidanty.

2. Polyfenoly jabĺk

Polyfenolové látky jabĺk možno funkčne rozdeliť do dvoch veľkých skupín, a to skupina fenolových kyselín zahŕňajúca deriváty kyseliny benzoovej (kyselina galová a protokatechuová, obr. 1) a deriváty kyseliny škoricovej (kyselina kumárová, kávová, ferulová, chlorogénová, kumaroylchinónová, obr. 2), a skupina flavonoidov pozostávajúca z flavanolov (kvercetín, izoramnetín a ich glykozidy), flavan-3-olov (katechín, epikatechín, prokyanidíny), dihydrochalkónov (floreťín a jeho glykozidy) a antokyanínov (kyanidín a jeho glykozidy)^{2,9}.



Obr. 1. Deriváty kyseliny benzoovej vyskytujúce sa v jablkách



R¹ = H, R² = OH, R³ = H, k. kumárová
 R¹ = OH, R² = OH, R³ = H, k. kávová
 R¹ = OH, R² = OCH₃, R³ = H, k. ferulová
 R¹ = OH, R² = OH, R³ = k. chinónová, k. chlorogénová
 R¹ = H, R² = OH, R³ = kyselina chinónová, k. kumaroylchinónová

Obr. 2. Deriváty kyseliny škoricovej nachádzajúce sa v jablkách

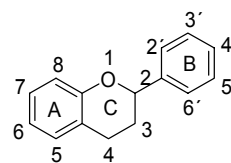
2.1. Fenolové kyseliny

Skupina fenolových kyselín sa delí na základe ich chemickej štruktúry na deriváty kyseliny benzoovej a deriváty kyseliny škoricovej. Deriváty kyseliny benzoovej sa v rastlinách vyskytujú len veľmi zriedkavo. Výnimkou je ovocie a niektoré druhy zeleniny (čierna reďkovka, cibuľa). V týchto komoditách dosahuje koncentrácia derivátov kyseliny benzoovej až niekoľko desiatok miligramov na kilogram natívnej rastlinnej hmoty¹⁰. V prírode sú prítomné prevažne viazané so sacharidmi alebo organickými kyselinami. V jablkách sa nachádzajú hlavne dva deriváty kyseliny benzoovej, a to kyselina protocatechuová a kyselina galová vyskytujúca sa vo forme hydrolyzovateľných tanínov (galotaníny a elagitaníny). Biologické vlastnosti týchto látok nie sú síce doposiaľ dostatočne preskúmané¹⁰, no napriek tomu už boli publikované antioxidantné¹¹, protizápalové účinky galotanínu inhibíciou expresie chymikínov a cytokínov na molekulovej i molekulárno-biologickej úrovni^{12,13}, antikancerogénne¹⁴ a hypolipidemické účinky inhibíciou skvalénovej dráhy v mieste syntézy farnezylu¹⁵.

Deriváty kyseliny škoricovej sa častejšie vyskytujú ako deriváty kyseliny benzoovej. V natívnom rastlinnom materiáli sa len výnimočne nachádzajú vo voľnej forme, zväčša sú naviazané na sacharidovú časť alebo esterovo viazané s kyselinou chinovou, šikimovou a tartarovou. Ich uvoľnenie zo spomínaných foriem nastáva počas mrazenia, sterilizácie alebo fermentácie daného rastlinného materiálu. Jablká spolu s čučoriedkami, slivkami a čerešňami patria medzi ovocie s najvyššími koncentraciami derivátov kyseliny škoricovej, medzi ktoré zaraďujeme hlavne kyselinu kumárovú, ferulovú, kumaroylchinónovú, kávovú a kyselinu chlorogénovú, ktorej koncentrácia v jablkách sa pohybuje v rozsahu 0,5–2 g kg⁻¹ natívnej hmoty¹⁰. Z biologických účinkov derivátom kyseliny škoricovej je asi najznámejšia protinádorová aktivita¹⁶. Okrem nej je známy tiež imunosupresívny účinok¹⁷, inhibičná aktivita voči skupine enzýmov trypsínovej rodiny (príkladom môže byť trypsín spôsobujúci pankreatitídu), trombínu, plazmínu, hemokoagulačných faktorov (pri poruchách koagulácie a fibrinolýzy), faktorom komplementu (pri autoimunitných ochoreniach) a dokonca voči niektorým derivátom schopným zasahovať do hormonálnych procesov prostredníctvom interakcie s príslušnými receptormi¹⁸.

2.2. Flavonoidy

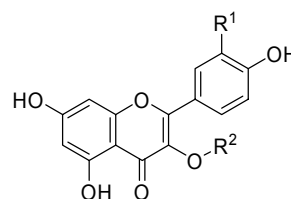
V súčasnosti je známych viac ako 6400 rôznych flavonoidov vyskytujúcich sa v rastlinnej ríši¹⁹. Ich základnú štruktúru tvorí flavánové jadro alebo 2-fenyl-benzo- γ -pyrán (obr. 3). Táto štruktúra je charakteristická pre 3-deoxyflavonoidy (flavóny, flavanóny, izoflavóny a neoflavóny) a 3-hydroxyflavonoidy (flavonoly, antokyaníny, flavan-3,4-dioly a flavan-3-oly). Flavonoidy sa najčastejšie vyskytujú vo forme glykozidov, nakoľko táto forma im umožňuje vyššiu rozpustnosť v bežných fyziologických podmienkach rastlinnej bunky²⁰ a zároveň znižuje ich reak-



Obr. 3. Základná štruktúra flavonoidov – flavánové jadro

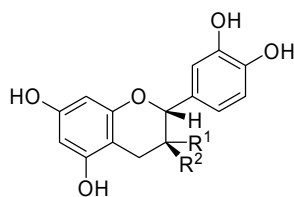
tivitu a zabezpečuje lepšiu stabilitu¹⁹. Navyiac, ako uvádzajú Van Buren a spol.²¹, glykozidy flavonoidov nie sú substrátom pre polyfenoloxidázu a teda nepodliehajú tzv. enzýmovému hnednutiu, nakoľko bolo zistené, že cukorná zložka naviazaná na flavonoidový skelet stéricky prekáža tomuto enzýmu. Glykozidovou časťou flavonoidov býva obvykle glukóza, galaktóza, ramnóza, xylóza a arabinóza¹⁹.

Flavonoly sú prítomné približne v 80 % vyšších rastlín. Keďže ich biosyntéza je stimulovaná svetlom, nachádzajú sa vo vonkajších obalových pletivách. Sfarbenie flavonolov (vrátane glykozidov) sa pohybuje od slonovinej až po žltú²². V jablkách sú flavonoly zastúpené hlavne kvercetínom a izoramnetínom (3'-O-metyl derivát kvercetínu) (obr. 4). V ovoci sa často ten istý flavonol vyskytuje viazaný na rôzne sacharidy a často vytvára paletu 5 až 10 rôznych glykozidov¹⁰. Vhodným príkladom tohto tvrdenia sú i jablká, Alonso-Salces a spol.⁹ zistili, že vzorka testovaných jabĺk obsahovala šesť rôznych glykozidov kvercetínu a šesť rôznych glykozidov izoramnetínu. Kvercetín a izoramnetín vykazujú antioxidantnú, protirakovinovú, protizápalovú²³ a antimikrobiálnu aktivitu dokázanú *in vitro* ako aj *in vivo*. Okrem toho je známa ich inhibičná aktivita voči špecifickým enzýmom: cyklooxygenázy-1 (COX-1), cyklooxygenázy-2 (COX-2)²⁴, aromatázy, adenylát cyklázy, topoizomerázy, NO syntetázy (NOS-II), proteín kinázy a kalmolulínu, ktoré sú označované ako efekторы zápalových a nádorových ochorení^{25,26}. Okrem



- R¹ = OH, R² = H, kvercetín
- R¹ = OH, R² = galaktóza, kvercetín-3-O-galaktózid
- R¹ = OH, R² = glukóza, kvercetín-3-O-glukozid
- R¹ = OH, R² = ramnóza, kvercetín-3-O-ramnozid
- R¹ = OCH₃, R² = H, izoramnetín
- R¹ = OCH₃, R² = glukóza, izoramnetín-3-O-glukozid
- R¹ = OCH₃, R² = ramnoglukóza, izoramnetín-3-O-ramnoglukozid

Obr. 4. Flavonoly vyskytujúce sa v jablku



R¹ = H, R² = OH, katechín
R¹ = OH, R² = H, epikatechín

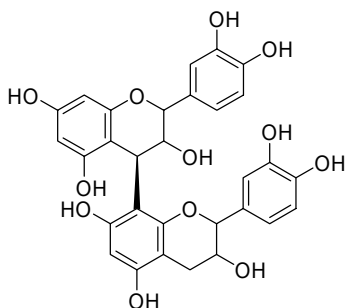
Obr. 5. Flavan-3-oly nachádzajúce sa v jablkách

toho vykazujú i inhibičnú účinnosť voči HIV integrázy, reverznej transkriptázy, HIV proteinázy²⁷.

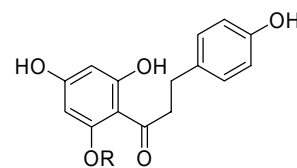
Kvercetin pôsobí tiež ako inhibitor oxidácie LDL (low density lipoprotein) *in vitro*, pri imunologických odpovediach rôzneho typu a spolu s ostatnými flavonoidmi je účinný proti širokému spektru civilizačných ochorení²⁵. Interakcie kvercetinu s DNA sa predpokladajú prostredníctvom hydrofóbnej časti jeho molekuly²⁸.

Flavan-3-oly sa vyskytujú vo voľnej (catechíny) alebo polymerénej forme (proantokyandíny) (obr. 5). Výrazným znakom tejto skupiny flavonoidov je to, že netvoria glykozidy. Katechíny sa nachádzajú v rôznych druhoch ovocia¹⁰. V jablkách sa ich koncentrácia pohybuje od 2,6 do 9,6 mg g⁻¹ sušiny²⁹. Vyskytujú sa tu prevažne epiméry katechín a epikatechín. Ich funkcia je pravdepodobne nasmerovaná na ochranu rastliny, pretože, ako uvádzajú Bais a spol.³⁰, katechín i epikatechín vykazujú antioxidantnú^{31–33}, antibakteriálnu a antivírusovú aktivitu^{34,35}. Vo farmaceutickom výskume bola zistená ich antialergická³⁶, protinádorová^{37,38}, hepato- a gastroprotektívna^{36,39} a anti-koagulačná aktivita⁴⁰. V kontraste s glykozylovanými flavonolmi sú flavan-3-oly veľmi dobrým substrátom pre polyfenoloxidázu.

Prokyandíny (taníny) predstavujú dimérne, oligomérne a polymérne štruktúry katechínových jednotiek spájaných C4 a C8 (prípadne C6) väzbami¹⁰ (obr. 6). Známa je tvorba esterov s kyselinou galovou⁴¹. V jablčnom mušte sa stupeň polymerizácie týchto látok pohybuje od 4 do 11



Obr. 6. Prokyandín B2 – predstaviteľ dimérnych katechínových štruktúr spojených C4–C8 väzbou



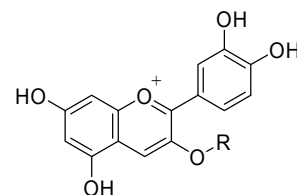
R = H, floretín
R = glukóza, floridzín
R = xyloglukóza, floretín-2'-O-xyloglukozid

Obr. 7. Dihydrochalkóny vyskytujúce sa v jablkách

jednotiek. Taníny vďaka schopnosti tvoriť komplexné zlúčeniny s proteínmi nachádzajúcimi sa v slinách sú zodpovedné za horkastú chuť jabĺk a jablčných štiav^{10,42}. Vyzkazujú predovšetkým antioxidantnú aktivitu a schopnosť vychytávať reaktívne formy kyslíka a dusíka. Sú tiež známe ich imunomodulačné funkcie^{41,43}.

Floretín je dihydrochalkón, ktorý sa výlučne vyskytuje v jablkách, a to prevažne vo forme glukozidu, presnejšie 5-O-glukozidu floretínu (floridzín) (obr. 7). Floridzín je prítomný predovšetkým v semenách, stonkách, listoch a len v minimálnych množstvách v šupke či dužine. Najčastejšie popisovaný biologický účinok floridzínu je inhibícia sorbcie glukózy v intestinálnom trakte prostredníctvom kotransportéru 1-D-glukózy (SGLT1). Táto vlastnosť klasifikuje floridzín ako anti-diabetické činidlo. Floretín tiež inhibuje proteín GLUT2 zabezpečujúci ľahší transport glukózy nachádzajúci sa na bazolaterálnom reťazci enterocytov⁴⁴. Cowan⁴⁵ popisuje floretín ako antimikrobiálnu látku so širokým spektrom účinnosti, zatiaľ čo Ehrenkranz a spol.⁴⁶ ho označili za fungicídnu zlúčeninu.

Antokyandíny (obr. 8) dodávajú rastlinám ich charakteristické sfarbenie (ružové, oranžové, červené, modré, fialové). Nachádzajú sa rozpustené vo vakuolách epidermálnych a subepiderálnych buniek kvetov a plodov a niekedy aj vo sférických váčkoch nazývaných antokyanoplasty⁸. Antokyandíny sa vyskytujú v rovnováhe štyroch molekulárnych foriem: červený flavilínový kation, bezfarebná pseudobáza, bezfarebný chalkón a modrá chi-



R = H, kyanidín
R = galaktóza, kyanidín-3-galaktozid

Obr. 8. Antokyandíny nachádzajúce sa v jablku

noidná báza. Ich farba je silne závislá na pH⁴⁷. Vo forme aglykónov sú vysoko nestabilné, a preto sa najčastejšie vyskytujú v glykozidovej forme (glukóza v polohe 3), prípadne stabilizované esterovou väzbou s rôznymi alifatickými (kyselina citrónová a jablčná) či aromatickými kyselinami (deriváty kyseliny škoricovej a benzoovej), čím vzrastá ich tolerancia k svetlu, pH a podmienkam oxidačného stresu. Jednou z ďalších možností stabilizácie antokyanínov je tvorba komplexov s inými flavonoidmi (kopigmentácia). V ľudskej strave sa nachádzajú v ovoci a zelenine prevažne v šupkách a len ojedinele v dužine (čerešne a jahody). V jablkách sa vyskytuje kyanidín v koncentrácii približne 2–4 g kg⁻¹ natívnej hmoty¹⁰. Biologické aktivity antokyanidínov sú publikované veľmi široko, z veľkého množstva publikovaných prác možno spomenúť antioxidačné účinky⁴⁸, protinádorové účinky⁴⁹ ako aj gastroprotektívne, anticeluratívne účinky⁵⁰.

3. Metódy izolácie polyfenolov

Rastlinný materiál je tak fyzikálne ako aj látkovo heterogénna surovina vyznačujúca sa rôznorodosťou bunkovej štruktúry. Z hľadiska extrakcie je možné deliť rastlinný materiál na dve časti: (i) stavebný materiál (skelet bunky) a (ii) fytochemikálie vyskytujúce sa v bunkách ako aj v medzibunkovom priestore⁵¹.

Extrakciu fenolových látok z rastlinného materiálu môžu výrazne ovplyvňovať:

- fyzikálno-chemické vlastnosti, kde je možné vykonať predikciu na základe poznania chemickej štruktúry žiadaného fenolu,
- spôsob predúpravy materiálu (sušenie, mrazenie, homogenizácia) má vplyv na zloženie, stabilitu extrahovaných látok a rýchlosť prenosu hmoty pri extrakcii^{51,52},
- voľba extrakčnej metódy je významná hlavne vzhľadom k výťažnosti a náročnosti následnej izolácie a purifikácie polyfenolov^{53,54}.

Keďže fenolové látky v rámci jednotlivých tried i v rámci celej skupiny majú zabudované vo svojom skelete podobné chemické štruktúry, je možné predpokladať, že extrakty rastlinného materiálu budú vždy zmesou rôznych tried fenolových látok, ktoré sú rozpustné za daných podmienok. Preto sa pri izolácii fytochemikálií často všeobecne zaraďujú kroky slúžiace na odstránenie neželaných fenolových látok a tiež nefenolových zlúčenín vystupujúcich ako nečistoty vo výslednom extrakte (napríklad vosky, tuky, terpeny a chlorofyly)⁵⁵.

3.1. Úprava vstupnej suroviny

Na získanie maximálnych výťažkov extrakcie je vhodné pred extrakciou daný rastlinný materiál vhodne uskladniť a upraviť. Mrazenie a lyofilizácia vzorky sa volí hlavne v prípadoch, ak izolované látky môžu podliehať nežiaducim enzymatickým reakciám v samotnom rastlinnom materiály prípadne prostredníctvom mikrobiálnej

kontaminácie. Inou možnosťou uchovania extrakčného materiálu pred rozkladom je sušenie, ktoré však v určitých prípadoch znižuje výťažnosť extrakcie (napríklad katechínov) a navyš je tu možnosť tepelného rozkladu žiadaných zlúčenín⁵¹.

Predextrakčná úprava vzorky predstavuje odstránenie bariér brániacich difúzii extrahovaných látok. V rastlinných pletivách sú to hlavne membránové útvary a medzibunková pojivová hmota (extracelulárny matrix). Na uľahčenie difúzných procesov pri extrakcii sa často využíva homogenizácia rastlinného materiálu⁵². Vo všeobecnosti poznáme dva typy homogenizácie a to fyzikálnu a chemickú homogenizáciu.

Medzi fyzikálne homogenizačné metódy môžeme zaradiť mechanické rozdrobenie vzorky (na rôzne veľké výsledné častice), sušenie a zmrazovanie. Sušením sa narušujú membránové útvary a vznikajú v nich otvory, cez ktoré môžu intracelulárne látky ľahšie prechádzať do extraktu. Zmrazovanie okrem toho, že je výhodnou možnosťou uchovania rastlinného materiálu, patrí medzi homogenizačné postupy, pretože pri znížení teploty pod bod tuhnutia vody sa v bunkách rastlinného materiálu vytvárajú kryštály ľadu narušujúce integritu buniek, čím sa po rozmrazení uľahčí extrakčný proces⁵².

Hlavnou chemickou homogenizačnou metódou predúpravy vzorky je extrakcia rastlinného materiálu lipofilným rozpúšťadlom. Používa sa hlavne pri vzorkách s vysokým obsahom lipidových zlúčenín. Keďže enzýmy sú zaraďované medzi katalyzátory chemických reakcií, je možné do tejto skupiny zaradiť enzýmovú hydrolyzu bunkových stien. Na tento účel sa používajú hlavne pektínázy a celulázy, ktoré rozrušujú pektíny a celulózu ako hlavné stavebné kamene bunkových stien a medzibunkovej pojivovej hmoty rastlinných pletív.

Uvedené kroky predúpravy vzorky možno vzájomne kombinovať a meniť podmienky, pri ktorých jednotlivé procesy prebiehajú (napríklad pri sušení teplota a doba sušenia). V literatúre sa zväčša používajú sušenie a následná mechanická homogenizácia alebo už autori priamo vychádzajú zo sušeného materiálu vo forme prášku⁵².

3.2. Voľba extrakčnej metódy

Extrakčná metóda zahŕňa niekoľko parametrov výrazne vplyvujúcich na kvantitatívnu a kvalitatívnu kompozíciu extraktov. Medzi najdôležitejšie parametre extrakčných metód patria – voľba extrakčného činidla, pH prostredia, teplota extrakcie, pomer množstva materiálu k množstvu extrakčného činidla, počet stupňov a doba extrakcie.

Voľba extrakčného činidla závisí na rozpustnosti extrahovanej zložky⁵¹. Rozpustnosť fenolových látok v danom rozpúšťadle je určovaná jej fyzikálno-chemickými vlastnosťami, stupňom glykozylácie fenolových látok alebo ich prítomnosťou vo forme Na solí reakciou s polárnymi bázami sa zvyšuje ich rozpustnosť v polárnych rozpúšťadlách. Menej polárne aglykóny, akými sú izoflavóny, flavanóny, a vyššie metoxylované flavó-

ny a flavonoly, sú rozpustnejšie v nepolárnych rozpúšťadlách. Preto neexistuje univerzálny postup na izoláciu všetkých polyfenolov, prípadne špecificky jednej triedy týchto látok z rastlinného materiálu⁵⁶.

Pri získavaní polyfenolov sa často používa extrakcia vodou (pH 1,5–10), metanolom⁵⁷, etanolom⁵⁸ a acetónom⁵⁹ s následnou extrakciou lipofilnými organickými rozpúšťadlami (*n*-hexán, benzén, chloroform, etylacetát, dietyléter) volenými na základe fyzikálnych vlastností žiadaných fenolových látok^{19,59}. Menej sa používajú propanol, *n*-butanol a dimetylformamid⁶⁰ prípadne dichlórmetán⁶¹. Známe sú i extrakčné činidlá tvorené vodným roztokom metanolu⁶², etanolu⁶³, acetónu⁶⁴ a izopropanolu⁶⁵ a kombináciou spomínaných rozpúšťadiel⁶⁶.

Hodnota pH prostredia extrakcie je významná hlavne vo väzbe na rozpustnosť cieľových zlúčenín pri danom pH. Je vo všeobecnosti známe, že pri pH približne 10 sa vyskytuje väčšina organických kyselín vo forme solí, pri pH 2 je vo forme solí väčšina organických báz, ktoré sú vo vodnom prostredí vysoko rozpustné a naopak nedostupné pre organické rozpúšťadlo.

Teplota extrakcie významne ovplyvňuje výsledný extrakt. Vyššie teploty umožňujú zvýšiť permeabilitu buniek, difúzny koeficient a rozpustnosť extrahovaných látok, ale tiež skrátiť dobu extrakcie a znížiť viskozitu systému. Avšak teploty príliš vysoké môžu spôsobiť rozklad žiadaných látok^{19,52} prípadne zvyšovať rýchlosť nežiadúcich reakcií (oxidačné reakcie pri izolácii polyfenolov), ktoré sa dajú čiastočne tlmiť prídavkom špecifických látok (napríklad butylhydroxytoluén – BHT). V práci Graziani a spol.⁶⁷ sa extrahovali polyfenolové látky z vymrazených jabĺk s 1% metanolovým roztokom BHT.

Pomer množstva materiálu k množstvu výluhu sa volí na základe sorpčnej schopnosti tuhej fázy a rozpustnosti extrahovaných látok⁵¹. Je veľmi dôležité zvoliť správny pomer, nakoľko príliš nízky pomer spôsobuje nedostatočné vyčerpanie suroviny a príliš vysoký pomer môže zhoršiť ďalšiu prácu s extraktom, nakoľko sa do extraktu môže extrahovať väčšie množstvo balastných látok. V štúdiu Shahidi a Naczka⁶⁸ sa zistilo, že pri extrakcii kanoly so 70% acetónom zmena pomeru medzi návažkom rastlinného materiálu a extrakčným činidlom z 1:5 na 1:10 zvýšilo výťažnosť extrakcie kondenzovaných tanínov z 257,3 mg na 321,3 mg/100 g suroviny a celkových polyfenolov z 773,5 mg na 805,8 mg/100 g suroviny.

S počtom extrakčných stupňov stúpa výťažnosť extrakcie. To znamená, že je efektívnejšie extrahovať to isté množstvo materiálu štyrikrát s 50 ml ako jedenkrát s 200 ml rozpúšťadla. Kvantitatívne výťažky sú získavané maximálne 3–5 stupňovou extrakciou. Ďalšie extrakcie sa stávajú neefektívne vzhľadom na množstvo vyextrahovaných látok⁵².

Doba extrakcie sa pohybuje v závislosti od druhu a spôsobu predúpravy rastlinného materiálu a rozpustnosti cieľových zlúčenín od 30 sekúnd až po 2 týždne⁶².

Izolačné postupy získavania polyfenolových látok jabĺk sú v súlade s uvedenými extrakčnými postupmi aplikovateľnými na iné rastlinné materiály^{69–74}.

4. Záver

Z uvedeného je zjavné, že polyfenolové látky jabĺk vykazujú širokú paletu biologických účinkov. Tieto látky je možné získať rôznymi izolačnými postupmi, a to tak zo zrelých a nezrelých jabĺk, ako aj z odpadu po spracovaní jabĺk vznikajúceho pri výrobe jablkových štiav a koncentrátov obsahujúceho relatívne veľké zostatkové množstvo polyfenolových látok (floridzín, kyselina chlorogénová, epikatechín a glykozidy kvercetínu). Pripravené preparáty je možné využiť tak v potravinárskom priemysle vo forme aditívnych prísad do potravín na stabilizáciu a zlepšenie sensorických vlastností potravín, ako aj vo farmaceutickom priemysle ako prírodné preparáty použiteľné na liečenie niektorých civilizačných ochorení, alebo na preventívno-lekárske účely.

LITERATÚRA

1. Cifranič P., Hnídzik F., Hričovský I., Župník M.: *Polyfenolológia*. Príroda, Bratislava 1978.
2. Aprikian O., Duclos V., Guyot S., Besson C., Manach C., Bernalier A., Morand C., Rémésy C., Demigné C.: *J. Nutr.* 133, 1860 (2003).
3. Shoji T., Akazome Y., Kanda T., Ikeda M.: *Food Chem. Toxicol.* 42, 959 (2004).
4. Shaheen S. O., Sterne J. A. C., Thompson R. L., Songhurst C. E., Margetts B. M., Burney P. G. J.: *Am. J. Respir. Critical Care Medicine* 164, 1823 (2001).
5. Boyer J., Liu R. H.: *Nutr. J.* 3, 1 (2004).
6. Häkkinen S.: *Dissertation*. University of Kuopio, Kuopio 2000.
7. Beckman C. H.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57, 101 (2000).
8. Harborne J. B.: *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London 1994.
9. Alonso-Salces R. M., Ndjoko K., Queiroz E. F., Ioset J. R., Hostettmann K., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F.: *J. Chromatogr., A* 1046, 89 (2004).
10. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.: *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727 (2004).
11. Wei T., Sun H., Zhao X., Hou J., Hou A., Zhao Q., Xin W.: *Life Sci.* 70, 1889 (2002).
12. Erdölyi K., Kiss A., Bakondi E., Bai P., Szaböl C., Gergely P., Erdödi F., Virag L.: *Mol. Pharmacol.* 68, 895 (2005).
13. Rapizzi E., Fossati S., Moroni F., Chiarugi A.: *Mol. Pharmacol.* 66, 890 (2004).
14. Al-Ayyoubi S., Gali-Muhtasib H.: *Mol. Carcinog.* 46, 176 (2007).
15. Chen X., Hasuma T., Yano Y., Yoshimata T., Morishima Y., Wang Y., Otani S.: *Anticancer Res.* 17, 2555 (1997).
16. Akao Y., Maruyama H., Matsumoto K., Ohguchi K., Nishizawa K., Sakamoto T., Araki Y., Mishima S., Nozawa Y.: *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1057 (2003).
17. Tsuzurahara K.: *Chem. Pharm. Bull.* 25, 102 (1977).
18. Chang H. K., Hsu F. L., Liu I. M., Cheng J. T.: *J.*

- Pharm. Pharmacol. 55, 833 (2003).
19. Shi J., Nawaz H., Pohorly J., Mittal G., Kakuda Y., Jiang Y.: *Food Rev. Int.* 21, 139 (2005).
 20. Erlund I.: *Dissertation*, University of Helsinki, Helsinki 2002.
 21. Van Buren J., De Vos L., Pilnik W.: *J. Agric. Food Chem.* 24, 448 (1976).
 22. Harborne J. B.: *Comparative Biochemistry of The Flavonoids*. Academic Press, London 1967.
 23. Boyer J., Brown D., Liu R. H.: *Nutr. J.* 11, 1 (2005).
 24. Mutoh M., Takahashi M., Fukuda K., Matsushima-Hibiya Y., Mutoh H., Sugimura T., Wakabayashi K.: *Carcinogenesis* 21, 959 (2000).
 25. Formica J. V., Regelson W.: *Chem. Toxicol.* 33, 1061 (1995).
 26. Mamani-Matsuda M., Rambert J., Malvy D., Lejoly-Boisseau H., Daulouéde S., Thiolat D., Coves S., Courtois P., Vincendeau P., Mossalayi M. D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 924 (2004).
 27. Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharis T. C.: *Pharmacol. Rev.* 52, 673 (2000).
 28. Mendoza-Wilson A. M., Glossman-Mitnik D.: *J. Mol. Struct. (Theochem)* 681, 71 (2004).
 29. Schieber A., Hilt P., Streker P., Endress H. U., Rentschler C., Carle R.: *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 4, 99 (2003).
 30. Bais H. P., Walker T. S., Stermitz F. R., Hufbauer R. A., Vivanco J. M.: *Plant Physiol.* 128, 1173 (2002).
 31. Rossetto M., Vanzani P., Mattivi F., Lunelli M., Scarpa M., Rigo A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 408, 239 (2002).
 32. Pedrielli P., Skibsted L. H.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 7138 (2002).
 33. Singh D., Chander V., Chopra K.: *Pharmacol. Rep.* 57, 70 (2005).
 34. Hisano M., Yamaguchi K., Inoue Y., Ikeda Y., Iijima M., Adachi M., Shimamura T.: *Arch. Dermatol. Res.* 295, 183 (2003).
 35. Mantani N., Imanishi N., Kawamata H., Terasawa K., Ochiai H.: *Planta Med.* 67, 240 (2001).
 36. Shiozaki T., Sugiyama K., Nakazato K., Takeo T.: *Yakugaku Zasshi* 117, 448 (1997).
 37. Conte A., Pellegrini S., Tagliacucchi D.: *Drugs Exp. Clin. Res.* 29, 243 (2003).
 38. Fan X. J.: *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 14, 190 (1992).
 39. Perrissoud D., Maignan M. F., Dumont J. M.: *Liver* 5, 55 (1985).
 40. He Y. S.: *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2, 15 (1982).
 41. Hammerstone J. F., Lazarus S. A., Schmitz H. H.: *J. Nutr.* 130, 2086 (2000).
 42. Vidal S., Francis L., Guyot S., Marnet N., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier V., Waters E. J.: *J. Sci. Food Agric.* 83, 564 (2003).
 43. Akiyama H., Sato Y., Watanabe T., Nagaoka M. H., Yoshioka Y., Shoji T., Kanda T., Yamada K., Totsuka M., Teshima R., Sawada J., Goda Y., Maitani T.: *Federation Eur. Biochem. Soc.* 579, 4485 (2005).
 44. Crespy V., Aprikian O., Morand Ch., Besson C., Manach C., Demigné C., Rémésy C.: *Nutrient Metabolism – Res. Commun.* 2001, 3227.
 45. Cowan M. M.: *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564 (1999).
 46. Ehrenkranz J. R. L., Lewis N. G., Kahn C. R., Roth J.: *Diabetes Metab. Res. Rev.* 21, 31 (2005).
 47. Clifford M. N.: *J. Sci. Food Agric.* 80, 1063 (2000).
 48. Afaq F., Syed D. N., Malik A., Hadi N., Sarfaraz S., Kweon M. H., Khan N., Zaid M. A., Mukhtar H.: *J. Invest. Dermatol.* 127, 222 (2007).
 49. Lin X.X., Zhu S.M.: *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 30, 1147 (2005).
 50. Magistretti M. J., Conti M., Cristoni A.: *Arzneimittelforschung* 38, 686 (1988).
 51. Hanika J.: *Speciální separační procesy*. VŠCHT, Praha 1999.
 52. Santos-Buelga C., Williamson G.: *Methods in Polyphenol Analysis*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2003.
 53. Yrjönen T.: *Dissertation*. University of Helsinki, Helsinki 2004.
 54. Peng J., Fan G., Chai Y., Wu Y.: *J. Chromatogr., A* 1102, 44 (2006).
 55. Robbins R. J.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866 (2003).
 56. Robards K., Antolovich M.: *Analyst* 112, 11 (1997).
 57. Delaporte R. H., Sarragiotto M. H., Takemura O. S., Sánchez G. M., Filho B. P. D., Nakamura C. V.: *J. Ethnopharmacol.* 95, 229 (2004).
 58. Ponce M. A., Scervino J. M., Erra-Balsells R., Ocampo J. A., Godeas A. M.: *Phytochemistry* 65, 1925 (2004).
 59. Martini N. D., Katerere D. R. P., Eloff J. N.: *J. Ethnopharmacol.* 93, 207 (2004).
 60. Naczki M., Shahidi F.: *J. Chromatogr., A* 1054, 95 (2004).
 61. Mendoza L., Wilkens M., Urzúa A.: *J. Ethnopharmacol.* 58, 85 (1997).
 62. Nitta T., Arai T., Takamatsu H., Inatomi Y., Murata H., Iinuma M., Tanaka T., Ito T., Asai F., Ibrahim I., Nakanishi T., Watabe K.: *J. Health Sci.* 48, 273 (2002).
 63. Pessini G. L., Filho B. P. D., Nakamura C. V., Cortez D. A. G.: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 1115 (2003).
 64. Rauha J. P.: *Dissertation*. University of Helsinki, Helsinki 2001.
 65. Kim K. H., Lee K. W., Kim D. Y., Park H. H., Kwon I. B., Lee H. J.: *Bioresour. Technol.* 96, 1709 (2005).
 66. Molnár-Perl I., Füzfa Z.: *J. Chromatogr., A* 1073, 201 (2005).
 67. Graziani G., D'Argenio G., Tuccillo C., Loguercio C., Ritieni A., Morisco F., Del Vecchio Blanco C., Fogliano V., Romano M.: *Gut* 54, 193 (2005).
 68. Naczki M., Shahidi F., Sullivan A.: *Food Chem.* 45, 51 (1992).
 69. Alonso-Salces R. M., Korta E., Barranco A., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F.: *J. Chromatogr., A* 933, 37 (2001).
 70. Guyot S., Marnet N., Laraba D., Sanoner P., Drilleau

- J. F.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 1698 (1998).
71. Guyot S., Doco T., Souquet J. M., Moutounet M., Drilleau J. F.: *Phytochemistry* 44, 351 (1997).
72. Lachman J., Hamouz K., Čepl J., Pivec V., Šulc M., Dvořák P.: *Chem. Listy* 100, 522 (2006).
73. Cvangroschová M., Šmogrovičová D.: *Chem. Listy* 101, 287 (2007).
74. Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V.: *Chem. Listy* 101, 584 (2007).

M. Ondrejovič^{a,b}, T. Maliar^{a,b}, E. Polívka^a, and S. Šilhár^b (^a*Department of Biotechnologies, Faculty of Natural Sciences, University of St. Cyril and Methodius, Trnava, Slovak Republic*, ^b*Food Research Institute, Bio-centre, Modra, Slovak Republic*): **Apple Polyphenols**

The short review is focused on apple polyphenols – their classification, biological activities and methods of isolation. The polyphenols are classified according to their chemical structure. Specific isolation methods for selected compounds are given.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VLIV PŘÍTOMNOSTI NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH ORGANICKÝCH KYSELIN NA STANOVENÍ KADMIA TECHNIKOU DIFUZNÍHO GRADIENTU V TENKÉM FILMU

JANA JAKLOVÁ DYTRTOVÁ^a, MICHAL JAKL^a, DANA KOLIHOVÁ^b, DANIELA MIHOLOVÁ^b a PAVEL TLUSTOŠ^a

^a Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin,
^b Katedra chemie, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha - Suchbátka
dytrtova@af.czu.cz

Došlo 12.11.07, přepracováno 1.10.08, přijato 6.11.08.

Klíčová slova: DGT, kyselina šťavelová, kyselina octová, kyselina citronová, difuzní tok

Úvod

Technika difuzního gradientu v tenkém filmu (Diffusive Gradient in Thin Films; DGT) je poměrně novou separační technikou, která byla vyvinuta v roce 1993 (cit.¹) pro potřeby sledování obsahu těžkých kovů (TK) ve vodách. Možnosti jejího využití jsou i ve stanovení biopřístupné (labilní) frakce kovů v sedimentech², půdách^{3–5} a v půdním roztoku⁶.

Technika DGT je založena na Fickových zákonech difuze, kdy množství sorbovaného kovu na iontoměničový (sorpční) gel přímo závisí na době expozice (t), ploše (A) a tloušťce vrstvy (δ). Směrnici této závislosti je difuzní koeficient (D), který závisí na teplotě a je charakteristický pro každou látku. Někdy se také pro charakterizaci difuze látek používá veličina difuzní tok (F) (cit.⁷), vyjadřující koncentrační gradient sledovaného elementu.

Difuze kovu gelem a množství TK zachyceného na sorpční gel závisí nejen na celkové koncentraci TK v matrici (vodě, půdě, sedimentech, nebo půdním roztoku), ale také na síle jeho vazby na jednotlivé komponenty matrice⁸. Různě složitá matrice se stejnou celkovou koncentrací TK může tedy obsahovat různá množství labilních forem TK.

Významnou součástí půdní matrice a současně významnými ligandy TK jsou nízkomolekulární organické kyseliny (low molecular weight organic acids, LMWOA)⁹.

LMWOA tvoří s TK více či méně stabilní komplexy, které hrají významnou roli v příjmu TK rostlinou¹⁰. Z nízkomolekulárních organických kyselin se v půdě (a v půdním roztoku) nejčastěji vyskytují kyseliny šťavelová, citronová, jablečná, vinná a octová¹¹.

Tato práce je zaměřena na charakterizaci vlivu vybraných LMWOA (kyseliny octové, šťavelové a citronové) na difuzi kadmia v modelových roztocích s použitím techniky DGT.

Experimentální část

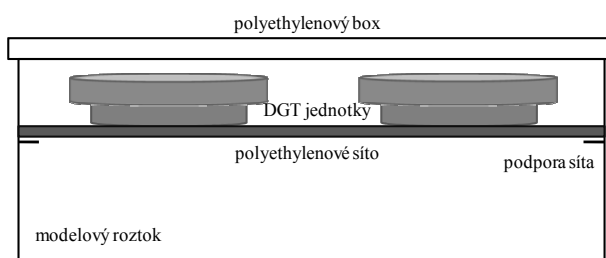
Modelové roztoky kadmia byly připraveny postupným ředěním kalibračního roztoku s certifikovanou koncentrací Cd (Analytika, ČR) a z kalibračních roztoků s certifikovanou koncentrací kyseliny šťavelové, citronové a octové (Merck, ČR) v rozmezí jejich koncentrací běžně se vyskytujících v kontaminovaném půdním roztoku, tj. 1 až 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (cit.¹², viz tabulka I). Iontová síla modelových roztoků byla upravena 0,1 mmol L^{-1} NaNO_3 (cit.^{13,14}), kyselost modelových roztoků byla určena koncentracemi jednotlivých organických kyselin a pohybovala se okolo hodnoty $\text{pH } 5,6 \pm 0,3$, což je hodnota spadající do oblasti pH , ve které je technika DGT spolehlivě aplikovatelná¹³.

DGT jednotky (DGT Research, Lancaster, UK) jsou složeny z nosné a funkční části. Nosnou část tvoří teflonová podložka (piston) a čepička (cap), které drží vlastní funkční část DGT jednotky (gely a membránu) pohromadě a vymezují tzv. expoziční okno. Funkční část se skládá z difuzního gelu (polyakrylamid hydrogel; Diffusive Gel Strip; 0,8 mm) uchovávaného v 0,1 mol L^{-1} NaCl při teplotě 4 °C, iontoměničového sorpčního gelu (Chelex Gel Strip; 0,4 mm) s funkčními skupinami kyseliny imidoocetové.

Tabulka I
Schéma označení a koncentrace modelových roztoků

Označení roztoku	Cd [nmol L ⁻¹]	OA ^a [nmol L ⁻¹]	CA ^b [nmol L ⁻¹]	AA ^c [nmol L ⁻¹]
Cd	8,90	0	0	0
Cd D	8,90	111,00	52,05	156,25
Cd DE	8,90	22,00	10,41	31,25
Cd E	8,90	11,00	5,21	15,63
Cd EF	8,90	2,20	1,04	3,13
Cd F	8,90	1,10	0,52	1,56
Cd G	8,90	0,11	0,05	0,16

^a Kyselina šťavelová, ^b kyselina citronová, ^c kyselina octová



Obr. 1. Schéma pokusu. Umístění DGT jednotek v modelovém roztoku

vé (komerční označení Chelex[®] 100, cit.¹³), skladovaném v demineralizované vodě při teplotě 4 °C a membránového filtru průměru 25 mm a velikosti pórů 0,45 μm (Tuffryn[®] Membrane Filter, Pall Corporation, USA).

DGT jednotky (10 kusů) byly uloženy na PET síto (o velikosti ok 2 × 2 cm) tak, aby expoziční plochy byly ponořeny cca 0,5 cm pod hladinou modelového roztoku (obr. 1). Síta byla umístěna do plastového kontejneru o objemu 2,5 L, objem modelového roztoku byl 2,2 L. Doba expozice jednotek v roztoku byla 24, 48, 72, 120 a 196 hodin a probíhala při konstantní teplotě 4 °C. Roztok nebyl trvale míchaný, neboť předběžný experiment porovnávající nemíchaný a míchaný systém neprokázal statisticky významný rozdíl v naměřeném obsahu iontů v sorpčním gelu (tab. II). Roztok byl míchaný rychlostí 500 min⁻¹, což je hodnota doporučená¹³ pro dobře míchaný roztok. Podle vztahu (1) (cit.³), kde M_t je množství Cd navázané na iontoměnič sorpčního gelu v daném čase, D je difuzní koeficient Cd, C_b je koncentrace iontů Cd v exponovaném roztoku, t je doba expozice, A je expoziční plocha (3,14 cm²), Δg je tloušťka difuzního gelu (0,4; 0,8 a 1,6 mm, cit.¹³), δ_h je tloušťka hraniční difuzní vrstvy:

$$\frac{1}{M_t} = \frac{\Delta g}{DC_b t A} + \frac{\delta_h}{DC_b t A} \quad (1)$$

byla vypočítána hodnota hraniční difuzní vrstvy $\delta_h = 86 \mu\text{m}$ pro nemíchaný roztok, což je teoretická hodnota, která zvětšuje tloušťku difuzní vrstvy dobře míchaného roztoku (danou difuzním gelem) o 8,4 %, což se projeví skutečnou chybou v koncentraci Cd v eluentu v nemíchaném roztoku o 0,18 až 2,32 %.

DGT jednotky byly postupně (v daný expoziční čas) po dvou kusech vyjímány z nádoby, rozebrány a sorpční gel byl loužen po dobu 7 dní při teplotě 4 °C v 1 mL 2 mol L⁻¹ HNO₃ v 1,5 mL vialkách¹³. Získaný výluh byl demineralizovaný destilovanou vodou naředěn na trojnásobný objem a obsah Cd (koncentrace C_e viz dále) byl stanoven metodou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET-AAS) na přístroji Varian AA 280Z s grafitovou kyvetou GTA 120 (Austrálie).

Při hodnocení rozdílu v sorbovaném množství těžkého kovu v jednotlivých variantách se vycházelo ze základního vztahu¹³:

$$M_t = C_e \frac{V_g + V_e}{f_e} \quad (2)$$

kde V_g je objem gelu (0,16 mL), V_e je objem loužičího média (1 mL 2 mol L⁻¹ HNO₃), f_e je výtěžnost loužení pro většinu kovů (v 2 mol L⁻¹ HNO₃ se uvádí hodnota $f_e = 0,8$ (cit.¹³), tedy výtěžnost 80 %) a C_e je koncentrace sledovaného kovu v eluentu stanovená metodou ET-AAS.

Dalším parametrem charakterizujícím vliv přítomnosti ligandu na difuzi Cd je difuzní tok (F), daný základním vztahem¹⁵:

$$F = \frac{M_t}{At} \quad (3)$$

Expoziční čas (t) nabýval hodnot 24, 48, 72, 120 a 196 hodin. Hodnotu difuzního toku lze buď vypočítat podle vztahu (3) nebo ji určit z časových závislostí akumulovaného množství Cd (cit.¹⁶), přičemž je výhodné hodnotu M_t vztáhnout ke koncentraci Cd v okolním roztoku v daném čase ($M_{t,\text{bulk}}$)¹⁷ a získat tak relativní poměr sorbovaného množství (Rp):

$$\text{Rp} = \frac{M_t}{M_{t,\text{bulk}}} \quad (4)$$

Ze směrnice přímek časových závislostí lze pak získat reálný difuzní tok (F_r), který je nezávislý na koncentraci Cd v roztoku. Z hodnoty F_r lze vypočítat reálný difuzní koeficient (D) pro daný systém¹⁵:

$$D = \frac{F_r}{C_e} \delta \quad (5)$$

kde δ je tloušťka difuzní vrstvy daná součtem tloušťky difuzního gelu, tloušťky membránového filtru a tloušťky hraniční difuzní vrstvy vzniklé v důsledku nemíchaní roztoku (1,021 mm). V této práci byl využit vztah¹⁴:

$$D = \frac{s\delta}{AC_e 60} \quad (6)$$

kde s je směrnice (sklon, ng min⁻¹).

Tabulka II

Výsledky předběžného experimentu s míchaným (500 min⁻¹) a nemíchaným roztokem. Hodnoty C_e (koncentrace kadmia stanovená metodou ET-AAS) spolu korelují (0,995)

Typ roztoku	C_e [$\mu\text{g L}^{-1}$]		
Expoziční čas	24 h	48 h	72 h
Nemíchaný	3,10 ± 0,10	4,64 ± 0,07	5,55 ± 0,16
Míchaný	3,13 ± 0,03	4,75 ± 0,06	5,56 ± 0,08
Odchylka, %	1,00	2,32	0,18

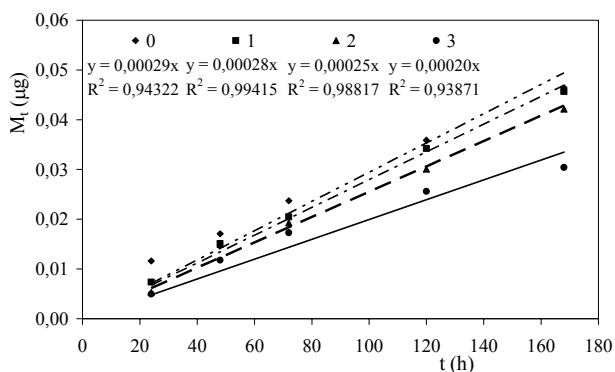
Výsledky a diskuse

Pro potvrzení, že nemíchání roztoku kontinuálně nemělo vliv na linearitu difuze, byly sestrojeny grafy závislosti M_t na čase (obr. 2).

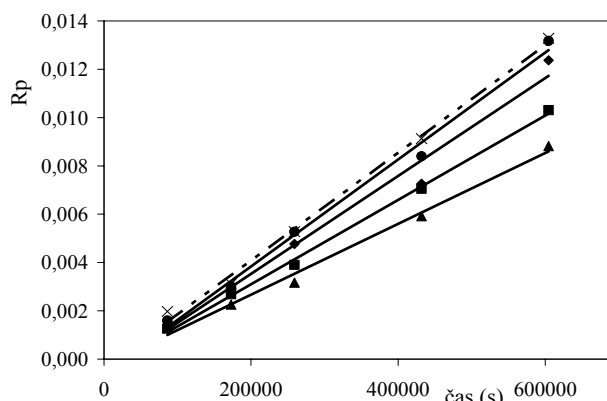
Tyto závislosti jsou lineární, což potvrzuje to, že v roztocích s velmi nízkou koncentrací se vliv nemíchání výrazně neprojeví. Závislosti procházejí nulou^{13,18}, což však není vždy pro potvrzení linearitu sorpce vyžadováno¹⁴.

Ze zjištěných hodnot množství Cd zachyceného na sorpční gel vztaženého na aktuální množství Cd v roztoku (R_p) z roztoků o různých koncentracích kyseliny šťavelové (OA), citronové (CA), nebo octové (AA) byly sestrojeny časové závislosti. Průběh závislostí v roztocích s obsahem kyseliny šťavelové ukazuje obr. 3, závislosti za přítomnosti dalších kyselin jsou obdobné. Přímkami nemíří do počátku souřadnic, protože na ustavení rovnováhy je třeba jistého času (třebaže velmi krátkého), a tedy v blízkosti nuly není závislost sorbovaného množství Cd na čase lineární^{14,19}. Proto nebyly závislosti na nulový obsah Cd extrapolovány a končí posledním experimentálně ověřeným bodem.

Se zvyšující se koncentrací kyseliny šťavelové, citronové i octové v roztoku docházelo ke snižování množství Cd sorbovaného na sorpční gel, množství sorbovaného Cd záviselo také na typu kyseliny (ligandu). Přítomnost ligandu v roztoku se projevila i změnou hodnoty reálného difuzního toku (tabulka II), kdy hodnota F_r se z hodnoty $3,41 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, charakteristické pro samotné Cd v roztoku bez ligandu, zmenšovala s rostoucí koncentrací daného ligandu (obr. 4). Závislost reálného toku na koncentraci použitých kyselin bylo možné popsat exponenciální rovnicí 1. řádu. Směrnice této závislosti (A1) byla charakteristická pro danou organickou kyselinu a její velikost závisela lineárně ($y = 2,224 \cdot 10^{-9} \cdot x + 2,223 \cdot 10^{-9}$) na



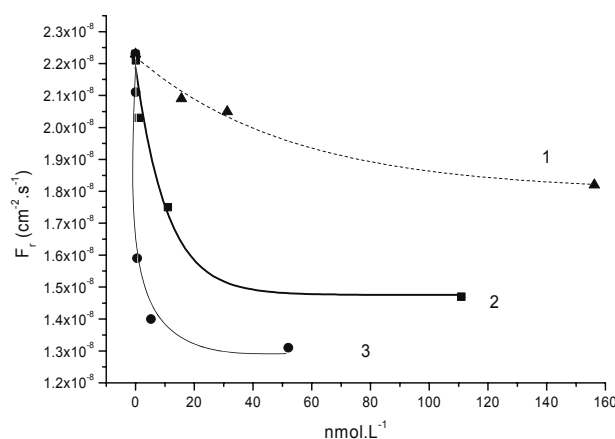
Obr. 2. Závislost sorbovaného množství Cd (M_t) na čase z roztoku čistého Cd (0) a z roztoků Cd s kyselinou octovou o koncentraci $15,63 \text{ nmol L}^{-1}$ (1), šťavelovou o koncentraci 11 nmol L^{-1} (2) a citronovou o koncentraci $10,41 \text{ nmol L}^{-1}$ (3)



Obr. 3. Časové závislosti poměrného množství Cd sorbovaného na sorpční gel v roztocích s různou výchozí koncentrací kyseliny šťavelové (viz tab. I) a stejnou výchozí koncentrací Cd (tj. $1 \mu\text{g L}^{-1}$), × Cd, • CdG, ♦ CdF, ■ CdE, ▲ CdD

počtu karboxylových skupin v kyselině, a to s pravděpodobností $P = 0,073$ a spolehlivostí $R = 0,985$. Z hodnot směrnic exponenciálních závislostí (tabulka III) lze usuzovat na míru zpomalení difuze, a to v řadě od kyseliny octové přes kyselinu šťavelovou ke kyselině citronové: $AA < OA < CA$.

Vliv přítomnosti ligandu na difuzi Cd lze z odezvy DGT hodnotit podle velikosti difuzních koeficientů vypočtených z hodnoty reálného difuzního toku F_r (tabulka IV) podle vztahu (5) a zároveň podle vztahu (6). Experimentálně zjištěná hodnota difuzního koeficientu pro Cd bez ligandu byla $3,41 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, což je ve shodě s tabelovanou hodnotou difuzního koeficientu pro Cd při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $3,44 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (cit.²⁰). Hodnota reálného



Obr. 4. Závislost difuzních toků Cd na koncentraci kyseliny octové (1), šťavelové (2) a citronové (3)

Tabulka III

Směrnice A1 exponenciálních závislostí ($y = A1 \cdot \exp(-x/t1) + y0$) reálného difuzního toku na koncentraci kyseliny citronové (CA), šťavelové (OA) a octové (AA)

	CA	OA	AA
A1 (nmol L ⁻¹ cm ⁻² s ⁻¹)	8,67·10 ⁻⁹	7,12·10 ⁻⁹	4,22·10 ⁻⁹
R ^a	0,994	0,974	0,990

^a Spolehlivost

difuzního koeficientu se s přidáním ligandu snižovala, přičemž záleželo na typu i množství přidaného ligandu.

V současné době existují dvě představy, jak přítomnost ligandů v roztoku ovlivňuje difuzi a sorpci TK na sorpční gel. První představa^{14,19} předpokládá difuzi difuzním gelem a následnou sorpci na sorpční gel pouze u volných iontových forem TK. Touto difuzí dochází k neustálému odebrání volných iontů TK a k termodynamicky vynucenému rozpadu komplexu TK s LMWOA na rozhraní roztoku a difuzního gelu. Množství TK zachycené na sorpční gel za určitý čas je ovlivňováno poločasem rozpadu komplexů TK v roztoku a jeho pomalejší difuzí

z roztoku k fázovému rozhraní s gelem. Tento vliv se projevuje pouze v případě komplexů stabilnějších, u těch, které se rozpadají rychle (labilní komplexy), není rozpadová reakce pro difuzi limitujícím faktorem. V případě stabilnějších komplexů^{14,21} je hlavním mechanismem termodynamická rovnováha popsaná Guldbergovým-Waagovým zákonem, která je dána rovnovážnou konstantou reakce (K). To znamená, že změna v koncentraci (množství) jednoho z produktů nebo reaktantů má za následek změnu v koncentraci ostatních komponent reakce (K se za dané teploty nemění). Bude-li tedy jeden z reaktantů (kov) odebíráán (například Cd²⁺ difuzí a následnou sorpcí), bude docházet k opětovnému ustavování rovnováhy tak, že bude docházet k rozpadu produktů (komplexu Cd-LMWOA). Nižší sorpci Cd na sorpční gel lze tedy vysvětlit jeho nižší volnou (iontovou) okamžitou koncentrací v roztoku, která se navíc, jak vyplývá z Guldbergova-Waagova zákona, snižuje rychleji než v roztoku, ve kterém Cd komplexy netvoří.

Druhá představa^{22,23} předpokládá, že difuzním gelem procházejí spolu s volnými ionty TK i některé komplexy TK. Tuto představu lze uplatnit v experimentech, ve kterých byl použit difuzní gel s vysokou pórovitostí nebo komplexy s velmi malými ligandy. Snižování zachyceného množství TK na sorpční gel z takového roztoku oproti

Tabulka IV

Reálné difuzní toky kadmia (F_r), reálné difuzní koeficienty kadmia (D) a zpomalení difuzního toku vlivem přítomnosti LMWOA (F_{kin}) v prostředí různých koncentrací kyseliny šťavelové (OA), citronové (CA) a octové (AA). Hodnoty pH jednotlivých modelových roztoků se pohybovaly okolo $5,6 \pm 0,3$

LMWOA _{bulk} ^a [nmol L ⁻¹]	F_r [cm ⁻² s ⁻¹]	D [cm ² s ⁻¹]	F_{kin} [cm ⁻² s ⁻¹]
<i>Cd</i>			
0,00	2,23·10 ⁻⁸	3,41·10 ⁻⁶	0,0
<i>Cd+OA</i> ^b			
0,11	2,21·10 ⁻⁸	3,32·10 ⁻⁶	-0,20·10 ⁻⁹
1,10	2,03·10 ⁻⁸	3,27·10 ⁻⁶	-2,00·10 ⁻⁹
11,00	1,75·10 ⁻⁸	3,12·10 ⁻⁶	-4,80·10 ⁻⁹
111,00	1,47·10 ⁻⁸	2,85·10 ⁻⁶	-7,60·10 ⁻⁹
<i>Cd+CA</i> ^c			
0,05	2,11·10 ⁻⁸	2,86·10 ⁻⁶	-1,20·10 ⁻⁹
0,52	1,59·10 ⁻⁸	2,45·10 ⁻⁶	-6,40·10 ⁻⁹
5,21	1,40·10 ⁻⁸	2,11·10 ⁻⁶	-8,30·10 ⁻⁹
52,05	1,31·10 ⁻⁸	1,83·10 ⁻⁶	-9,20·10 ⁻⁹
<i>Cd+AA</i> ^d			
15,63	2,09·10 ⁻⁸	3,41·10 ⁻⁶	-1,40·10 ⁻⁹
31,25	2,05·10 ⁻⁸	3,38·10 ⁻⁶	-1,80·10 ⁻⁹
156,25	1,82·10 ⁻⁸	3,17·10 ⁻⁶	-4,10·10 ⁻⁹

^a Počáteční koncentrace Cd byla 8,90 nmol L⁻¹, viz tab. I, ^b Cd v přítomnosti různých koncentrací kyseliny šťavelové, ^c Cd v přítomnosti různých koncentrací kyseliny citronové, ^d Cd v přítomnosti různých koncentrací kyseliny octové

roztoku, kde se komplexy nevyskytují, je pak způsobeno nižšími difuzními koeficienty komplexů TK, než jaké mají volné ionty TK.

Ve skutečnosti zřejmě dochází ke kombinaci obou představených mechanismů, a to v závislosti na stabilitě daných komplexů a jejich velikosti²⁴. To, který z daných procesů se bude více uplatňovat, závisí na kritériích lability systému¹⁵, kterých bylo v literatuře charakterizováno opravdu mnoho^{17,25,26}. Tato kritéria vycházejí z aproximace reakční vrstvy^{27,28}, podle níž je možné posoudit míru lability daného systému z hodnoty difuzního toku F_{kin} (cit.⁷). F_{kin} (tabulka IV) je parametrem charakterizujícím záporný příspěvek k difuzi TK. Zpomalení difuze může být způsobeno disociací komplexu v souvislosti s odebráním iontů sledovaného kovu. Hodnota F_{kin} závisí jak na schopnosti komplexu disociovat, tak na transportu uvolněných iontů i komplexů k fázovému rozhraní, což je dáno podmínkami stacionárního stavu a maximálního toku komplexu roztokem. Podle této představy je reálný difuzní tok TK (F_r) tvořen z několika příspěvků⁷:

$$F_r = F_{metal} + F_{kin} + F_{dif} \quad (7)$$

kde F_{metal} je difuzní tok samotného TK (tabulka IV), F_{dif} je záporný příspěvek (zpomalení difuze) způsobený pomalejší difuzí komplexu TK v porovnání se samotným TK, který lze v labilních systémech (Cd + některé LMWOA) zanedbat¹⁴, a F_{kin} je zpomalení difuze v důsledku rychlosti vynuceného rozpadu komplexů na fázovém rozhraní, vyplývající z Guldbergova-Waagova zákona. F_{kin} má tedy zápornou hodnotu a jeho velikost (tabulka II) závisí na množství a charakteru přítomného ligandu, tedy na množství komplexovaného Cd a na stabilitě daného komplexu. Počáteční celkové koncentrace kadmia v jednotlivých nádobách stanovené pomocí ET-AAS se od předpokládané hodnoty liší, což je způsobeno jak náhodnou chybou ředění, tak i chybou měření na mezi detekce metody ET-AAS. Tato rozdílnost vstupních koncentrací je však ve výpočtu difuzních koeficientů i toků zohledněna (přepočtem podle vztahu (4)), stejně jako nestejně ubývající koncentrace kadmia v experimentech způsobená různě rychlou difuzí.

Závěr

Z předložených dat získaných technikou DGT (metodou používanou ke stanovení labilní frakce těžkých kovů v biologické matici) vyplývá, že nízkomolekulární organické kyseliny, běžně se vyskytující v půdním roztoku (šřavelová, citronová a octová), svou přítomností snižují míru zachycení kadmia na sorpčním gelu ve srovnání s roztokem Cd bez přítomnosti těchto ligandů. Velikost sorpce je charakterizována příslušnými difuzními koeficienty nebo difuzními toky Cd v roztocích s různou koncentrací sledovaných kyselin. S vyšší koncentrací kyseliny v roztoku dochází ke snižování množství kadmia zachyceného na sorpčním gelu. Uvedený děj lze popsat exponenciální

funkcí prvního stupně s dobrou spolehlivostí. Důvodem snižování množství Cd zachyceného na sorpčním gelu je tvorba komplexů testovaných kyselin s Cd. V důsledku jejich rozpadání během sorpce Cd dochází ke zpomalení difuzních toků daných systémů (F) o příspěvek kinetického toku (F_{kin}).

Práce byla provedena za přispění grantů GA ČR č. 521/06/0496 a MŠMT č. MSM 6046070901.

LITERATURA

1. Davison W., Zhang H.: *Nature* 367, 546 (1994).
2. Diviš P., Dočekalová H., Smetková V.: *Chem. Listy* 97, 1184 (2003).
3. Harper M. P., Davison W., Tych W.: *Aquatic Geochemistry* 5, 337 (1999).
4. Diviš P., Dočekalová H., Řezáčová V.: *Chem. Listy* 99, 640 (2005).
5. Řezáčová-Smetková V., Dočekal B., Dočekalová H.: *Chem. Listy* 99, 594 (2005).
6. Dyrtrtová J., Jakl M., Šestáková I., Tlustoš P., Balík J.: *The Book of Abstracts. The Seventh European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC7), 6.-9.12.2006, Brno 2006*, p. 50. Brno 2006.
7. Salvador J., Puy J., Cecilia J., Galceran J.: *J. Electroanal. Chem.* 588, 303 (2006).
8. Gimpel J., Zhang H., Hutchinson W., Davison W.: *Anal. Chim. Acta* 448, 93 (2001).
9. van Hees P. A. W., Jones D. L., Jentschke G., Godbold D. L.: *Soil Biol. Biochem.* 37, 771 (2005).
10. Jones D. L.: *Plant Soil* 205, 25 (1998).
11. Jones D. L., Dennis P. G., Owen A. G., van Hees P. A. W.: *Plant Soil* 248, 31 (2003).
12. Jaklová Dyrtrtová J., Šestáková I., Jakl M., Száková J., Miholová D., Tlustoš P.: *Cent. Eur. J. Chem.* 6, 71 (2008).
13. Zhang H., Davison W.: *Anal. Chem.* 67, 3391 (1995).
14. Scally S., Davison W., Zhang H.: *Anal. Chim. Acta* 558, 222 (2006).
15. Denney S., Sherwood J., Leyden J.: *Sci. Total Environ.* 239, 71 (1999).
16. Salvador J., Puy J., Galceran J., Cecilia J., Town T. M., van Leeuwen H. P.: *J. Phys. Chem., B* 110, 891 (2006).
17. van Leeuwen H. P.: *Electroanalysis* 13, 826 (2001).
18. Zhang H., Davison W.: *Anal. Chim. Acta* 398, 329 (1999).
19. Scally S., Davison W., Zhang H.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 1379 (2003).
20. <http://www.dgtresearch.com>, staženo 9. listopadu 2007.
21. Esteban M., Ariño C., Díaz-Cruz J. M.: *Contrib. Sci.* 2, 359 (2003).
22. Zhang H., Davison W.: *Anal. Chem.* 72, 4447 (2000).
23. Tusseau-Vuillemin M. H., Gilbin R., Taillefert M.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 1645 (2003).
24. van Leeuwen H. P., Town R. M., Buffle J., Clevén R.

- F. M. J., Davison W., Puy J., van Riemsdijk W. H., Sigg L.: *Environ. Sci. Technol.* 39, 8545 (2005).
25. Davison W.: *J. Electroanal. Chem.* 87, 395 (1978).
26. Galceran J., Puy J., Salvador J., Cecilia J., van Leeuwen H. P.: *J. Electroanal. Chem.* 505, 85 (2001).
27. Brdička R., Wiesner K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 12, 39 (1947).
28. Brdička R., Wiesner K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 12, 138 (1947).

J. Jaklová Dytrtová^a, M. Jakl^a, D. Koliňová^b, D. Miholová^b, and P. Tlustoš^a (^a *Department of Agro-environmental Chemistry and Plant Nutrition*, ^b *Department of Chemistry, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic*): **The Effect of Low-Molecular-Weight Organic Acids on Cadmium Assay Using Diffusive Gradient in Thin Film Technique**

Low-molecular-weight organic acids (citric, acetic and oxalic), which are common in soil solutions, decrease accumulation and diffusion flow of cadmium. The flows depend on the amount and type of organic acid in solution. The order of focused acids according to the degree of diffusion retardation is: acetic < oxalic < citric acid. The relative diffusion flow (F_r) was obtained as the gradient of the time dependences of real amounts of accumulated Cd. From F_r and real flow of free Cd, the kinetic flow was calculated, which characterizes the retardation impact of the acids on cadmium diffusion.



In the context of an *Advanced Grant of the European Research Council* entitled

New Horizons in Mass Spectrometry (HORIZOMS)

the research group of Dr. Detlef Schröder at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry (more: <http://www.uochb.cz/web/structure/198.html>) searches an

electrochemist (postdoctoral level or higher)

for the development of new coupling schemes between electrochemical and mass spectrometric methods. We are looking for a well-experienced and innovative candidate with excellent knowledge in theory and practice of electrochemistry; while particular mass spectrometric expertise is not required, willingness to tackle new frontiers is essential. We offer a stimulating research environment in an internationally recognized and very productive research group in conjunction with a competitive salary.

Applications (CV, key publications etc.) via email to: detlef.schroeder@uochb.cas.cz

DEKONTAMINACE ZEMIN EXTRAKCÍ ROZTOKY ALKOHOLŮ

TEREZA NOVÁKOVÁ^a, MAREK ŠVÁB^{a,b}
a MARTINA MÜLLEROVÁ^a

^a Ústav chemie ochrany prostředí, Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Dekonta, a.s., 273 42 Dřetovice 109

novakovt@vscht.cz

Došlo 2.8.07, přijato 12.9.08.

Klíčová slova: dekontaminace, ethanol, propan-2-ol, PCB, NEL

Úvod

Zdroje znečištění

Tuhé materiály kontaminované perzistentními organickými polutanty (POP), mezi které patří zeminy, sedimenty a kaly, znečištěné např. PCB, nebo látkami ropného či dehtového původu, představují závažný ekologický problém. PCB byly v minulosti používány jako přenašeče tepla v průmyslových zařízeních vyžadujících ohřev na vysoké teploty (např. obalovny živých směsí), dále pak jako chladicí oleje v transformátorech napětí, kondenzátorech a jiných elektrických zařízeních, kde se uplatňovaly jejich výborné izolační vlastnosti a stabilita. V 70. letech bylo zjištěno, že se PCB v prostředí nerozkládají, ale hromadí se v potravních řetězcích a mohou tak ohrožovat životní prostředí i lidské zdraví. Proto se od jejich výroby postupně upustilo¹. Expozice PCB ovlivňuje mozek, oči, srdce, imunitní systém, játra, ledviny, reprodukční systém a štítnou žlázu². Nezanedbatelným problémem současnosti z hlediska kontaminací jsou i tzv. ropné laguny, tedy místa, kde jsou deponovány ropné kaly, vznikající nejčastěji v provozech zabývajících se zpracováním ropy (rafinerie, petrochemické výroby atd.). Lagunové podloží je v přímém kontaktu s ropnými látkami a dochází tak k jeho kontaminaci. Při sanaci tedy nestačí odstranit jen obsah laguny, ale je třeba zabývat se též dekontaminací lagunového podloží³.

Metody využitelné k likvidaci ekologických zátěží

Vzhledem ke stabilitě a biologické nerozložitelnosti POP dochází k výraznému zúžení spektra možných technologií pro jejich odstranění z kontaminovaných médií. Kromě skládkování, které není z dlouhodobého hlediska přímo dekontaminační technologií, zůstává v podstatě pouze

využití termických (desorpce/spalování) nebo extrakčních procesů, které se obvykle nazývají promývání (kontinuální proces ve vrstvě), nebo praní (vsádkové provedení)⁴. V případě extrakčních procesů je klíčovou otázkou nalezení vhodného extrakčního činidla, kterým může být např. organické rozpouštědlo, roztok tenzidu, nebo zkapalněné plyny. Proces extrakce rozpouštědly spočívá ve vsádkovém praní kontaminovaného materiálu v uzavřených kontejnerech. Po přechodu kontaminantu do extrakčního činidla je rozpouštědlo odčerpáno a vedeno do regeneračního procesu, kde se znečišťující látky zkoncentrují do malého objemu a převážná část rozpouštědla je recyklována⁵. Dalším vhodným extrakčním činidlem může být roztok tenzidu, jehož výraznou předností je fakt, že se jedná o vodný roztok. Nevýhodou je často omezená dosažitelná účinnost dekontaminace, nicméně pro méně koncentrované kontaminace mohou být tenzidy optimální volbou. Přítomnost tenzidu v roztoku má vliv na jeho fyzikální vlastnosti, zejména snižuje povrchové, v přítomnosti nepolární fáze i mezifázové, napětí. Tenzidy tvoří ve vodném prostředí tzv. micely, jejichž jádro je nepolární oblast, ve které mohou být obsaženy nepolární molekuly, jež jsou jinak ve vodě v podstatě nerozpustné, např. některé POP⁶. Extrakce zkapalněnými plyny využívá jedinečných fyzikálních vlastností, jako je nízká viskozita, hustota a povrchové napětí kapalných plynů. Díky těmto vlastnostem je rychlost extrakce podstatně vyšší než u běžných kapalných rozpouštědel. Typickou látkou výhodně použitelnou pro tento účel je propan⁷.

Alkoholy jako extrakční činidla

Nižší alkoholy mají vlastnosti na pomezí mezi vodou (polárním rozpouštědlem) a organickými nepolárními rozpouštědly. Takové vlastnosti mohou být výhodné jak z hlediska vysoké extrakční účinnosti vzhledem k organickým kontaminantům, tak z hlediska možnosti jednoduchého odstranění činidla z promytého (nebo propaného) materiálu vodou a z hlediska případného biodegradačního dočištění. Další výhodou je poměrně nízká toxicita. V odborné literatuře jsou nejčastěji uváděny ethanol a propan-2-ol. Oba alkoholy mají hodnotu logaritmu distribučního koeficientu oktanol–voda ($\log P_{ow}$) blízkou nule (ethanol: $\log P_{ow} = -0,30$ (cit.⁸), propan-2-ol: $\log P_{ow} = 0,05$ (cit.⁹)), což znamená, že se podobně rozpouštějí jak ve vodě, tak v nepolárních rozpouštědlech. Jen velmi málo tak jednoduchých a běžných sloučenin vykazuje podobné vlastnosti.

Alkoholy mají schopnost snižovat Henryho konstantu některých s vodou nemísitelných látek a zvyšovat tak jejich rozpustnost ve vodě. Byla provedena řada experimentů zkoumajících rozpustnost tetrachlorethylenu (PCE) ve vodných roztocích o koncentracích ethanolu, propan-2-olu, nebo *tert*-butylalkoholu 10, 15, 18, 20, 23, 25, 30 a 35 %. Bylo zjištěno, že *tert*-butylalkohol snížil Henryho konstantu PCE nejvíce a ethanol nejméně. 28% *tert*-butylalkohol by zvýšil rozpustnost PCE až na 4000 mg l⁻¹,

zatímco roztok ethanolu by pro dosažení stejné účinnosti musel obsahovat 42 % ethanolu. Účinnosti jednotlivých alkoholů se začaly lišit při koncentraci kolem 18 obj.% (cit.¹⁰).

Možnosti odstranění polyaromatických uhlovodíků (PAH)

Laboratorními experimenty byla rovněž prověřována možnost odstraňování polyaromatických uhlovodíků (PAH) ze zemin. Jako extrakční činidla byly použity ethanol, propan-2-ol, aceton, pentan-1-ol, voda a jejich směsi. Píščitohlinitá silně kontaminovaná zemina (400 až 5000 mg kg⁻¹ PAH) používaná k experimentům pocházela z areálu bývalé rafinérie v Bedfordu (USA). Pro daný materiál byla neúčinnější extrakční směs obsahující 5 % pentan-1-olu, 10 % vody a 85 % ethanolu. Třístupňovou vsádkovou extrakcí bylo z kontaminované zeminy odstraněno 96,3 % PAH z celkového množství PAH získaného ze zeminy Soxhletovou extrakcí¹¹. Dále byly provedeny experimenty, při nichž byl ze zeminy odstraňován pentachlorfenol (PCP) extrakční směsí ethanolu a vody v různých poměrech. Celkově nejlepší výsledky byly dosaženy při použití roztoku s obsahem 50 % ethanolu. Účinnost 50 % ethanolu byla pro umělé i reálné vzorky srovnatelná s účinností Soxhletovy extrakce a ultrazvukové lázně. Extrakční roztok odstranil ze zemin kromě PCP i značný podíl uhlovodíků dehtového původu¹².

Regenerace extrakčního činidla

Důležitým krokem při praní/promývání zemin je, zejména z ekonomických důvodů, regenerace extrakčního činidla. Pro alkoholy obecně se nabízí především možnost destilace, rektifikace¹³, nebo membránové separace¹⁴.

Na základě literárních informací lze usoudit, že extrakce roztoky alkoholů může nalézt využití zejména při dekontaminaci velmi silně znečištěných materiálů, kde využití tenzidů většinou není dostatečně účinné a zbývají pouze velmi nákladné termické metody. Cílem této studie je proto ověřit účinnost vybraných alkoholů (ethanolu a propan-2-olu) při odstraňování PCB a látek dehtového a ropného původu z velmi silně kontaminovaných zemin a odhadnout základní technicko-ekonomické parametry technologie, které budou moci být podkladem pro případné další podrobnější studie.

Experimentální část

Použité materiály

Pro účely experimentů byly používány 2 vzorky zemin. V prvním případě se jednalo o zeminu kontaminovanou PCB pocházející z lokality bývalé obalovny živičných směsí v Milevsku, v druhém případě pak o zeminu kontaminovanou dehtovými a ropnými látkami odebranou

ze dna ropné laguny ze skládky tekutých odpadů Růžodol.

Oba vzorky byly upraveny sušením po dobu 1 týdne v digestoři, jemným rozmělněním větších hrudek materiálu a poté sítováním přes síto s velikostí ok 1 mm, přičemž pro experimenty byla použita homogenizovaná podsítná frakce. V zeminách byl níže uvedeným postupem stanoven obsah PCB, resp. nepolárních extrahovatelných látek (NEL), který byl považován za vstupní kontaminaci pro laboratorní experimenty (analyzovány byly vždy 4 vzorky odebrané z připravené homogenizované zeminy). U vzorků byl také stanoven obsah sušiny při teplotě 105 °C (4 h sušení).

Použité analytické metody

Před provedením vlastních experimentů bylo nutné ověřit správnost některých kroků v postupech analýz, jelikož prováděné analytické úlohy byly poněkud netypické (zejména pokud se jednalo o stanovení PCB a NEL v alkoholových extraktech zemin).

Ověření některých kroků úpravy vzorků

Při extrakci zeminy alkoholem přejde do extraktu spolu se sledovaným kontaminantem i řada polárních látek. Z odparku extraktu rozpuštěného v hexanu (v případě PCB), resp. v tetrachlormethanu (CCl₄) (v případě NEL) je třeba polární látky odstranit promytím přes vrstvu Florisilu. V případě PCB bylo zjišťováno, zda se během čištění extraktů přes vrstvu Florisilu PCB zachycují a zda je tedy nutné Florisil po prolití extraktu promývat čistým hexanem.

V případě kontaminace NEL byl proveden experiment, při kterém byl vzorek zeminy z Růžodolu extrahován propan-2-olem, jehož část byla odfiltrována a ponechána za laboratorní teploty k odpaření. K odparku byl přidán CCl₄, extrakt byl na Florisilu rozdělen na polární a nepolární část (nejprve byl nadávkován extrakt a následně vrstva promyta čistým CCl₄, tak byl získán nepolární podíl, polární podíl byl potom eluován směsí aceton/ethanol a po odpaření těchto rozpouštědel rovněž rozpuštěn v CCl₄), obě části byly poté analyzovány a výsledek byl porovnán s celkovým stanoveným obsahem látek obsažených v extraktu CCl₄ bez čištění. Účelem experimentu bylo zjistit, zda lze extrakt na Florisilu kvantitativně rozdělit na nepolární a polární podíl.

Při analýzách obsahu kontaminantů v alkoholových extraktech bylo vždy nejprve nutné alkohol odpařit, jelikož přímá extrakce hexanem, resp. CCl₄ (jako v případě vodných vzorků) je nemožná z důvodu mísitelnosti hexanu a CCl₄ a používaných alkoholů. Odpařování vždy probíhalo za laboratorní teploty a bylo podpořeno vhnáním slabého proudu vzduchu do Erlenmayerovy baňky s extraktem. Byly provedeny experimenty ověřující, zda během odpařování alkoholu nedochází i k významnějšímu odpařování kontaminantu.

Analytické postupy pro stanovení kontaminantů v kapalných a tuhých vzorcích

Dále jsou v textu uvedeny analytické postupy, které byly používány ke stanovení obsahu kontaminantů buď v alkoholových extraktech, nebo v zemině. Stanovení obsahu PCB v zemině probíhalo následovně: Do patronky Soxhletova mikroextraktoru bylo naváženo ~ 1,5 g vzorku. Na vzorek bylo nanášeno cca 10 ml čistého hexanu. Extrakce probíhala při teplotě 80 °C po dobu 4 h. Po ukončení extrakce byl zbytek hexanu v patronce vytlačen do zkumavky a objem ve zkumavce byl doplněn přesně na 10 ml. 1 ml extraktu byl odpipetován na vrstvu Florisilu (aktivovaného 0,5 h při 550 °C) a dále byl Florisil promýván po malých (cca 1 ml) dávkách asi 9 ml čistého hexanu. Hexan prošlý Florisilem byl jímán do ampulky a jeho přesné množství bylo zjištěno vážením. Analýza PCB probíhala na plynovém chromatografu GC/ECD HP 5890. Jako standard byla použita směs šesti indikačních kongenerů PCB (28, 52, 101, 138, 153, 180) o koncentraci každého kongeneru 0,05 mg l⁻¹.

Pro stanovení NEL v zemině byl používán následující postup. Do Erlenmayerovy baňky bylo odebráno ~ 5 g zeminy a přidáno 20 ml čistého hexanu. Vzorek byl extrahován po dobu 2 h na třepačce a na 5 min byl vložen do ultrazvukové lázně. Poté bylo provedeno čištění na Florisilu stejným způsobem jako v případě PCB, pouze jako rozpouštědlo byl použit CCl₄. Obsah NEL v extraktu byl určen IČ spektrometrií na přístroji Nicolet Impact 400.

Pro stanovení obsahu PCB a NEL v alkoholových extraktech zemin byl používán následující postup. Skleněnou stříkačkou bylo odebráno přibližně 8 ml extraktu a přefiltrováno přes teflonový (nebo v případě extraktů s obsahem vody vyšším než 50 obj.% přes CME) membránový nástavcový filtr do Erlenmayerovy baňky. Do baňky byl pomocí malého čerpadla vhnán vzduch, aby bylo urychleno odpařování alkoholu. Po odpaření veškerého alkoholu bylo k odparku přidáno 10 ml hexanu, resp. CCl₄. Vzniklý roztok byl umístěn na 2 h na třepačku a na 5 min do ultrazvukové lázně. Dále bylo s extraktem nakládáno stejně jako v případě stanovování obsahu PCB, resp. NEL v zemině.

Vsádkové vyluhovací experimenty

Pro prvotní ověření účinnosti propan-2-olu a ethanolu při vyluhování organických kontaminantů ze znečištěných zemin byl proveden experiment, při kterém bylo do Erlenmayerovy baňky naváženo vždy 5–10 g zeminy. Ke vzorku bylo přidáno 25, 50, nebo 75 ml propan-2-olu, resp. ethanolu. Vyluhování probíhalo na třepačce po dobu 24 h. Následovala analýza obsahu kontaminantu v extraktu a výpočet účinnosti extrakce.

Dále byl ověřován vliv obsahu vody v alkoholech na účinnost extrakce. Byly připraveny roztoky alkoholu o objemové koncentraci vody 5 %, 15 %, 30 %, 50 % a 70 %. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo cca 5–10 g zeminy a přidáno 50 ml jednoho z připravených roztoků

alkoholů. Vyluhování se provádělo na třepačce po dobu 24 h a následovala analýza obsahu kontaminantu v extraktu.

Při sledování kinetiky procesu bylo do Erlenmayerovy baňky naváženo přibližně 5–10 g vzorku a přidáno 75 ml propan-2-olu. Baňka se suspenzí byla umístěna na třepačku a v časových intervalech přibližně 10, 20, 30 a 60 min bylo odebíráno stříkačkou cca 0,5 ml extraktu, ve kterém byl stanoven obsah kontaminantu.

Promývání vrstvy zeminy

Experimenty byla sledována prakticky dosažitelná účinnost odstranění kontaminantu během kontinuálního promývání vrstvy zeminy. Pro provedení experimentů byl zvolen propan-2-ol. Před zahájením promývání byla stanovena sypaná hustota a celková porozita zeminy. Promývání zeminy bylo prováděno ve skleněné kolonce o vnitřním průměru 2,5 cm, opatřené fritou. Objemy propan-2-olu, kterými byla zemina promývána, odpovídaly 1, 3 a 5 objemům pórů. Výška vrstvy zeminy byla zvolena 3 cm. Na dno kolonky byla nasypána asi 0,5 cm vrstva mineralizovaného a promytého písku. Do kádinky bylo naváženo tolik zeminy, aby v kolonce tvořila 3 cm vrstvu. Při plnění kolonky byla zemina vždy vnášena pod vrstvu propan-2-olu. Tímto postupem plnění byl minimalizován vznik trhlin a bublin ve vrstvě a zároveň bylo potlačeno rozplavení zeminy dle zrnitostních frakcí. Hladina propan-2-olu se ustálila těsně nad hladinou zeminy a množství propan-2-olu v kolonce tedy přibližně odpovídalo jednomu objemu pórů. Následovalo 30minutové ustavování rovnováhy (30 min se ukázalo jako doba dostatečná k ustavení rovnováhy). Poté byl otevřen teflonový ventil a propan-2-ol začal kolonkou protékat. Postupně byly přidávány další objemy pórů propan-2-olu. Po zasáknutí veškerého propan-2-olu do zeminy byl do kolonky vnesen 1 objem pórů destilované vody. Ventil byl uzavřen právě tehdy, když se veškerá voda zasákla do zeminy. V Erlenmayerově baňce pod kolonkou by tak měl být použitý propan-2-ol o objemu odpovídajícímu počtu použitých objemů pórů. Přesné množství propan-2-olu bylo zjištěno zvážením vyluhu. Alkoholový výluh byl dále zpracován dle výše uvedeného postupu. Promytá zemina byla převedena na Petriho misku, homogenizována a poté sušena na vzduchu po dobu 6 dní. Následně byla rozmělněna a dokonale promíchána. Obsah kontaminantu byl stanoven stejným způsobem jako v původní zemině.

Výsledky a diskuse

Použitá materiály

Podíl sušiny v zemině z lokality Milevsko činil 99,28 %. Pro účely experimentů byla zemina považována za 100% suchou. Byla provedena 4 stanovení a koncentrace PCB v zemině byla stanovena 395 ± 18 mg kg⁻¹. Podíl sušiny v zemině z lokality Růžodol činil 96,23 %. Byla

provedena 4 stanovení a koncentrace NEL byla stanovena $57,5 \pm 2,1 \text{ g kg}^{-1}$ sušiny.

Ověření analytických metod

Z experimentů vyplynulo, že při čištění hexanových extraktů s obsahem PCB přes vrstvu Florisilu je nutné vrstvu promývat čistým hexanem, neboť PCB se v ní v malé míře sorbuje. Zároveň bylo zjištěno, že promývání hexanem o desetinásobném objemu naneseného extraktu s PCB je dostačující, neboť po takovémto čištění je množství PCB v čištěném extraktu velmi blízké množství dávkovanému do vrstvy.

Experimentem ověřujícím rozdělení tetrachlormethanového výluhu na polární a nepolární část bylo zjištěno, že výsledek získaný součtem koncentrací polárních a nepolárních látek je blízký výsledku získanému změřením všech organických látek v nečištěném výluhu. Rozdíl mezi nimi činí necelých 10 %. U velmi silně kontaminovaných materiálů, jako je použitá zemina z Růžodolu, lze tento výsledek považovat za velmi uspokojivý. Experiment prokázal, že tetrachlormethanový extrakt lze na Florisilu kvantitativně zbavit polárních látek a vyhodnocovat parametr NEL.

Experimenty, které ověřovaly, zda během odpařování alkoholu nedochází také k odpařování kontaminantu, bylo zjištěno, že při odpařování alkoholu z extraktu s obsahem PCB došlo ke snížení koncentrace PCB oproti očekávané koncentraci o 12 % a u extraktu s obsahem NEL o 24 %. U takto komplikovaného analytického postupu nelze z výsledku jednoznačně usuzovat na případné mírné odpařování PCB a NEL ze vzorku, protože rozdíl mohl být důsledkem celé řady dílčích operací (extrakce odparku, ředění, vlastní analýza). Teoreticky lze předpokládat, že za daných podmínek by k odpařování kontaminantů docházet nemělo. Rozdíl navíc nevybočuje z běžných rozptylů výsledků obdobných typů analýz, a proto lze považovat navržený analytický postup za vhodný pro účely této práce, jejímž cílem je pouze základní posouzení účinnosti extrakce alkoholy při dekontaminaci velmi silně kontaminovaných zemín. Důležitým faktem zůstává, že tento typ analýz je používán pro stanovení kontaminantu pouze v alkoholových extraktech, a proto pokud by negativní chyba způsobená odpařováním existovala, zjištěná účinnost vyloužení kontaminantů do alkoholů by byla nižší než účinnost skutečná, což zjištěné výsledky nedegraduje.

Vsádkové experimenty

Vsádkovými experimenty bylo zjištěno, že účinnost vyluhování nezávisí na extrakčním poměru l/s (objem extrakčního činidla ku hmotnosti vzorku). Při použití propan-2-olu k vyluhování PCB ze zeminy přešlo ze zeminy do propan-2-olu 69 % PCB, při použití ethanolu to bylo 79 %. Pro vyluhování PCB byl tedy účinnější ethanol. Při vyluhování NEL přešlo ze zeminy do propan-2-olu 82 % NEL a do ethanolu 67 %. V tomto případě byl tedy účinnější propan-2-ol, avšak pokud uvažujeme všechny možné vlivy

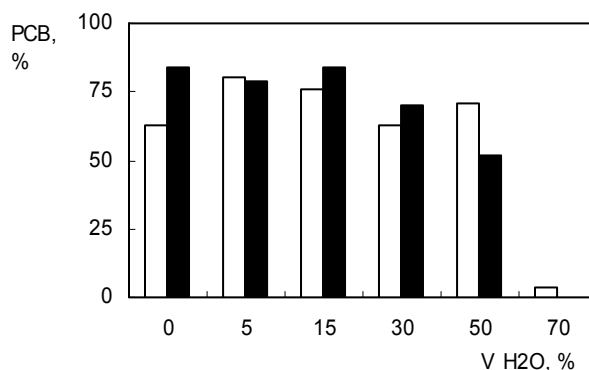
na tento výsledek (nehomogenita vzorku, složitost analýz atd.), nejsou rozdíly v zjištěných účinnostech obou alkoholů příliš významné.

Vliv vody na účinnost extrakce má zásadní význam především z toho důvodu, že v praxi se často vyskytují kontaminované zeminy s nezanedbatelnou vlhkostí. Při jejich vsádkovém vyluhování by pak docházelo k ředění extrakčního činidla a tím pravděpodobně i ke snížení účinnosti extrakce. Pokud by se ukázalo, že do určité koncentrace voda nesnižuje účinnost extrakce, mohlo by to mít pozitivní vliv na ekonomickou stránku dekontaminace, jelikož by bylo možné používat alkohol ředěný vodou. Rovněž by bylo prokázáno, že vlhkost zeminy nesnižuje účinnost procesu. Z těchto důvodů bylo vhodné vyzkoušet, jaký vliv má množství vody v extrakčním činidle na účinnost extrakce.

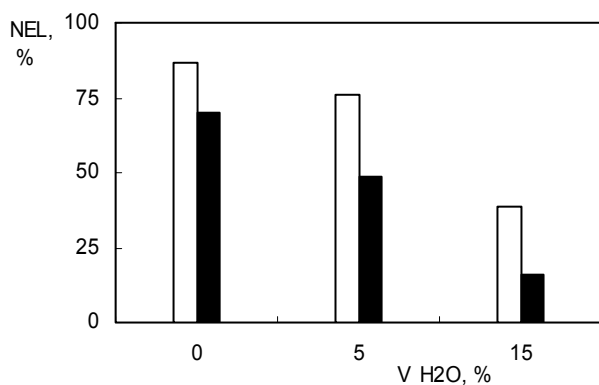
Experimenty bylo zjištěno, že vliv vody obsažené v extrakčním činidle na účinnost extrakce byl pro PCB a NEL jednoznačně odlišný.

Z obr. 1 je patrné, že při vyluhování PCB propan-2-olem voda v alkoholu až do 50 obj.% výrazně nesnižovala účinnost. Evidentní je prudký sestup účinnosti roztoku alkoholu s obsahem 70 obj.% vody. Pro ethanol klesá účinnost již při 50 obj.% vody, pro 70 obj.% vody se účinnost extrakce blíží nule. Snížující se účinnost závisí na zvyšující se polaritě extrakčního činidla. Příčina poklesu účinnosti pravděpodobně souvisí i s konkrétním způsobem a silou navázání PCB v zemině, s typem zeminy a se stářím kontaminace. Souhrnně lze usoudit, že 40 až 50 obj.% vody v alkoholu by nemělo výrazně snižovat účinnost extrakce PCB ze zeminy.

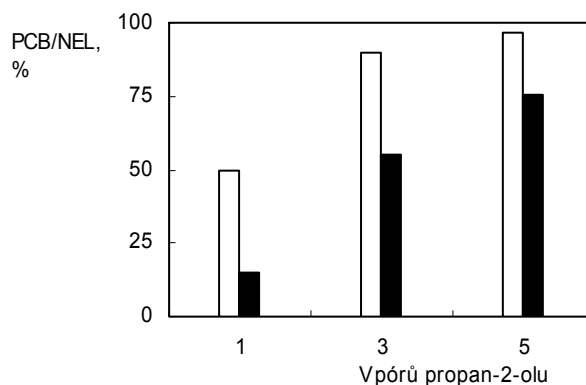
Jak je patrné z obr. 2, účinnost propan-2-olu při vyluhování NEL významně klesla již při 15 obj.% vody v extrakčním činidle a účinnost ethanolu se výrazně snížila dokonce již při obsahu 5 obj.% vody. Vzhledem k těmto výsledkům nebyly již prováděny vyluhovací experimenty s vyšším podílem vody v alkoholu, neboť u nich lze před-



Obr. 1. Účinnost vyluhování PCB v závislosti na obsahu vody v alkoholu, osa x: objemové % vody v alkoholu, osa y: % PCB přešlé do alkoholu, □propan-2-ol, ■ethanol



Obr. 2. Účinnost vyluhování NEL v závislosti na obsahu vody v alkoholu; □propan-2-ol, ■ethanol



Obr. 3. Účinnost propan-2-olu při promývání zeminy, osa x: počet objemů pórů propan-2-olu použitých na promývání, osa y: odstraněná část kontaminantu, %; □PCB, ■NEL

pokládat velice nízké účinnosti. Při vyluhování ropných a dehtových vysokovroucích látek ze zemin tedy vlivem přidavku vody do extrakčního činidla dochází k mnohem výraznějšímu snížení účinnosti než při vyluhování PCB alkoholy se stejným podílem vody. Tento rozdíl zřejmě rovněž souvisí s typem kontaminace, resp. i se způsobem provedení analýzy (vyhodnocuje se parametr NEL, což jsou nepolární extrahovatelné látky). Sledované vysokovroucí látky ropného a dehtového původu mají méně polární charakter než PCB, a tudíž nejsou schopné přejít do alkoholu s vyšším obsahem vody (tzn. do polárnějšího rozpouštědla).

Jedním z důležitých parametrů vyluhování kontaminantu ze zemin je doba ustavení rovnováhy mezi fázemi. Z výsledků kinetických experimentů s propan-2-olem vyplynulo, že k dosažení rovnováhy mezi fázemi dochází již asi po 30 min kontaktu. V případě ethanolu lze očekávat obdobný výsledek, jelikož oba alkoholy mají velmi podobné vlastnosti.

Promývání vrstvy zeminy

Cílem experimentů bylo ověřit účinnost promývání vrstvy zeminy různými objemy pórů rozpouštědla. Ačkoliv byly experimenty provedeny jen s propan-2-olem, lze očekávat, že výsledky tohoto typu budou pro oba alkoholy srovnatelné, jelikož souvisí především s povahou a formou vlastní kontaminace.

U obou zemin byla zjištěna sypná hustota a pórovitost

a byl vypočítán průtok, při kterém je doba zdržení roztoku v koloně 30 min. Data shrnuje tabulka I.

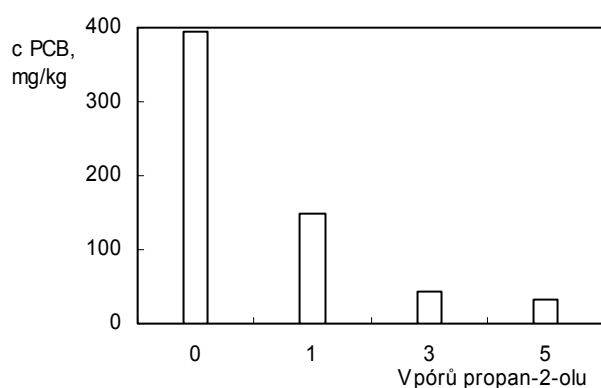
Účinnost promývání obou zemin 1, 3 a 5 objemy pórů propan-2-olu je graficky vyhodnocena na obr. 3. Nejvyšší účinnosti bylo dosaženo při promývání zeminy s obsahem PCB 5 objemy pórů propan-2-olu, tímto způsobem bylo odstraněno 96 % původního obsahu PCB v zemině. Ze závislosti účinnosti promývání na objemu alkoholu lze v tomto případě usuzovat, že se zvětšováním objemu alkoholu se již účinnost bude zvyšovat minimálně. Dále lze uvažovat, že se při promývání 3 objemy pórů propan-2-olu uvolnily slaběji vázané PCB a při použití většího objemu propan-2-olu se začaly uvolňovat i silněji vázané podíly PCB.

U zemin s obsahem vysokovroucích látek ropného a dehtového původu bylo dosaženo maximální účinnosti při promývání 5 objemy pórů propan-2-olu, ze zemin tak bylo odstraněno 75 % původní kontaminace. Účinnost promývání byla tedy výrazně vyšší u zemin s PCB (viz obr. 3). Při promývání zeminy s obsahem NEL 1 objemem pórů propan-2-olu byla účinnost velice nízká. Tento fakt může být způsoben vysokou koncentrací kontaminantu v zemině, která je v tomto případě o dva řády vyšší než v případě zeminy s obsahem PCB, a účinnost promývání zde proto může narážet i na rozpustnost NEL v propan-2-olu. Vzhledem k vysokému rozdílu účinností mezi promýváním 3 a 5 objemy pórů propan-2-olu lze předpokládat, že účinnost by se při použití většího objemu alkoholu dále zvyšovala.

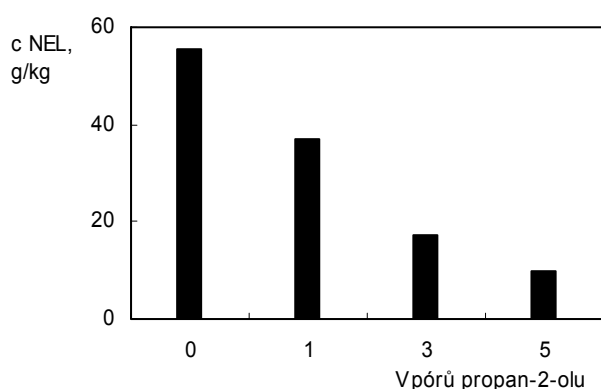
Tabulka I

Vlastnosti zemin a průtok pro dobu zdržení 30 minut

Zemina kontaminovaná	Sypná hustota [g l ⁻¹]	Pórovitost [%]	1 $V_{\text{pórů}}$ v 3cm vrstvě vzorku [ml]	Vypočítaný průtok [ml min ⁻¹]
PCB	1178	52	7,660	0,255
NEL	900	36	5,303	0,177



Obr. 4. Koncentrace PCB v zemině před a po promývání, osa x: počet objemů pórů propan-2-olu použitých na promývání, osa y: koncentrace PCB v zemině, mg kg⁻¹



Obr. 5. Koncentrace NEL v zemině před a po promývání, osa x: počet objemů pórů propan-2-olu použitých na promývání, osa y: koncentrace NEL v zemině, g kg⁻¹;

Při promývání 5 objemy pórů propan-2-olu byla koncentrace PCB v zemině snížena z původních 395 mg kg⁻¹ dokonce na 32 mg kg⁻¹ (viz obr. 4) a koncentrace NEL z 55 g kg⁻¹ na 10 mg kg⁻¹ (viz obr. 5).

Orientační vyhodnocení technologických parametrů

Z experimentů a získaných výsledků lze provést prvotní orientační vyhodnocení technologických parametrů procesu. Pro praktické využití je bezesporu vhodnější metoda promývání než metoda vsádkového vyluhování. Předností tohoto uspořádání je nižší spotřeba alkoholu, vyšší účinnost dekontaminace a snadnější separace alkoholu a zeminy.

Při návrhu technologie hraje významnou roli vlhkost kontaminované zeminy, neboť během promývání dochází k vymývání vody ze zeminy, alkohol se tak ředí a od určitého naředění se snižuje jeho účinnost. Aby bylo možné

alkohol recyklovat, je nutné z něj odstranit přebytečnou vodu a kontaminant. Právě regenerace alkoholu je jedním z klíčových kroků dekontaminace, neboť na ní výrazně závisí celkové náklady. Výběr typu regenerace záleží na konkrétních podmínkách.

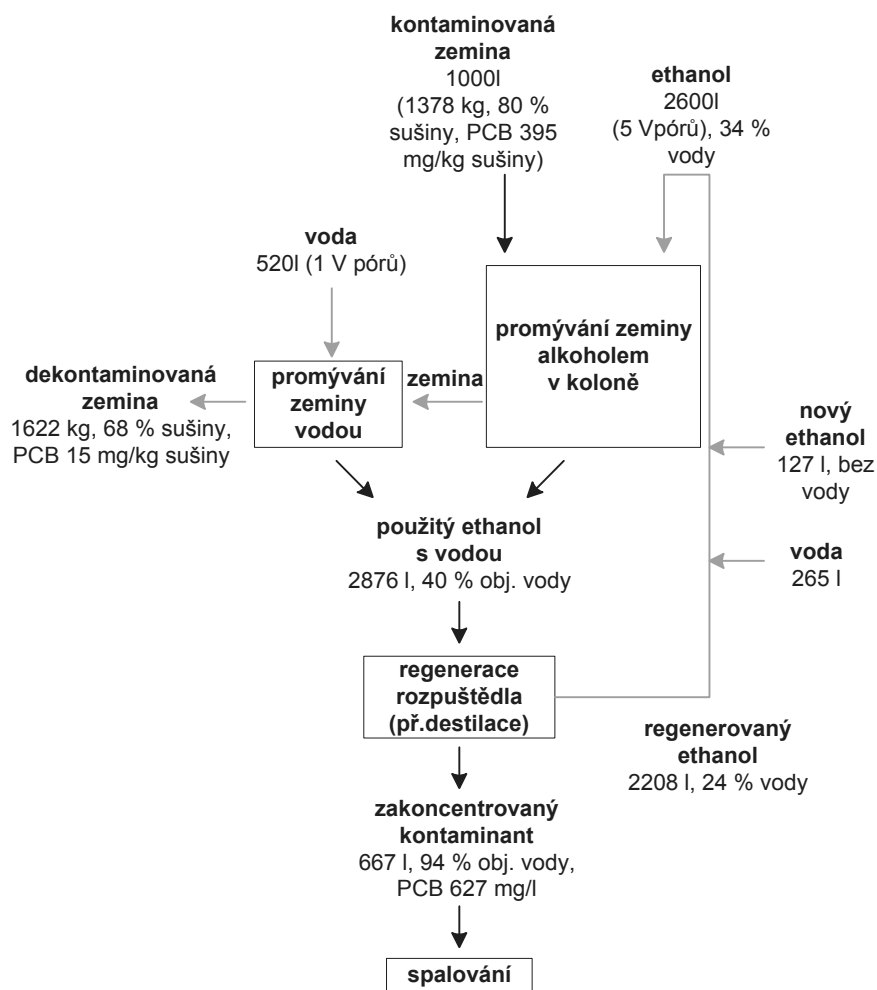
Při volbě typu alkoholu je důležitá cena, účinnost a možnost regenerace. Cena denaturovaného ethanolu se pohybuje kolem 29,5 Kč l⁻¹ bez DPH a cena propan-2-olu kolem 28,6 Kč l⁻¹ bez DPH. Způsob regenerace závisí na typu a množství alkoholu, druhu kontaminace a finančních možnostech. Pro ethanol je vhodný způsob regenerace destilace či rektifikace, při níž dochází jak k odstranění kontaminantu z výluhu, tak ke snížení obsahu vody v alkoholovém rozpouštědle. Při vsádkové jednostupňové destilaci je obohacování destilátu těkavější složkou (alkoholem) omezeno rovnováhou a záleží na koncentraci vody v ethanolu.

Pro prvotní orientační vyhodnocení dekontaminační technologie bylo vybráno promývání zeminy s obsahem PCB ethanolom, který je po použití regenerován vsádkovou jednostupňovou destilací. Schéma dekontaminace je zachyceno na obr. 6.

Promývaná zemina má, stejně jako zemina s obsahem PCB používaná k laboratorním experimentům, porozitu 52 %, sypanou hustotu 1,178 kg l⁻¹ a obsah PCB 395 mg kg⁻¹. Podíl sušiny byl zvolen 80 %, neboť tato hodnota lépe odpovídá podílu sušiny v reálných kontaminovaných zemínách. Zemina o hmotnosti 1378 kg je promývána 5 objemy pórů ethanolu (2600 l) a následně 1 objemem pórů vody (520 l).

Jelikož kolonové experimenty byly provedeny s propan-2-olem, je třeba účinnost ethanolu při promývání odhadnout. Při vsádkových experimentech byla pro zeminu s PCB ve většině případů zjištěna pro ethanol vyšší účinnost než pro propan-2-ol, a proto lze předpokládat, že i v kolonových experimentech bude vztah mezi účinnostmi podobný. Pro účel výpočtu byla použita stejná účinnost jakou měl čistý propan-2-ol při kolonových experimentech při použití 5 objemů pórů extrakčního činidla (předpokládá se tedy odstranění 96 % PCB). Pro promývání se uvažuje již ethanol s obsahem vody 34 % (tato hodnota vznikla jednoduchým odhadem během výpočtu bilance jednoho promývacího cyklu tak, aby obsah vody v použitém alkoholu činil 40 %, což byla vstupní hodnota pro budoucí výpočet destilace). Obsah vody 30–40 % ještě nemá dopad na účinnost ethanolu, a proto byl podobný obsah vody ve vstupním ethanolu považován za přijatelný a ekonomicky výhodný. Použitý ethanol o objemu 2876 l již obsahuje 40 % vody, neboť do něj přešla vlhkost ze zeminy.

Jako příklad možného způsobu regenerace rozpouštědla byla v tomto případě použita destilace. Cílem regenerace by na základě úvah mělo být jednak minimalizovat objem zbytku, jednak maximalizovat výtěžek ethanolu. Jako vstupní údaj pro výpočet proto byla uvažována koncentrace ethanolu ve zbytku pouze 5 hm.%. Výpočtem bylo zjištěno, že destilací 1 m³ směsi (o složení 60 obj.% ethanolu a 40 obj.% vody) by bylo získáno 768 l destilátu



Obr. 6. Celkové schéma dekontaminační technologie pro případ zeminy s obsahem PCB promývané 5 objemy pórů ethanolu

s podílem ethanolu 76 %. Destilační zbytek o objemu 232 l by obsahoval 6 obj.% ethanolu a zkoncentrované PCB. Regenerovaný ethanol (76 %) by byl znovu použitelný pro promývání zeminy. Jelikož by se při regeneraci množství ethanolu snížilo, bylo by nutné pro další stupeň promývání objem doplnit na původní množství použité pro promývání zeminy (2600 l). Pro dosažení vstupního složení promývacího roztoku ethanolu se uvažuje doplnění objemu směsi ethanolu (127 l) a vody (265 l).

Součástí výpočtu destilace byl i odhad spotřeby energie ve vařáku. Bylo zjištěno, že by se spotřebovalo 276 kWh m^{-3} a náklady na zpracování směsi by činily přibližně 442 Kč m^{-3} .

Odhad uvažovaných provozních nákladů, spotřeb činidel a produkce odpadních vod shrnuje tab. II. Pro odhad těchto parametrů byla použita cena lihu $29,5 \text{ Kč l}^{-1}$, vody 49 Kč m^{-3} a energie $1,6 \text{ Kč kWh}^{-1}$. Z tab. II plyne, že i po zahrnutí dalších nákladů, které zatím nebyly uvažová-

Tabulka II

Odhad spotřeby činidel a energie na dekontaminaci 1 t zeminy za použití destilace pro regeneraci ethanolu

	Spotřeba	Cena [Kč t^{-1}]
Voda	570 l t^{-1}	28
Ethanol	92 l t^{-1}	2709
Energie	576 kWh t^{-1}	922
Produkce OV	484 l t^{-1}	–

ny, by cena za dekontaminaci 1 t zeminy neměla přesáhnout cca 10 000 Kč (včetně určité rezervy).

Výpočet rektifikace byl proveden pro dvě různé hodnoty poměru zpětného toku. V prvním případě byl zvolen poměr zpětného toku 1,2 násobek minimálního refluxu

Tabulka III

Odhad spotřeby činidel a energie na dekontaminaci 1 t zeminy za použití rektifikace ($R=3 \cdot R_{\min}$) pro regeneraci ethanolu

	Spotřeba	Cena [Kč t ⁻¹]
Voda	802 l t ⁻¹	39
Ethanol	411 l t ⁻¹	12 110
Energie	919 kWh t ⁻¹	1471
Produkce OV	1035 l t ⁻¹	

(R_{\min}) (tento násobek je v literatuře¹⁵ uveden jako optimální). Pro rektifikaci byl zvolen objemový tok nástřiku 1000 l h⁻¹ (32,4 kmol h⁻¹) a molární tok destilátu 10 kmol h⁻¹. Cílem bylo získat destilát s 93 % objemovým podílem ethanolu. Grafickým řešením byla získána hodnota R_{\min} 0,86 a z ní pak hodnota poměru zpětného toku 1,03 ($R=1,2 \cdot R_{\min}$). Rektifikační kolona by při tomto zadání měla mít 27 pater (při předpokládané 100% Murphreeově účinnosti patra). Z nástřikové směsi (60 obj.% ethanol, 40 obj.% voda) by bylo získáno 504 l destilátu s 93% objemovým podílem ethanolu a 496 l zbytku s 27 % ethanolu. Na rektifikaci by bylo spotřebováno 276 kWh energie.

Pro snížení počtu pater rektifikační kolony byl proveden ještě jeden výpočet, kde byla hodnota poměru zpětného toku zvolena jako trojnásobek R_{\min} . Zbytek zadání zůstal stejný jako v předchozím výpočtu. V tomto případě by poměr zpětného toku měl hodnotu 2,58 ($R=3 \cdot R_{\min}$) a počet potřebných pater by se snížil na 8 (při předpokládané 100% Murphreeově účinnosti patra). Zvýšila by se ovšem spotřeba energie na 441 kWh. Spotřeba činidel, energie, odhad nákladů a produkce odpadních vod, pro případ rektifikace, kdy $R=3 \cdot R_{\min}$, je uvedena v tab. III.

Jak plyne z tab. II a tab. III, v případě uvažované zeminy kontaminované PCB by bylo za zvolených podmínek výhodnější použít pro regeneraci ethanolu destilaci (celkové náklady za vodu, ethanol a energii činí 3659 Kč na 1 t zeminy) než rektifikaci (celkové náklady za vodu, ethanol a energii činí 13 620 Kč na 1 t zeminy). Pro konkrétní technologii by však bylo potřebné proces destilace i rektifikace optimalizovat.

Další z možností regenerace rozpouštědla je filtrace přes membrány. Při použití jedné membrány by bylo možné oddělit kontaminant od alkoholu s vodou. Výhodnější by však bylo použití 2 membrán, přičemž na jedné by se oddělil kontaminant od alkoholového roztoku a na druhé by se pak oddělila voda od alkoholu a byl by tak získán čistší a pro promývání účinnější alkohol. Např. pro propan-2-ol by bylo vhodnější upřednostnit membrány před destilací či rektifikací, neboť tvoří s vodou azeotropickou směs již v bodě, kdy je koncentrace vody v propan-2-olu 30 % (cit.¹³), a běžnou destilací tedy není možné získat propan-2-ol s obsahem vody menším než 30 %.

Uvažovat lze i o kombinaci různých výše uvedených způsobů regenerace. Konkrétní řešení technologie by však

muselo být výsledkem mnohem detailnějšího a komplexnějšího vyhodnocení. Z tab. II a III plyne nezanedbatelná produkce odpadních vod s vysokým obsahem PCB (v tomto konkrétním případě 484 l t⁻¹ při použití destilace a 1035 l t⁻¹ při použití rektifikace). Membránová separace by tudíž mohla sloužit např. k dalšímu snížení produkce odpadních vod, které by bylo nutné odstranit náročnějšími metodami (např. spalováním).

Tato práce byla realizována s pomocí výzkumného záměru MŠMT 6046137308.

Seznam symbolů

CME	směsný ester celulosy (celulose mixed ester)
NEL	nepolární extrahovatelné látky
P_{ow}	rozdělovací koeficient oktanol–voda
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PCE	tetrachlorethylen
PCP	pentachlorfenol
POP	perzistentní organické polutanty

LITERATURA

- Šváb M., Müllerová M., Beneš P.: *Informace o látkách zařazených do Integrovaného registru znečišťování*, Ministerstvo životního prostředí, http://www.irz.cz/latky/polychlorovane_bifen, staženo 9. února 2007.
- Harte J., Holdren C., Schneider R., Shirley C.: *Toxics A to Z, A Guide to Everyday Pollution Hazards*. University of California Press 1991.
- Kukačka J., Urban O., Hlásenský I., Šváb M.: *10th Conference of Environmental and mineral processing, Ostrava, VŠB-TU, 22.-24. června 2006*, (Fečko Peter), str. 263.
- Otten A., Alphenaar A., Pijls C., Spuij F., Wit H.: *In Situ Soil Remediation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1997.
- Treatment Technologies for site Cleanup: Annual Status Report*, 10. vyd. EPA-542-R-01-004.
- Müllerová M., Šváb M., Santos M. M.: Chem. Listy 101, 509 (2007).
- Šváb M.: *Disertační práce*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2004.
- Richardson M. L., Gangolli S.: *The Dictionary of Substances and their Effects*, Vol. 4, str. 288. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1994.
- Richardson M. L., Gangolli S.: *The Dictionary of Substances and their Effects*, Vol. 5, str. 153. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1994.
- Ladaa T. I., Lee C. M., Coates J. T., Falta Jr. R. W.: *Chemosphere* 44, 1137 (2001).
- Khodadoust A. P., Bagchi R., Suidan M. T., Brenner R. C., Sellers N. G.: *J. Hazard Mater.* B80, 159 (2000).
- Khodadoust A. P., Suidan M. T., Acheson C. M.,

- Brenner R.C.: *Chemosphere* 38, 2681 (1999).
13. Gmehling J., Onken U., Arlt W.: *Vapor-Liquid Equilibrium Data Collection 1a, Aqueous-Organic Systems (Supplement 1)*. Dechem, Frankfurt am Main 1998.
 14. Oppelt E. T.: *Membrane Treatment of Wood Preserving Site Groundwater by SBP Technologies, Inc.*, Cincinnati (1993), EPA/540/AR-92/014.
 15. Míka V., Neužil L.: *Chemické inženýrství II*. VŠCHT, Praha 1993.

T. Nováková^a, M. Šváb^{a,b}, and M. Müllerová^a
(^a *Department of Environmental Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b *Dekonta Corp., Dřetovice*): **Application of Alcohols in Leaching of Polluted Solid Matrixes**

Ethanol and propan-2-ol were used to verify the efficiency of removing persistent organic pollutants from real soil contaminated with PCB (395 mg kg⁻¹) or with oil and tar substances (57,5 g kg⁻¹). In batch extraction 65-90 % contaminants were removed with both solvents. An influence of water content in solvent was examined in a series of experiments. The presence of water in the solvents decreases the extraction efficiency more for oil and tar substances than for PCB. 96 % of PCB and 75 % of oil and tar substances were removed from soil by washing in a column, using five pore volumes of propan-2-ol. Distillation and membrane separation were the methods considered for solvent recovery.

TRIBOTECHNICKÁ DIAGNOSTIKA V PREVÁDZKE POUŽITÝCH OLEJOV II. METÓDY HODNOTENIA FYZIKÁLNO-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ OLEJOV

JANKA MIHALČOVÁ a HEKMAT AL HAKIM

*Fakulta výrobných technológií Technickej Univerzity
v Košiciach so sídlom v Prešove, Štúrova 31, 080 01 Prešov,
Slovensko*

janka.mihalcova@tuke.sk, hekmat.alhakim@tuke.sk

Došlo 3.3.08, prijaté 12.9.08.

Kľúčové slová: mazacie oleje, lubrikanty

Úvod

Využívanie metód tribotechnickej diagnostiky zabezpečuje zvýšenie bezpečnosti a spoľahlivosti prevádzky, je prevenciou vzniku porúch a prostriedkom určenia technického stavu strojov. Je dokázané, že problémy s prevádzkou strojov sú zapríčinené z 85 % znečisteným olejom a zo 70 % produktmi starnutia v mazive¹⁻⁴.

Mazacie oleje sú počas svojho pôsobenia vystavené vysokej teplote, tlaku a prieniku nežiadúcich látok z vonkajšieho prostredia, čiže vnútornej a vonkajšej kontaminácii. Tým dochádza k vzniku degradačných produktov v oleji, jeho kontaminácii a úbytku aditív. Tieto vplyvy narúšajú funkčné vlastnosti olejov a materiálov obmývaných olejom. Sledovaním vlastností mazacích olejov počas ich použitia v prevádzke stroja sa zisťuje životnosť oleja a jeho schopnosť chrániť stroj. Súčasne je možné cez vlastnosti oleja určiť aj technický stav tohoto stroja^{3,4}. K metódam, ktorými sa v tribotechnickom laboratóriu sledujú fyzikálno-chemické vlastnosti oleja, patrí stanovenie viskozity, celkového čísla kyslosti (total acid number – TAN), vody metódou podľa Karla Fischera a stanovenie bodu vzplanutia.

Experimentálna časť

Viskozita

Ak sú vo vzorke viditeľné nečistoty, prefiltruje sa, prípadne sa tieto nečistoty odstránia dekantáciou. Pre stanovenie kinematickej viskozity sa používa poloautomatický viskozimeter TAMSON TV 200/AKV a meranie i spracovanie výsledkov sa vykonáva podľa normy STN EN ISO 3104+AC. Metóda je založená na automatickom

meraní doby prietoku daného objemu meranej vzorky kvapaliny v dôsledku pôsobenia gravitačnej sily v kalibrovanej Ubbelohdeho trubici alebo manuálne pomocou Ostwaldovej trubice.

Na overenie kalibrácie viskozimetrických trubíc sa využívajú certifikované referenčné materiály (CRM) CANON S60 a N1000, sú to ropné oleje s certifikovanou hodnotou viskozity pri danej teplote.

Celkové číslo kyslosti (TAN)

Na stanovenie TAN sa ako titračné činidlo používa 0,1 mol l⁻¹ alkoholický roztok KOH. Vzorka sa rozpúšťa v zmesi chloroform : propan-2-ol v pomere 2:1. Vzorka sa pred analýzou homogenizuje pretrepávaním. Celkové číslo kyslosti sa stanovuje na automatickom potenciometrickom titrátore 702 SM TITRINO. Meria sa potenciál na indikačnej sklenenej elektróde oproti referenčnej chloridostriebornej elektróde v súlade s normou STN 65 6070. TAN je udané množstvom KOH v mg, ktoré je potrebné na neutralizáciu 1 g vzorky. Presnosť a správnosť merania je zabezpečené použitím CRM hydrogénftalátu draselného pri stanovení faktora roztoku KOH.

Obsah vody (stanovenie podľa Karla Fischera)

Na stanovenie vody touto metódou sa používajú Karl Fischerove titračné činidlo HYDRANAL Titrant 2 (obsahuje jód a oxid siričitý rozpustené v zmesi bezvodného metanolu a pyridínu) a rozpúšťadlo Hydranal Solvent Oil (obsahuje imidazol, oxid siričitý, hexan-1-ol a metanol). Vzorka sa pred analýzou homogenizuje pretrepávaním. Na stanovenie obsahu vody metódou podľa Karla Fischera sa rovnako využíva automatický potenciometrický titrátor ako pre stanovenie TAN, ale za použitia dvojitej platinovej elektródy. Meranie sa uskutočňuje pomocou volumetrickej titrácie s automatickou biampérometrickou indikáciou koncového bodu v súlade s normou STN 65 0330. Princípom metódy je oxidačno-redukčná reakcia, pri ktorej reagujú jód a oxid siričitý v bezvodnom metanole a pyridíne s vodou vo vzorke oleja. Presnosť merania je v laboratóriu zabezpečená meraním referenčného materiálu (water standard for volumetric titration no.:34849) nadväzného na CRM NIST SRM 2890.

Bod vzplanutia (stanovenie podľa Clevelanda)

Pred analýzou sa nechá vzorka stabilizovať pri laboratórnej teplote. Homogenizuje sa miešaním, aby sa nevytvorili bublinky. Prípadné bublinky sa odstránia z povrchu vzorky v téglíku. Na stanovenie bodu vzplanutia v otvorenom téglíku sa využíva automat FP-92 5G. Metóda spočíva v zohrievaní vzorky v otvorenom téglíku predpísanou rýchlosťou do prvého vzplanutia pár skúšanej vzorky nad hladinou po priblížení plameňa v súlade s normou STN ISO EN 2592. Na identifikáciu plameňa je použitý ionizačný hlásič. Stanovuje sa pre kvapalné ropné

látky s teplotou vzplanutia nad 80 °C. Presnosť a správnosť sa kontroluje meraním referenčného materiálu PAC GmbH Flash Point Cleveland Open Cup lot No:1029.

Presnosť a správnosť meraní uvedených skúšok je zabezpečená účasťou laboratória na medzilaboratórnych porovnávacích meraniach s laboratóriami, ktoré majú vykonávanie týchto skúšok akreditované.

Výsledky a diskusia

Viskozita určuje vytváranie kvapalinového mazania, únosnosť mazacieho filmu, veľkosť odporu pri rozbehu pohyblivých častí motora, tesniacu schopnosť maziva a tepelnú vodivosť. V použitom oleji viskozita rastie s dôvodu vzniku nečistôt, a to buď prienikom z vonkajšieho prostredia alebo opotrebovaním a starnutím oleja. Pokles viskozity môže byť spôsobený zriadením oleja napr. s palivom z dôvodu netesností v motore. Pravidelným sledovaním hodnôt viskozity olejov bolo zistené a doporučené, že počas bežnej prevádzky leteckých motorov by sa viskozita nemala meniť o viac ako $\pm 15\%$ od hodnoty udanej pre čistý olej. V prípade väčšej zmeny je potrebné zistiť znehodnotenie vlastností oleja, ktoré môže byť spôsobené prienikom nežiadúcej kvapaliny do olejového systému alebo tepelnou degradáciou z dôvodu poruchy systému alebo nesprávnej prevádzky. Pre stanovenie kinematickej viskozity v rozsahu od 2 do 100 $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ bola v laboratóriu vypočítaná hodnota rozšírenej neistoty (U) s koeficientom rozšírenia $k = 2$ rovná 2 %.

Celkové číslo kyslosti je veľmi dôležitým ukazovateľom kvality používaného oleja. Starnutie oleja je spôsobené oxidáciou uhlíkovodíkového základu oleja, čím vznikajú látky, ktoré majú kyslé vlastnosti. Nárast TAN v použitých olejoch signalizuje nárast kyslých produktov oxidácie. Číslo kyslosti by nemalo narásť o viac ako o polovicu, od hodnoty určenej pre čistý olej, ale pre oleje pracujúce v leteckých motoroch to neplatí. Dlhodobým meraním hodnôt TAN olejov v prevádzke leteckých motorov bolo zistené, že zvyčajne nedochádza k prekročeniu hodnôt

určených pre čistý olej. K vyššiemu prekročeniu došlo len v prípade zmiešania s iným typom oleja, ktorého číslo kyslosti je výrazne vyššie. Pre stanovenie TAN v rozsahu od 0,01 do 1,5 mg KOH g^{-1} vzorky bola s koeficientom rozšírenia $k = 2$ vypočítaná hodnota U na 8 %.

Prítomnosť vody znižuje kvalitu mazacieho filmu, zvyšuje možnosť korózie kovových súčiastok stroja a ochudobňuje mazacu kvapalinu o aditíva. Dôsledkom je zvýšený oder a opotrebovanie, čo môže spôsobiť poruchu ložísk, upchatie filtrov a zapečenie motora. Voda môže spôsobovať vytváranie emulzií a kalov. Vo väčšine olejov používajúcich sa v leteckých motoroch je prítomnosť vody neprípustná. Vyhodnotením meraní obsahu vody v oleji jedného typu leteckých motorov počas jedného roka bolo zistené, že priemerná hodnota obsahu vody je 0,04 % s intervalom spoľahlivosti 95 % v rozsahu danom smerodajnou odchýlkou 0,011%. Pre obsah vody metódou podľa K. Fischera v rozsahu od 0,01 do 10 % bola s koeficientom rozšírenia $k = 2$ hodnota U rovná 8 %.

Bod vzplanutia pre opotrebované oleje slúži k stanoveniu približného obsahu zriedujúcich a horľavých látok. Pomocou tejto metódy je možné zistiť nariadenie meranej vzorky oleja napr. s palivom, vodou alebo inou kvapalinou, ktorá znehodnocuje vlastnosti oleja, čím sa znižuje výkonnosť stroja. Pre meranie bodu vzplanutia v otvorenom téglíku podľa Clevelanda v rozsahu od 100 do 300 °C je pre koeficient rozšírenia $k = 2$ hodnota U rovná 4 %.

Príklady tribotechnickej diagnostiky v praxi

Využitie niektorých zo spomínaných metód v praxi je popísané v nasledovných príkladoch:

Príklad 1

Pôvodná olejová náplň leteckého motora olej Castrol 98 bola nahradená zmesou olejov ASTO 3SP a ASTO 100. Pri bežnej tribotechnickej kontrole boli vo vzorkách olejov namerané zvýšené hodnoty TAN a kinematickej viskozity (tabuľka I). Pre čistý olej Castrol 98 bola nameraná prie-

Tabuľka I
Hodnoty TAN a kinematickej viskozity vo vzorkách olejov

Číslo vzorky/ označenie oleja	Kinematická viskozita [$\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$]		TAN [mg KOH g^{-1}]
	37,8 °C	100 °C	
ASTO 3SP / ASTO 100	22,95	4,41	0,09
Castrol 98	– ^a	7,6 ^b	0,20
1	29,24	5,48	0,12
2	29,26	5,22	0,14
3	29,71	5,08	0,19
4	29,48	5,10	0,20

^a Tabuľková hodnota nie je uvedená, ^b tabuľková hodnota

merná hodnota TAN rovná 0,20 mg KOH g⁻¹ s intervalom spoľahlivosti 95 % v rozsahu danom smerodajnou odchýlkou 0,12 mg KOH g⁻¹. V čistej zmesi olejov ASTO 3SP a ASTO 100 bola nameraná hodnota TAN 0,09 mg KOH g⁻¹. Z nameraných výsledkov vznikol predpoklad, že došlo k nedokonalému preplachu olejového systému. Infračervenou spektrálnou analýzou bola potvrdená prítomnosť oleja Castrol 98 v zmesi olejov ASTO 3SP a ASTO 100. Z tribotechnického hľadiska je tento stav pracovných kvapalín nevyhovujúci, a preto bolo doporučené prepláchnutie olejového systému a opakované naplnenie príslušnou zmesou olejov.

Příklad 2

Pri bežnej kontrole stavu kvapalín v leteckom motore bolo zistené zakalenie oleja. Z dôvodu podozrenia na prítomnosť inej kvapaliny, ako je doporučená pre daný olejový systém, bol stanovený bod vzplanutia v otvorenom téglíku a vykonaná infračervená spektrálna analýza. Na základe infračervenej analýzy bolo zistené, že došlo k zmiešaniu oleja MS-8P s olejom ASTO-555, zároveň bola vylúčená prítomnosť vody. Hodnota bodu vzplanutia v čistom oleji MS-8P je 175 °C. Nameraná hodnota bodu vzplanutia skúšobnej vzorky bola nižšia, a to 162 °C. Predpokladalo sa, že zmiešaním s olejom ASTO-555, ktorého bod vzplanutia je 245 °C, vzrastie hodnota bodu vzplanutia, ale nestalo sa tak. Dá sa to vysvetliť tým, že vzájomným zmiešaním týchto kvapalín za zvýšených teplôt a tlakov vznikli látky, ktoré sú viacej horľavé (majú nižší bod vzplanutia) ako samotný olej MS-8P.

Záver

Stanovenie viskozity v opotrebovaných olejoch je dôležitou informáciou o únosnosti mazacieho filmu medzi trecími plochami pre zabezpečenie ochrany systémov mazaných týmito olejmi. Číslo kyslosti udáva množstvo kyslých látok v oleji a tým určuje stupeň jeho zostarnutia. Prítomnosť vody v oleji vo viazanej alebo voľnej forme predstavuje nežiaduci činiteľ, ktorý vzniká počas prevádzky stroja, čím spôsobuje nepriaznivé degradačné procesy v mazive.

Metódy využívané na zisťovanie fyzikálno-chemických vlastností oleja, nachádzajúceho sa počas

prevádzky v olejovom systéme motora, umožňujú získať pomocou zmeny vlastností oleja veľa informácií o stave motora. Z výsledkov meraní je možné dedukovať dostatočné, alebo nedostatočné utesnenie motora, prípadne utesnenie chladiaceho systému, dokonalosť mazania a chladenia. Pomocou týchto metód a znalosti technického systému je možné identifikovať vznikajúcu poruchu, prípadne ju aj lokalizovať.

Príspevok vznikol za podpory grantovej agentúry VEGA MŠ SR č. 1/4155/07.

LITERATÚRA

1. Helebrant F., Marek V., Rautová J., Ziegler J.: *Sborník přednášek 9. ročníku konference REOTRIB 2003 Kvality paliv a maziv, 21.–23. května, Velké Losiny, 2003*, str. 85, (Černý J., ed.), VŠCHT, Praha 2003.
2. Nováček V.: *Tribotechnické informace 2006*, 4.
3. Anderson D. P., Lukas M.: *VIII International Conference: Tribotechnics in Theory and Practice, 21.–24. April 1997 part II, Skalský Dvůr*, str. 7. Sekurkon, Praha 1997.
4. Chvalina V.: *Tribotechnické informace 2006*, 2–3.

J. Mihalčová and H. Al Hakim (*Faculty of Production Technologies, Technical University, Košice, Slovak Republic*): **Tribotechnical Diagnostics of Used Oils II. Methods of Assessment of Physicochemical Properties of Oils**

Methods used in tribotechnical diagnostics of military airplane engines based on evaluation of physicochemical characteristics of the used oils are reviewed. Their kinematic viscosity was determined at 40 °C and 100 °C using an automatic viscometer. An increase in viscosity may indicate contamination of oil with impurities or water due to degradation or vaporization of volatiles. A decrease in viscosity indicates contamination of oil with fuel. The total acid number of oil was determined by titration with KOH. Water was determined by Karl Fischer titration. The flash point was determined by the Cleveland open cup method. Applications of the described methods are shown on two examples.

VÝUKA CHEMIE

ELEKTROLÝZA V JEDNODUCHOM ZARIADENÍ V ŠKOLSKOM LABORATÓRIU

ZUZANA MELICHOVÁ^a, IVETA NAGYOVÁ^a
a JÁN REGULI^b

^a Katedra chémie, Fakulta prírodných vied Univerzity Mateja Bela, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,

^b Katedra chémie, Pedagogická fakulta Trnavskej univerzity, Priemyselná 4, 918 43 Trnava, Slovensko
melichov@fpv.umb.sk

Došlo 17.1.08, prijaté 18.12.08.

Kľúčové slová: elektrolýza, zariadenie na elektrolýzu, elektrolýza vody, elektrolýza halogenidov

Úvod

Ako jeden z problémov prírodovedného vzdelávania sa často uvádza odtrhnutosť obsahu školských predmetov od každodenného života. Tento problém spočíva podľa nás často len v nedostatočnom poukazovaní na aplikácie javov a dejov, ktoré sa preberajú na hodinách chémie a fyziky, v bežnom živote. Jedným z takýchto dejov, ktoré sa dostali takmer do centra nášho každodenného diania, je elektrolýza. Kedysi sa ako príklady využitia elektrolýzy v praxi uvádzali výroba hliníka, výroba vysoko čistej medi, príprava vodíka a zriedkavejšie nabíjanie oloveného akumulátora. V súčasnej dobe sa čoraz častejšie stretávame s využitím elektrolýzy bez toho, aby sme si to uvedomovali, napr. pri nabíjaní akumulátorov do mobilných telefónov, fotoaparátov, prehrávačov, hračiek a pod. Galvanické články, vrátane moderných akumulátorov používaných ako zdroj energie prenosných prístrojov, ktoré nás každodenne sprevádzajú, sme učiteľom i študentom predstavili v nedávno publikovanom príspevku¹.

Žiaci slovenských základných škôl sa s elektrolýzou prvýkrát stretávajú na hodinách fyziky v 6. ročníku v rámci tematického celku zameraného na vedenie elektrického prúdu v kvapalinách. V chémii je táto problematika zaradená do učiva 9. ročníka do tematického celku zameraného na redoxné reakcie. Na stredných školách (gymnáziách aj odborných školách) sa elektrolýza vyučuje v 1. ročníku a je včlenená do tematického celku venovanému chemickým reakciám a ich zákonitostiam. Podľa Vzdelávacích štandardov z chémie s exemplifikačnými úlohami² žiaci majú vedieť vysvetliť princíp elektrolýzy,

deje prebiehajúce na kladnej a zápornej elektróde a rozdiel medzi elektrolýzou vodného roztoku a taveniny.

V Českej republike sa v súčasnosti začína vyučovať podľa rámcových vzdelávacích programov³. Chémia je zaradená do vzdelávacej oblasti „Človek a príroda“ spolu s ďalšími prírodovednými predmetmi (fyzika, chémia, prírodopis a zemepis). Učivo o redoxných reakciách sa vyučuje v rovnakom rozsahu ako na slovenských školách, ale s možnosťou voľby ročníka.

Problém pochopenia elektrolýzy a najmä výpočtu množstva látok vylúčených na elektródach tkvie aj v tradičnom ťpení na dvoch Faradayových zákonoch a zavádzaní dnes už zbytočnej veličiny „elektrochemický ekvivalent“, ktorého pochopenie je náročné. Žiakom môžeme zdôrazniť, že Faraday musel odvodiť vzťah pre výpočet hmotnosti vylúčenej látky pri elektrolýze zovšeobecnením experimentálnych údajov, získaných množstvom pokusov. Neboli totiž známe pojmy, ktoré máme k dispozícii dnes – elektrón, látkové množstvo, molárna hmotnosť, neexistovala ani periodická tabuľka. V súčasnosti sa vzťah vyjadrujúci spojené Faradayove zákony dá odvodiť jednoduchou úvahou, ktorú uvádzame.

Vzhľadom na často nedostatočné vybavenie škôl, experimentálne úlohy z elektrolýzy, ktoré by prispeli k lepšiemu pochopeniu učiva, sa na mnohých školách nevykonávajú. V príspevku preto uvádzame alternatívne zariadenia, ktoré umožňujú jednoducho a pritom názorne uskutočniť elektrolýzu v školských chemických laboratóriách. Zariadenie pre spoločné zachytávanie plynov je upravené podľa Baníka⁴. Pre elektrolýzu vodných roztokov halogenidov navrhujeme podobné usporiadanie pokusu.

Čo je elektrolýza?

Elektrolýza sa dá najjednoduchšie opísať ako „rozklad látok jednosmerným elektrickým prúdom“. Ide o chemické zmeny, ktoré nastanú pri prechode jednosmerného elektrického prúdu elektrolytom (roztokom alebo taveninou).

Kvantitatívnym štúdiom elektrolýzy sa zaoberal Michael Faraday. Sledoval vzťah medzi nábojom, ktorý prešiel elektrolytom a množstvom látok vylúčených na elektródach. V roku 1833 svoje pozorovania a výsledky zhrnul do dvoch zákonov. Prvý Faradayov zákon sa dá vyjadriť nasledovne: Hmotnosť m látky vylúčenej alebo chemicky premenenej na elektróde účinkom elektrického prúdu I je úmerná elektrickému náboju Q , ktorý prešiel elektrolytom. Matematicky tento zákon vyjadruje vzťah (1):

$$m = A Q \quad (1)$$

kde konštanta úmernosti A je tzv. elektrochemický ekvivalent. Je to hmotnosť látky v gramoch, ktorá sa chemicky

vylúči alebo premení nábojom 1 C (g C^{-1}). V prípade konštantného elektrického prúdu I (A) prechádzajúceho elektrolytom za určitý čas t (s) platí:

$$Q = I t \quad (2)$$

Druhý Faradayov zákon možno formulovať takto: Hmotnosti rozličných látok vylúčených alebo chemicky premenených na elektródach rovnakým nábojom Q sú v pomere ich elektrochemických ekvivalentov. Elektrochemický ekvivalent môžeme vyjadriť vzťahom (3):

$$A = \frac{M}{z F} \quad (3)$$

kde M je molárna hmotnosť vylúčenej alebo chemicky premenenej látky (g mol^{-1}), z počet elektrónov potrebných na oxidáciu alebo redukciu jednej častice, F Faradayova konštanta). Faradayova konštanta predstavuje 1 mól elementárneho elektrického náboja, ktorým je náboj elektrónu a môžeme ju vyjadriť vzťahom (4), ako súčin Avogadrovej konštanty N_A a elementárneho elektrického náboja e^- :

$$F = N_A e^- = 6,0221367 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot 1,6021773 \cdot 10^{-19} \text{ C} = 96\,485,309 \text{ C mol}^{-1} \quad (4)$$

Dosadením vzťahu (2) a (3) do vzťahu (1) dostávame vzťah (5) vyjadrujúci spojené Faradayove zákony:

$$m = \frac{M}{z F} I t \quad (5)$$

Tento vzťah sa dnes dá jednoducho odvodiť aj bez použitia pojmu elektrochemický ekvivalent, ak si uvedomíme, že na vylúčenie alebo chemickú premenu jedného atómu látky M z roztoku „z-mocných“ iónov podľa rovnice (6):



je potrebný náboj $Q = z e^-$. Potom pre vylúčenie alebo chemickú premenu látkového množstva n mólov látky M (t. j. $n N_A$ atómov) je potrebný náboj Q daný vzťahom (7):

$$Q = n N_A z e^- \quad (7)$$

Pre látkové množstvo n platí vzťah (8):

$$n = \frac{m}{M} \quad (8)$$

Keď do vzťahu (7) dosadíme vzťahy (2), (4) a (8) a vyjadríme hmotnosť m , dostaneme vzťah (5) pre spojené Faradayove zákony.

Na uvedenom vzťahu sú založené coulometre, prístroje na meranie elektrického náboja, ktorý prešiel obvodom za daný časový interval.

V praxi prebiehajú pri elektrolýze rôzne vedľajšie procesy, a preto množstvo vylúčenej látky je obyčajne menšie ako zodpovedá Faradayovým zákonom. Pomer skutočne získaného množstva látky k množstvu teoreticky vypočítanému sa nazýva prúdový výťažok (prípadne účin-

nosť elektrolýzy) a udáva sa v percentách.

Návody na praktické úlohy z elektrolýzy

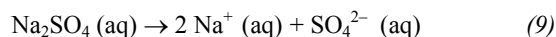
Elektrolýza vody – spoločné zachytávanie vodíka a kyslíka

Elektrolýza vody sa najčastejšie uskutočňovala v Hoffmanovom prístroji. Vzhľadom na jeho nevýhody (je ľahko rozbitný a cenovo pre mnohé školy neprístupný) sa na školách nepoužíva. Viacerí autori navrhujú jeho jednoduchšie a cenovo prístupné alternatívy^{5–7}.

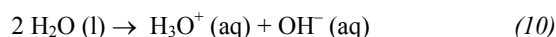
V nasledujúcich dvoch experimentoch používame ako elektrolyt roztok síranu sodného, látky, ktorá nie je klasifikovaná ako nebezpečná chemická látka na rozdiel od kyseliny sírovej alebo hydroxidu sodného, ktoré sú žieravé [ak $w(\text{H}_2\text{SO}_4) > 15\%$ a $w(\text{NaOH}) > 2\%$] prípadne dráždivé [ak $w(\text{H}_2\text{SO}_4) > 5\%$ a $w(\text{NaOH}) > 0,5\%$].

Princíp: Keďže molekuly vody sú len nepatrne disociované, pri pH 7 je $c_{\text{H}_3\text{O}^+} = c_{\text{OH}^-} = 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ a čistá voda nevedie elektrický prúd. Pridaním silného elektrolytu, ktorého molekuly sú dobre disociované, a preto vedú elektrický prúd, elektrolýza prebieha.

Disociácia Na_2SO_4 :

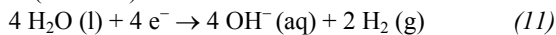


Disociácia H_2O :



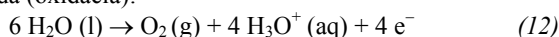
Nakoľko pH vodného roztoku Na_2SO_4 je blízke 7 (soľ nehydrolyzuje), koncentrácia H_3O^+ iónov a OH^- iónov je približne $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, z čoho vyplýva, že počas elektrolýzy budú na elektródach prebiehať nasledovné deje:

katóda (redukcia):



$$E_{\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2}^0 = -0,83 \text{ V}$$

anóda (oxidácia):



$$E_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}}^0 = 1,23 \text{ V}$$

Hodnota redoxného potenciálu $E_{\text{Na}^+/\text{Na}}^0 = -2,71 \text{ V}$ je zápornejšia ako hodnota redoxného potenciálu $E_{\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2}^0 = -0,83 \text{ V}$, čo spôsobuje, že ióny Na^+ sa na katóde neredukujú, ale redukuje sa vodík. Hodnota redoxného potenciálu

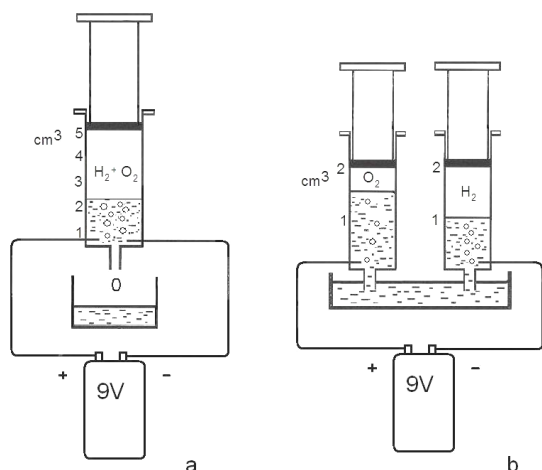
$$E_{\text{S}_2\text{O}_8^{2-}/\text{SO}_4^{2-}}^0 = 2,01 \text{ V}$$

je vyššia ako hodnota redoxného potenciálu

$$E_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}}^0 = 1,23 \text{ V}$$

čo spôsobuje, že ióny SO_4^{2-} sa na anóde neoxidujú, ale oxiduje sa kyslík. Ióny Na^+ a SO_4^{2-} zostávajú v roztoku počas elektrolýzy bez zmeny a prispievajú len k zvýšeniu vodivosti elektrolytu.

Pomôcky: plastová injekčná striekačka ($V = 5 \text{ cm}^3$), 2 elektródy – listové spony (napr. SPONY 236, veľkosť 50 mm),



Obr. 1. Zariadenie pre elektrolýzu vody; a) spoločné zachytávanie vodíka a kyslíka, b) oddelené zachytávanie vodíka a kyslíka

9 V batéria, 2 spojovacie vodiče, Petriho miska, kovový stojan, držiak, svorka.

Chemikálie: síran sodný ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$).

Príprava zariadenia: V spodnej časti plastovej injekčnej striekačky urobíme oproti sebe dva otvory, cez ktoré vsunieme spony ohnuté do 90° uhla, ktoré budú slúžiť ako elektródy. Veľkosť otvorov volíme tak, aby bola zabezpečená ich dokonalá tesnosť po zasunutí elektród (obr. 1a).

Postup: Do striekačky naberieme 2 cm^3 roztoku elektrolytu Na_2SO_4 tak, aby v striekačke nezostal vzduch. Striekačku s roztokom fixujeme vo zvislej polohe otvorom nadol. Pod ústie striekačky podložíme Petriho misku, do ktorej budú odkvapkávať kvapky roztoku elektrolytu. Elektródy pomocou spojovacích vodičov pripojíme na 9 V batériu. Pozorujeme vyvíjanie plynov na elektródach vo vnútri striekačky, ktoré spôsobujú vytlačenie roztoku elektrolytu zo striekačky. V striekačke vzniká zmes vodíka a kyslíka v pomere 2:1, ktorá je známa pod názvom „traskavý plyn“. *Identifikácia produktu:* Prítomnosť traskavého plynu môžeme zistiť napr. tak, ak do mydlového roztoku zavádzame pripravenú zmes plynov. Keď k takto pripraveným bublinkám priložíme horiacu špajdlu, budeme počuť charakteristické šteknutie typické pre traskavý plyn.

Elektrolýza vody – oddelené zachytávanie vodíka a kyslíka

Pomôcky: 2 plastové injekčné striekačky ($V = 2 \text{ cm}^3$), 2 uhlíkové elektródy (pripravajú sa pomocou tuhy z obyčajnej ceruzky), spojovacie vodiče, 9 V batéria, Petriho miska, kovový stojan, držiak, svorka.

Chemikálie: síran sodný ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$).

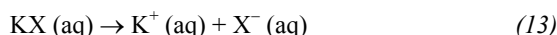
Príprava zariadenia: V spodnej časti plastovej injekčnej striekačky urobíme otvor, cez ktorý neskôr vsunieme uhlíkovú elektródu. Veľkosť otvoru volíme tak, aby bolo zabezpečené dokonalé utesnenie. Obdobne pripravíme aj druhú striekačku (obr. 1b).

Postup: Do oboch striekačiek naberieme po 2 cm^3 roztoku elektrolytu Na_2SO_4 tak, aby v striekačke nezostal vzduch. Cez bočný otvor striekačky opatrne vsunieme uhlíkovú elektródu. Takto pripravené striekačky pripevníme pomocou držiaka a svorky do kovového stojana a ponoríme do roztoku Na_2SO_4 v Petriho miske (je potrebné zabezpečiť vodivé spojenie elektrolytu v striekačkách). Elektródy pripojíme pomocou spojovacích vodičov na 9 V batériu. Pozorujeme vyvíjanie plynov na elektródach vo vnútri striekačiek. Prechodom prúdu dochádza k rozkladu elektrolytu. Na katóde (pripojenej na záporný pól batérie) uniká vodík a na anóde (kladný pól batérie) kyslík. Objemy vznikajúcich plynov sú v pomere 2:1.

Elektrolýza vodných roztokov halogenidov

Princíp: Elektrolýzou vodného roztoku halogenidu draselného sa získa na katóde vodík, v okolí katódy sa hromadí roztok KOH a na anóde príslušný halogén.

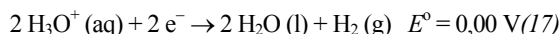
Halogenid draselný je v roztoku disociovaný na draselné a halogenidové ióny:



Autoprotolýzou vody vznikajú H_3O^+ a OH^- ióny:

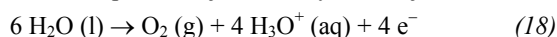


Do úvahy prichádzajú nasledovné možné deje na katóde:

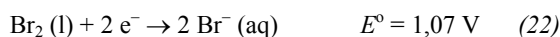
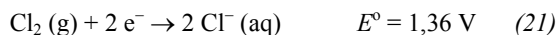
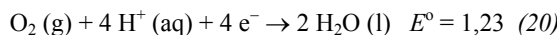


Na katóde sa budú redukovať tie katióny, ktorých redoxný potenciál je menej negatívny. Vzhľadom na to, že pH vodného roztoku KX je blízke 7 (soľ nehydrolyzuje) a koncentrácia H_3O^+ iónov je približne $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, redukcia bude prebiehať podľa rovnice 16. Zároveň to vysvetľuje, že počas elektrolýzy v okolí katódy narastá koncentrácia OH^- iónov, preto možno získať KOH ako ďalší produkt elektrolýzy.

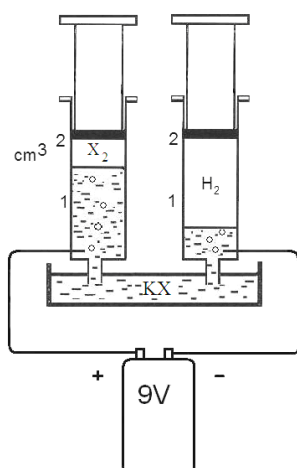
Na anóde prichádzajú do úvahy tieto deje:



Štandardné redoxné potenciály sú nasledovné:



Na anóde sa bude oxidovať látka s nižším redoxným potenciálom. V prípade KI jód, v prípade KBr bróm a v prípade KCl podľa redoxného potenciálu (+1,23 V) kyslík. Experiment však dokazuje prítomnosť chlóru. Tento dej možno vysvetliť nadpätím kyslíka. Nadpätie je typické najmä pre kyslík a vodík, znamená to, že sa vylučujú



Obr. 2. Zariadenie pre elektrolýzu vodných roztokov halogenidov

pri vyššom napätí, než aké sa vypočíta z potenciálov príslušných vratných elektród.

Zvyšovanie koncentrácie Cl^- iónov, použitie koncentrovanejších roztokov v reálnom experimente, vedie k znižovaniu redoxných potenciálov podľa Nernstovej-Petersovej rovnice oproti hodnotám štandardných potenciálov.

Pomôcky: 2 plastové injekčné striekačky, 2 uhlíkové elektródy, spojovacie vodiče, 9 V batéria, Petriho miska, kovový stojan, držiak, svorka.

Chemikálie: chlorid draselný ($c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$), bromid draselný ($c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$), fenolftaleín ($w = 0,1\%$ roztok v 96% etanole), fluoresceín ($w = 0,1\%$ roztok farbiva v 50% etanole), škrobový roztok ($w = 2\%$), jodidoškrobový papierik, škrobový papierik.

Príprava zariadenia: Zariadenie zostavíme podľa obr. 2.

Pracovný postup: Plastové striekačky naplníme roztokom halogenidu draselného a dbáme na to, aby neboli prítomné vzduchové bubliny. Cez bočný otvor striekačky opatrne vsunieme uhlíkové elektródy. Takto pripravené striekačky pripojíme pomocou držiaka a svorky do kovového stojana a ponoríme do roztoku KX v Petriho miske. Aby elektrolýza prebiehala, je potrebné zabezpečiť vodivé spojenie elektrolytu v striekačkách. Uhlíkové elektródy pomocou spojovacích vodičov pripojíme na 9 V batériu.

Počas elektrolýzy pozorujeme na katóde (záporný pol

batérie) tvorbu bublinek unikajúceho vodíka a na anóde (kladný pól batérie) vylučovanie halogénu X_2 , ktorý sa čiastočne rozpúšťa v roztoku KX.

Po skončení elektrolýzy vyberieme striekačky z Petriho misky a identifikujeme produkty.

Identifikácia produktov:

KOH: Do roztoku v Petriho miske, na miesto kde bola umiestnená katóda, pridáme niekoľko kvapiek roztoku indikátora fenolftaleínu. Nakoľko sa tu hromadí KOH, fenolftaleín sa farbí na ružovo.

H_2 : Zachytený plynný vodík v striekačke napr. zavádzame do roztoku saponátu, do ktorého sme pridali glycerol (zabraňuje vysušovaniu vytvoreného filmu bubliny). Vznikajúce bublinky naplnené vodíkom sú ľahšie ako vzduch, a preto stúpajú nahor.

Cl_2 : a) Zo striekačky, v ktorej sa pri elektrolýze vyvíjal chlór, kvapneme kvapku roztoku na jodidoškrobový papierik. Elektrolýzou uvoľnený chlór oxiduje KI na I_2 , ktorý farbí škrobový roztok na modro. Prebieha chemická reakcia zapísaná chemickou rovnicou:



b) Ak vytlačíme časť roztoku obsahujúceho chlór do skúmavky a pridáme pár kvapiek roztoku KI, pozorujeme hnedé sfarbenie roztoku od vylúčeného jódu. Po pridaní pár kvapiek škrobového roztoku, roztok sa sfarbí na modro.

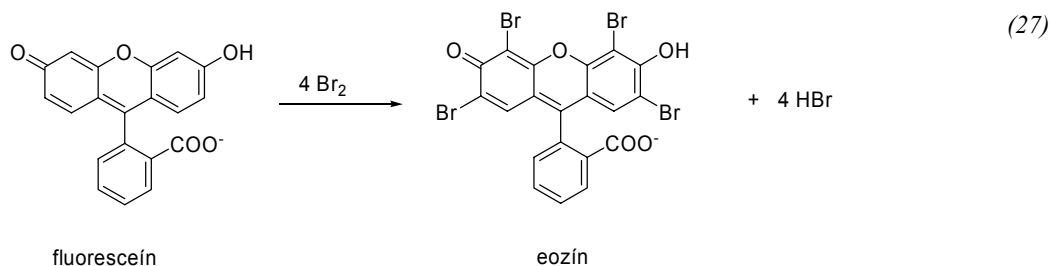
Oxidácia jódu chlórrom prebieha až na IO_3^- podľa nasledovnej chemickej reakcie, pričom postupne modré sfarbenie mizne.



c) Prítomnosť chlóru môžeme zistiť aj pomocou roztoku KBr a prípadne fluoresceínu nasledovným postupom. Zo striekačky, v ktorej sa vyvíjal chlór, kvapneme kvapku roztoku na filtračný papierik namočený do roztoku KBr, prípadne do zmesi roztokov KBr a fluoresceínu, alebo vytlačíme časť roztoku do skúmavky, pridáme pár kvapiek roztoku KBr, prípadne zmes roztokov KBr a fluoresceínu. Elektrolýzou uvoľnený chlór oxiduje v roztoku KBr na Br_2 . Pozorujeme žlté sfarbenie roztoku od vylúčeného brómu, ktorý reaguje s roztokom fluoresceínu (žltá farba) za vzniku eoínu (červená farba). Prebiehajú reakcie zapísané chemickými rovnicami (26) a (27):



Br_2 : a) Prítomnosť brómu môžeme zistiť rovnako ako u chlóru jodidoškrobovým papierikom. Elektrolýzou uvoľnený bróm oxiduje KI na I_2 , ktorý farbí škrobový roztok na



modro. Prebieha chemická reakcia zapísaná chemickou rovnicou:



b) Ak vytlačíme časť roztoku obsahujúceho bróm do skúmavky a pridáme pár kvapiek roztoku KI, pozorujeme hnedé sfarbenie roztoku od vylúčeného jódu. Po pridaní pár kvapiek škrobového roztoku sa roztok sfarbí na modro.

c) Bróm môžeme dokázať aj roztokom fluoresceínu (žltá farba), ktorý s brómom reaguje za vzniku eoizínu (červená farba).

I_2 : Prítomnosť jódu môžeme zistiť škrobovým roztokom. Zo striekačky, v ktorej sa vyvíjal jód, kvapneme kvapku roztoku na škrobový papierik alebo vytlačíme časť roztoku do skúmavky a pridáme trochu škrobového roztoku. Elektrolýzou uvoľnený jód farbí škrobový roztok na modro.

Záver

Príspevok poukazuje na možnosti uskutočnenia elektrolýzy v jednoduchom cenovo nenáročnom zariadení, ktoré je dostupné na každej škole a s použitím chemických látok, ktoré nie sú klasifikované ako nebezpečné. Práca s malými množstvami vedie k ekonomickému využívaniu chemikálií a vzniku malého množstva odpadov. Navrhnuté experimenty možno využiť pri výučbe jednak elektrolýzy a jednak prípravy vodíka a kyslíka, prípravy halogénov, ich vzájomných reakcií a porovnaní oxidačných vlastností halogénov ako aj ich dôkazových reakcií.

Práca bola realizovaná s finančnou podporou grantu KEGA č. 3/4202/06.

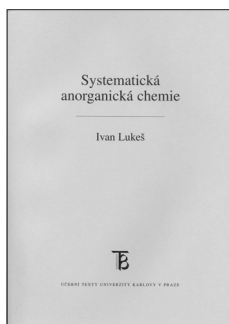
LITERATÚRA

1. Melichová Z., Reguli J.: *Chemické rozhľady* 8, 143 (2007).
2. Adamkovič E.: *Vzdelávací štandard s exemplifikačnými úlohami z chémie pre gymnáziá so štvorročným štúdiom.* (Schválilo MŠ SR 11. 1. 2002 pod číslom 045/2002-4). Bratislava : ŠPU, 2001.
3. <http://www.rvp.cz>, stiahnuté 15.1.08.
4. Baník R., Baník I.: *Zaujímavá elektrolýza*, v: *Veletrh nápadů pro fyzikální vzdělávání*. Prometheus, Praha 2005.
5. Eggen P. O., Kvittingen L.: *J. Chem. Educ.* 81, 1337 (2004).
6. Suzuki C.: *J. Chem. Educ.* 72, 912 (1995).
7. Heideman S.: *J. Chem. Educ.* 63, 809 (1986).

Z. Melichová^a, I. Nagyová^a, and J. Reguli^b
^a *Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Matej Bel University, Banská Bystrica, Slovak Republic*
^b *Department of Chemistry, Faculty of Education, Trnava University, Trnava, Slovak Republic*: **A Simple Alternative Apparatus for Electrolysis in a School Laboratory**

The apparatus can be easily used in school laboratories for demonstration of electrolysis. Its advantages are low cost, easy set-up, and a low consumption of the electrolyte. Electrolyses of water and halide solutions are presented. A simple derivation of the equation for determining the amount of the electrolysis product is given.

RECENZE



Ivan Lukeš

Systematická anorganická chemie

Vydala Univerzita Karlova v Praze
– Nakladatelství
Karolinum, 2009.
234 stran, 250 Kč.
ISBN 978-80-246-1614-8

Skripta Ivana Lukeše „Systematická anorganická chemie“ jsou zdařilým dílem, a to zejména proto, že odrážejí moderní pojetí anorganické chemie, podle kterého je anorganická chemie chápána a vykládána nikoliv jako jedna z izolovaných chemických vědních disciplin, nýbrž jako integrální součást chemie s četnými průniky s dalšími chemickými disciplinami, hlavně s chemií organickou a fyzikální, a s úzkými vazbami na obory chemicko-technologické a inženýrsko-chemické. Ve skriptech jsou otázkám styčných bodů anorganické chemie a dalších chemických disciplin a jejich vzájemnému ovlivňování a obohacování věnovány nejen samostatné kapitoly (jako např. „Organokovové sloučeniny“, „Katalýza“ a pod.), ale jako základní idea prostupují celým textem.

V době obrovského růstu nových poznatků ve všech vědních oborech, včetně anorganické chemie, a téměř každodenního zveřejnění nějakého nového objevu, je pro autora jakýchkoliv učebních textů nesmírně obtížným, ale zároveň zásadním a nezbytným, úkolem citlivý výběr faktografického materiálu a rozlišení míry důležitosti jeho jednotlivých položek. V recenzovaných skriptech jsou zřetelně odlišeny pasáže obsahující fakta, která jsou podmínkou úspěšného zkusování zkoušky a která by si měl čtenář (student) uchovat delší dobu, nejlépe celý život, v paměti od míst s méně důležitými poznatky či pouhými zajímavostmi.

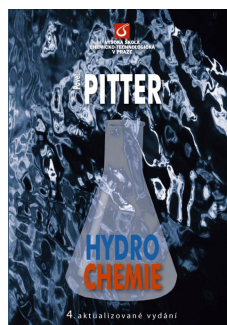
Vlastní text skript vychází z osvědčeného a ověřeného staršího (1998) vydání podobného titulu. Ten je na různých místech v potřebné míře doplňován o nové kapitoly či odstavce (např. „Voda a led“, „Boridy“, „Sloučeniny dusíku s vodíkem“ a další), modernizován podle novějších poznatků (např. „Sloučeniny síry s halogeny“) nebo přepracován (např. „Přehled kyselin dusíku“). Grafická úprava skript i jazyková stránka jsou velmi kvalitní.

Za zvlášť záslužný a potřebný příspěvek skript je třeba považovat zařazení poslední části „Vybrané kapitoly z anorganické chemie“. Téma zařazena do této části tvoří pouze malý výsek z daleko početnější množiny možností, představují však celosvětově mimořádně intenzivně studovanou část anorganické chemie. Jejich výběr není zřejmě nahodilý, odpovídá do značné míry profesionální orientaci autora a jeho pracoviště. A tak by tomu mělo být. Je dobré,

když studenti už na samém počátku studií poznají, že je učí nejen zkušený vysokoškolský učitel, ale i výrazná vědecká osobnost.

Podle předmluvy jsou skripta určena převážně studentům bakalářských studijních programů a studentům učitelských kombinací s chemií. Nicméně – neměla by uniknout pozornosti daleko širší odborné veřejnosti, studentské i učitelské.

J. Holeček



Pavel Pitter

Hydrochemie

Vydalo vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. 4. aktualizované vydání.
592 stran, 670 Kč.
ISBN 978-80-7080-701-9

Čtvrté vydání „vodařského bestselleru“ konečně vyplňuje dlouhotrvající nedostatek moderní publikace v příslušném oboru, vytvořený poměrně rychlým rozebráním jejího předcházejícího vydání.

Kniha zachovává původní, pedagogicky osvědčené členění kapitol, včetně názvů. Jejich text autor aktualizoval a doplnil novými teoretickými i praktickými poznatky. Aktualizována byla také literatura, uváděná na konci každé kapitoly.

Úvodní části knihy jsou věnovány stručnému popisu vývoje hydrochemie, vybraným legislativním nástrojem v oboru, přehledu hydrochemické literatury, fyzikálně-chemickým vlastnostem vody a obecnému složení vod. Pozornost je věnována také fyzikální chemii povrchů tuhých látek přicházejících do styku s vodou a řešení chemických rovnováh ve vodách v souvislosti s existencí různých forem jednotlivých složek.

Těžiště knihy tvoří kapitoly věnované genezi, výskytu, vlastnostem a významu látek anorganického a organického původu vyskytujícím se ve vodách a procesům, které ovlivňují jejich distribuci v prostředí. Do charakteristiky organických látek bylo zařazeno jejich roztřídění podle původu, biologické rozložitelnosti a zdravotní nezávadnosti. Nově se v této části publikace objevuje kapitola věnovaná cizorodým látkám (ftaláty, léčiva, estrogény atd.), jejichž přítomnost ve vodách je v současné době velmi pozorně sledována.

Samostatná část knihy pojednává o jednotlivých druzích vod – přírodních, pitných, užitkových a provozních, o odpadních vodách splaškových a průmyslových a také o odpadech ze zemědělství.

Závěrečnou část knihy vyplňují kapitoly věnované

řešení chemických rovnováh ve vodách v souvislosti s diferenciací forem existence jednotlivých složek.

Autor při psaní textu respektoval doporučení Českého normalizačního institutu (ČNI), aby se při překladu norem ISO a EN co nejvíce akceptovaly anglické zkratky místo českých ekvivalentů. Proto v některých názvech i v tabulkách uvádí obě varianty např. KNK (ANC), ZNK (BNC), CHSK (COD), BSK (BOD), PAU (PAH) a další.

Knihy splňuje podle mého soudu veškerá kritéria a požadavky na moderní odbornou publikaci. I když je primárně určena studentům bakalářského, magisterského a doktorandského studia oborů technologie vody, vodní hospodářství a vodní stavby, technologie a ochrana životního prostředí, hydrologie, hydrogeologie, aplikovaná a krajinná ekologie, městské inženýrství a dalších, nalezne široké uplatnění i v nástavbovém vzdělávání a v praxi

např. výzkumných pracovníků, podnikových vodohospodářů, hydroanalytiků, ve státní správě atd. Předností knihy je, podobně jako v předcházejícím vydání, její encyklopedický charakter a uvádění praktických příkladů a poznatků, srozumitelných i pro pracovníky bez vysokoškolského vzdělání v příslušném oboru. Kniha, do které uznávaný pedagog přetavil své odborné znalosti a zkušenosti, vyniká přesnými formulacemi, výstižným vysvětlením všech používaných pojmů a definic, přehledností a vyvážeností obsahu jednotlivých kapitol. Na knize lze ocenit také její technické zpracování, které je dílem Vydavatelství VŠCHT Praha.

Domnívám se, že podobně, jako předcházející vydání, také toto bude velmi brzy rozebráno. Zájemcům proto doporučuji, aby s nákupem knihy příliš neváhali.

Alexander Grünwald

61. ZJAZD CHEMIKOV

7. - 11. september 2009

Vysoké Tatry, Tatranské Matliare

Vážení priatelia,

v mene organizačného a programového výboru, sponzorov a čestného predsedníctva je nám potešením Vás pozvať na náš ďalší spoločný zjazd chemikov a to opäť do Vysokých Tatier. Centrom zjazdu bude opäť ho-telový komplex Hutník situovaný v Tatranských Mat-liaroch. Určite ste si všimli, že postupne budujeme tradíciu našich tatranských zjaz-dov. Popri rôznych pozvaných prednášateľoch (PP) sa môžete tešiť na výber (po dvoch nositeľoch Nobelovej ceny) zaujímavého plenárneho prednášateľa. Novinkou bude tématický večer venovaný 80 rokom SChS a Kurz aplikácií kvantovej chémie.

Organizačný výbor

Dušan Velič - predseda

Monika Aranyosiová – výkonný tajomník

Miroslav Michalka – technická podpora

Zuzana Hloušková - hospodár

Milan Drábik – vedecký tajomník

Pavel Drašar – vedecký tajomník

Programový výbor

Prof. Ing. Dr. Jozef Tomko, DrSc. (SChS)

Doc. Ing. Viktor Milata, CSc. (SChS)

Ing. Miloš Revús (SSPCH, BA)

RNDr. Dalma Gyepesová, CSc. (SChS)

Doc. RNDr. Marta Šališová, CSc. (SChS)

Prof. Ing. Vlasta Brezová, DrSc. (SChS)

Ing. Mária Omastová, PhD. (SChS)

Ing. Marián Janek, PhD. (SChS)

RNDr. Jozef Tatiery, PhD. (SChS)

Mgr. Katarína Javorová (SChS)

Prof. Ing. Ján Labuda, DrSc. (STU, BA)

Ing. Michal Korenko, PhD. (SAV, BA)

Prof. Ing. Stanislav Biskupič, DrSc. (STU, BA)

Prof. RNDr. Jozef Čársky, CSc. (UK, BA)

Ing. Milan Vrška, CSc. (STU, BA)

Prof. RNDr. Dušan Kaniansky, DrSc. (UK, BA)

Doc. RNDr. Jozef Kuruc, PhD. (UK, BA)

Prof. Ing. Milan Remko, DrSc. (UK, BA)

Prof. Ing. Eubor Fišera, DrSc. (STU, BA)

Doc. Ing. Dušan Berek, DrSc. (SAV, BA)

Doc. Ing. Štefan Schmidt, PhD. (STU, BA)

Ing. Ján Hirsch, DrSc. (SAV, BA)

Prof. Ing. Peter Šimon, DrSc. (STU, BA)

Prof. Ing. Vasil Koprda, DrSc. (STU, BA)

Doc. Ing. Ján Reguli, PhD. (TU, TT)

Doc. RNDr. Ján Benko, CSc. (UK, BA)

Doc. RNDr. Martin Putala, PhD. (UK, BA)

Doc. RNDr. Taťána Gondová, CSc. (UPJŠ, KE)

Doc. RNDr. Mária Reháková, CSc. (UPJŠ, KE)

Doc. RNDr. Renáta Oriňáková, CSc. (TU, KE)

Prof. RNDr. Nadežda Številová, PhD. (TU, KE)

RNDr. Slávka Hamuláková, PhD. (UPJŠ, KE)

Doc. RNDr. Mária Ganajová, CSc. (UPJŠ, KE)

Doc. RNDr. Magdaléna Bálintová, PhD. (TU, KE)

Ing. Elena Kulichová (Nováky)

Sekcie:

1. Analytická a fyzikálna chémia
2. Anorganická a materiálová chémia
3. Organická chémia a polyméry
4. Vyučovanie a história chémie
5. Životné prostredie a biotechnológia
6. CHEMPROGRESS

Konferenčný poplatok:

účastník, člen*	300 €
študent, doktorand, člen*	200 €
dôchodca, člen*	250 €
příplatok za nečlena	100 €
příplatok za jednolôžkovú izbu	150 €
sprevádzajúca osoba	250 €

* ASChFS, AČChS, SChS

Poplatok zahŕňa: konferenčné materiály, ubytovanie v dvojpostelovej izbe s plnou penziou (od večere 7. 9. po obed 11. 9.), uvítací večierok, vínný a pivný večer, prestávkové občerstvenie, slávnostný večierok, plaváreň, miestny poplatok, poistenie nákladov na zásah Horskej záchrannej služby.

Termíny:

Registrácia	do 1. júna 2009
Platba	do 1. júla 2009
Abstrakt	do 1. júla 2009

Registrácia po 1. 6. 2009 pri zaplnenej ubytovacej kapacite, bude navýšená o 100 € na zabezpečenie náhradného ubytovania.

Formy prezentácie:

Poster (800 mm šírka × 1 000 mm dĺžka)
Súťaže formou komentovaných posterov
študenti, doktorandi (ceny: 150, 100, 50 €)
vedci do 35 rokov (ceny: 300, 200, 100 €)

Prednáška

Formát MS Powerpoint
pozvaná prednáška 40 min. + 10 min. diskusia
prednáška 20 min. + 5 min. diskusia
Panelová diskusia ako záver zjazdu

Abstrakt v časopise ChemZi 5/9 2009

Publikácia v nasledujúcich číslach ChemZi

Kontakt:

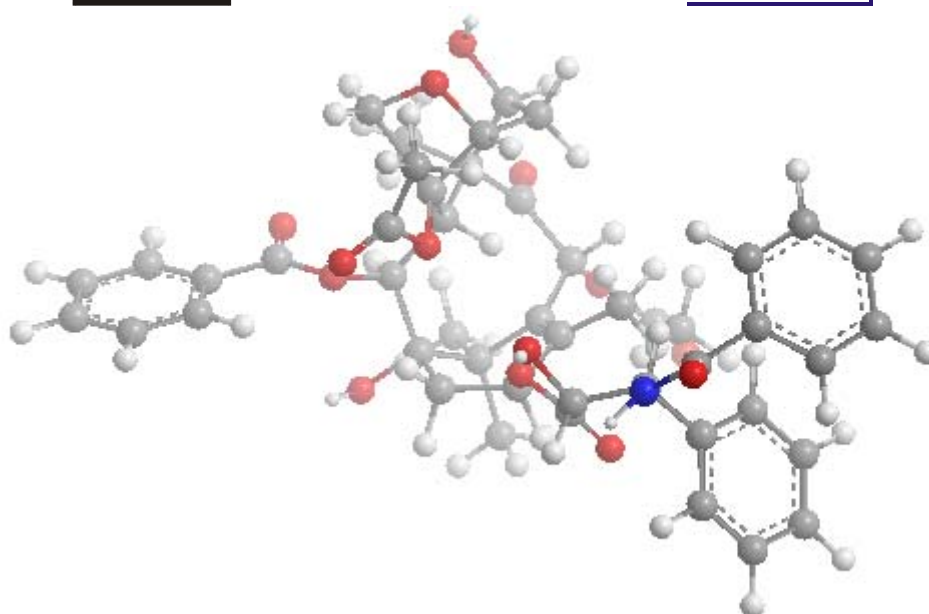
Slovenská chemická spoločnosť,
Radlinského 9/1111, 812 37 Bratislava,
fax: +421/2/52495205

e-mail: zjazd.chemikov@gmail.com

web: <http://www.schems.sk/61zjazd>



SIGMA-ALDRICH



IX. MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ
MLADÝCH BIOLOGŮ,
BIOCHEMIKŮ
A CHEMIKŮ
pořádané firmou Sigma-Aldrich

26.5. – 29.5. 2009

Devět skal – Žďárské vrchy

sborník redigovali
Radmila Řápková, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

IX. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků z Čech a Slovenska

Globalizace nezadržitelně ovlivňuje náš život a je mnohými kritizována. Jsou však i pozitivní aspekty. Společnost Sigma-Aldrich, pečující o blaho chemiků tak, jak si kdysi předsevzal její zakladatel, pan doktor Alfred Bader, pečuje o toto blaho nejen v zemích Českých, ale i na Slovensku.

Budiž vzdána čest a poklona paní ředitelce Daniele Dornerové, která se rozhodla před cca třemi roky rozšířit úspěšnou a do značné míry i prestižní soutěž mladých chemiků, biochemiků a biologů ze zemí českých i na Slovensko. Mírné počáteční rozpaky se téměř okamžitě rozplynuly a dnes je tato soutěž Slovensko – Česká tak, jako by jí bývala od počátku věků.

Řekl jsem, že je to soutěž prestižní a mohu to doložit. Chemici z chemických společností okolních států slídí kolem a pátrají, jak by takovou soutěž mohli uspořádat i oni, za pomoci místních zastoupení firmy. Pokud se to povede, měla paní ředitelka a s ní i zosnovatel této akce, kolega Martin Fusek kdysi též vizi, že by mohlo vzniknout cosi jako mezinárodní finále. Pokud vznikne, klobouk dolů. A pokud se to nepovede, budeme mít v Čechách a na Slovensku stále naši „Ameriku“, akci, která získala toto kolokviální pojmenování po jednom z míst u Valašského Meziříčí, kde se konal jeden z prvních ročníků.

Americe zdar!

Pavel Drašar

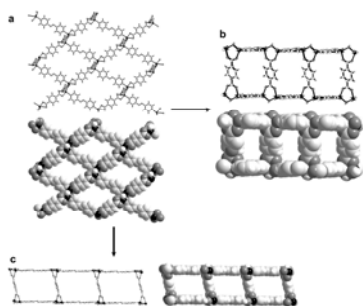
PRÍPRAVA, VLASTNOSTI A ŠTRUKTÚRA NOVÝCH
METAL-ORGANIC FRAMEWORKS NA BÁZE
4,4'-AZO(BIS)PYRIDÍNU

**MIROSLAV ALMÁŠI^{a*}, VLADIMÍR ZELENÁK^a,
ZUZANA VARGOVÁ^a a IVANA CÍSAŘOVÁ^b**

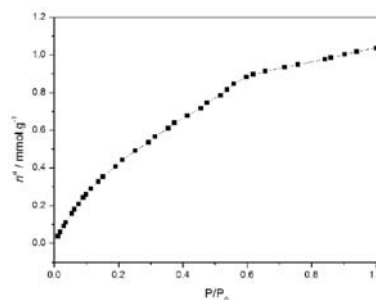
^aKatedra anorganickej chémie, Prírodovedecká fakulta
UPJŠ, Moyzesova 11, 041 54 Košice, Slovensko, ^bKatedra
anorganické chemie, Prírodovedecká fakulta UK, Praha,
Česká republika
almo2@szm.sk

Príprava, štúdium vlastností a aplikácii zlúčenín typu metal-organic frameworks (MOF) je jednou z veľmi perspektívnych oblastí dnešnej materiálovej a anorganickej chémie. MOF sa skúmajú z hľadiska možného použitia ako nosičov liečiv, katalyzátorov alebo účinných sorbentov pre záchyt a uskladnenie technologicky dôležitých plynov. Klasické MOF, napríklad zlúčeniny MOF-5 alebo MIL-101, obsahujú ako základné stavebné jednotky kation kovu a 1,4-benzéndikarboxylát (BDC) alebo 1,3,5-benzéntrikarboxylát (BTC) ako náboj kompenzujúci anión. V našej práci sme pri syntéze zlúčenín používali okrem týchto stavebných jednotiek aj 4,4'-azo(bis)pyridín (AZPY) ako neutrálny mostíkový ligand (linker).

Pri syntéze zlúčenín sme použili difúzne techniky s využitím semipermeabilnej membrány ako aj hydrotermálne syntézy v autoklávach. Použitím týchto techník sme pripravili nové zlúčeniny zloženia $\{[Zn(AZPY)(H_2O)_4](BDC) \cdot H_2O\}_n$ (**I**), $\{[Zn(AZPY)(1,4-BDC)]\}_n$ (**II**), $\{[Zn_2(OH)(AZPY)(1,4-BDC)_{1.5}] \cdot H_2O\}_n$ (**III**) (Obr.1), $\{[Zn_3(AZPY)_2(BTC)_2(H_2O)_6] \cdot 14H_2O\}_n$ (**IV**), $\{[Cu(AZPY)(HBTC)(H_2O)] \cdot AZPY\}_n$ (**V**). Pripravené zlúčeniny boli charakterizované štruktúrne použitím rtg. monokryštálovej štruktúrnej analýzy ako aj bežnými fyzikálnochemickými metódami. U zlúčeniny **III**, ktorá vo svojej štruktúre obsahuje dutiny a otvorené kanály sme študovali sorpciu oxidu uhličitého volumetrickou metódou (obr. 2). Sorpčná kapacita oxidu uhličitého, stanovená pri teplote 273 K a odčítaná pri hodnote relatívneho tlaku $P/P_0=0.9$ bola 1.04 mmol/g.



Obr. 1. Štruktúra $\{[Zn_2(OH)(AZPY)(1,4-BDC)_{1.5}] \cdot H_2O\}_n$ (**III**)



Obr. 2. Štúdium sorpcie oxidu uhličitého na **III**

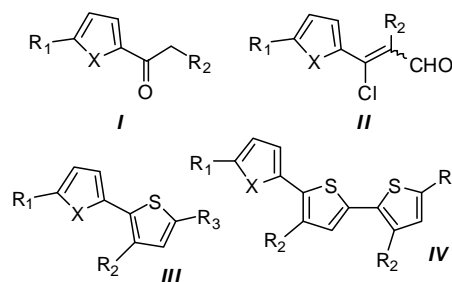
Táto práca bola podporovaná STREP projektom 6. RP “DeSANNs” (č. FP6-SES6-020133), Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. RPEU-0027-06 (OrNaMat) a projektom VEGA MŠ SR (č. 1/0119/08).

SYNÉZA π -KONJUGOVANÝCH
OLIGOETEROCYKLOV S VYSOKÝM STUPŇOM
ŠTRUKTURÁLNEJ HOMOGENITY

ANITA ANDICSOVÁ a DANIEL VÉGH

Slovenská technická univerzita, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Oddelenie organickej chémie,
Radlinského 9, SK-812 37 Bratislava
anita.andics@gmail.com

V súčasnosti je veľký záujem o funkcionalizované oligo- a polyheterocykly s vysokým stupňom štruktúrnej homogenity, ktoré sa vyznačujú nekonvenčnými elektrickými, optickými a magnetickými vlastnosťami. Design π -konjugovaných oligoheterocyklov s vysokým stupňom homogenity je prednostne založený na „stepwise“ koncepcii¹. Perspektívnou reakciou syntézy prekursorov takýchto látok je Vilsmeierova formylácia.



$R_1 = H, Cl, CH_3, \text{fluorene}; R_2 = H, CH_3, CN;$
 $R_3 = COOCH_3, H; X = CH=CH, S, N-CH_3$

V trojstupňovej syntéze je prvým krokom príprava enolizovateľných karbonylových zlúčenín **I** acetyláciou. Druhým krokom je Vilsmeierova-Hackova-Arnoldova reakcia², kde izolovaným produktom je β -chlór akroleín **II**, ktorý v ďalšom stupni cyklizuje na substituovaný tiofén **III**. K pripravenému diméru **III** sa po opakovanom použití

popísaných krokov prisyntetizuje ďalší kruh, teda sa získava oligoheterocyklus s vysokým stupňom homogenity **IV**.

Syntézou nových heterocyklických zlúčenín s presne definovanou štruktúrou sa získavajú nové materiály využiteľné v elektrotechnike, optoelektronike, nanotechnológiách.

Táto práca vznikla za podpory grantu: VEGA 1/4453/07.

LIETRATÚRA

- Müllen K., Wegner G.: v knihe *Electronic Materials: The Oligomer Approach*, Wiley-VCH, New York 1998.
- Arnold Z., Žemlička J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 24, 2385 (1959).

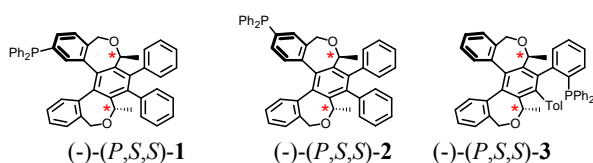
PŘÍPRAVA FOSFINOVÝCH LIGANDŮ S HELIKÁLNÍ CHIRALITOU PRO APLIKACE V ASYMETRICKÉ KATALÝZE

ANGELINA ANDRONOVA, IRENA G. STARÁ*
a **IVO STARÝ***

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
andronova@uochb.cas.cz*

Funkcionalizované neracemické helicity se jeví jako slibné ligandy pro použití v různých enantioselektivních reakcích katalyzovaných komplexy tranzitních kovů. V naší laboratoři byla vyvinuta diastereoselektivní syntéza helicity, inherentně chirálních trojrozměrných struktur, založená na [2+2+2] cyklotrimerizaci umožňující připravit tyto látky v preparativním měřítku a ve vysoké optické čistotě^{1,2}.

Byl vypracován jednoduchý a modulární syntetický přístup vedoucí k pentacyklickým helickým fosfinům (-)-(P,S,S)-**1**, (-)-(P,S,S)-**2** a (-)-(P,S,S)-**3**. Klíčová cykloisomerizace příslušných trienů za katalýzy CpCo(CO)₂ probíhá ve vysokém výtěžku a s vynikající diastereoselektivitou (> 99 % *de*).



V příspěvku bude podrobně diskutována optimalizace cyklotrimerizačních reakcí trienů i finální transformace na difenylfosfinoderiváty. Rovněž budou zmíněny aplikace takto připravených chirálních P-ligandů v enantioselektivní katalýze.

Podporováno Grantovou agenturou ČR (reg.č. 203/07/1664 a 203/09/1766) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumné centrum: Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg.č. LC512).

LITERATURA

- Starý I., Stará I. G., Alexandrová Z., Sehnal P., Teplý F., Šaman D., Rulíšek L.: *Pure Appl. Chem.* 78, 495 (2006).

- Sehnal P., Krausová Z., Teplý F., Stará I. G., Starý I., Rulíšek L., Šaman D., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 73, 2074 (2008).

OXIDAČNÝ STRES A POLYMORFIZMUS GLUTATIÓN-S-TRANSFERÁZY U ASTMY BRONCHIALE

EVA BABUŠÍKOVÁ^a, MILOŠ JESEŇÁK^b, JOZEF HATOK^a, JANA JUREČEKOVÁ^a, PETER BÁNOVČIN^b a DUŠAN DOBROTA^a

*Univerzita Komenského v Bratislave, ^aÚstav lekárskej biochemie, ^bKlinika detí a dorastu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovensko
babusikova@jfmed.uniba.sk*

Astma bronchiálne (AB) je komplexné zápalové ochorenie dýchacích ciest, ktoré spôsobuje variabilnú obštrukciu dýchacích ciest so spontánnou reverzibilitou a so zvýšenou vnímavosťou dýchacích ciest na podnety vonkajšieho prostredia. Prominentnými príznakmi AB sú kašeľ, pískot, dyspnoe a pocity napätia v hrudníku. Mnohé štúdie naznačujú, že dôležitým činiteľom sú genetické faktory. Vzťah medzi génmi na chromozómoch 5, 11 a 13 z hľadiska priority defektu vo vzťahu k dedičnosti AB je stále neobjasnený. Astma však nie je jednoduchá genetická abnormalita, ale zložitá multigenetické ochorenie so silným vplyvom prostredia. Ukazuje sa, že oxidačný stres a produkcia reaktívnych foriem kyslíka (ROS) majú dôležitú úlohu v patogenéze AB. Vyššie eukaryotické organizmy nemôžu existovať bez kyslíka, pretože mnohé esenciálne vnútrobunkové reakcie, v ktorých je potrebný kyslík, tvoria ROS. Toxicita spojená s neprimeranou produkciou týchto zlúčenín sa predchádza antioxidantnými obrannými systémami, ktoré poskytujú zdravé bunkové prostredie. Oxidačné vzplanutie je pri astme výsledkom mnohých nešpecifických zápalových ciest, na druhej strane viaceré mediátory astmatického zápalu sú efektívnymi spúšťačmi produkcie ROS. Napriek tomu, že ROS sa pripisuje úloha v rôznych ochoreniach dýchacích ciest, existuje veľmi málo štúdií uskutočnených na ľudskej populácii. V našej štúdií sme stanovovali markery oxidačného stresu a sledovali polymorfizmus glutatión-S-transferázy (GST) u detí, ktorým bola diagnostikovaná astma. Celkové množstvo tiolových skupín sa štatisticky významne nezmenilo u detí s astmou v porovnaní s kontrolnou skupinou detí, hoci ich koncentrácia sa znížila. Koncentrácia reaktívnych produktov s kyselinou tiobarbiturovou bola u detí s astmou 0,0902 ± 0,003 nmol/mg a u kontrolnej skupiny 0,0710 ± 0,004 nmol/l, čo predstavuje štatisticky významné zvýšenie (*P* < 0,05). Neprítomnosť alely pre GST-M1 predstavovala 2,33krát väčšiu pravdepodobnosť na rozvinutie astmy. Prítomnosť a neprítomnosť génu pre GST-T1 bola rovnaká v oboch sledovaných populáciách. U detí s astmou bol v porovnaní s kontrolou výraznejšie zastúpený polymorfizmus Ile/Val a Val/Val pre GST-P1. U kontrolnej skupiny prevažoval typ Ile/Ile. Získané výsledky naznačujú, že zvýšený oxidačný stres, GST-M1 nulový polymorfizmus a GST-P1 Val/Val

polymorfismus může zohrávat úlohu v patogenéze astmy bronchiální u dětí v Žilinském kraji.

Tato práce vznikla za podpory grantu Ministerstva Zdravotnictva Slovenskej Republiky 2007/47-UK-12.

VLIV DEPRIVACE A NADBYTKU ŽELEZA A VLIV ETHANOLU NA EXPRESI MOLEKUL ÚČASTNÍČÍCH SE TRANSPORTU NETRANSFERINOVÉHO ŽELEZA PŘES PLAZMATICKOU MEMBRÁNU BUNĚK VYBRANÝCH LIDSKÝCH LINIÍ

KAMILA BALUŠÍKOVÁ, JITKA NEUBAUEROVÁ, MARKĚTA DOSTALÍKOVÁ-ČIMBUROVÁ a JAN KOVÁŘ

*Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie - Oddělení buněčné a molekulární biologie, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Ruská 87, 100 00 Praha 10
kamilabalusikova@seznam.cz*

Orgánem, který je z hlediska metabolismu železa nejvíce poškozován, jsou játra. K poškození dochází zejména při zvýšených hladinách železa v organismu, neboť játra jsou schopna akumulovat jeho nadměrné zásoby uvnitř hepatocytů. Důležitým faktorem je proto mechanismus transportu železa, a to konkrétně netransferinového železa, u jaterních buněk.

Známými molekulami účastnicemi se transportu netransferinového železa jsou DMT1 (divalent metal transporter 1), membránový importér železa, Dcytb (duodenal cytochrom b-like), membránová ferrireduktasa, ferroportin, membránový exportér železa, hephaestin, membránová ferroxidasa, a ceruloplasmin, cytoplazmatická ferroxidasa.

Cílem naší práce bylo zjistit, zda při deprivaci, respektive nadbytku železa, dochází ke změně exprese daných molekul a tedy k případné regulaci absorpce či vylučování železa těmito proteiny u jaterních buněk. Jako model nám posloužily buňky lidského hepatocelulárního karcinomu HEP-G2. V souvislosti se skutečností, že také u alkoholických pacientů dochází ke zvýšené akumulaci železa v játrech, což může mít za následek rozvoj alkoholického jaterního onemocnění (ALD), přičemž mechanismus absorpce železa v játrech u ALD není dosud plně objasněn, jsme sledovali, jak expresi transportních molekul ovlivňuje navíc přítomnost ethanolu v médiu.

Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný mechanismus regulující vylučování iontů železa z těla, je hladina železa v organismu regulována především absorpcí železa z potravy střevními enterocyty. Jako další model jsme proto zvolili buňky lidského kolorektálního karcinomu Caco-2, přičemž nás dále zajímalo, zda mechanismus transportu železa, na úrovni vstupu železa do organismu, může ovlivňovat i alkohol procházející trávicím traktem.

Ukázali jsme, že změny v dostupnosti železa, tj. deprivace železa a nadbytek železa¹, respektive přítomnost ethanolu, ovlivňují expresi DMT1, Dcytb, ferroportinu,

hephaestinu a ceruloplasminu na úrovni mRNA i proteinů v závislosti na daném typu buněk.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru 3. LF UK: VZ MSM0021620814.

LITERATURA

1. Balusikova K., Neubauerova J., Dostalíkova-Cimburova M., Horak J., Kovar J.: Mol. Cell. Biochem. 321, 123 (2009).

LIDSKÉ EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY AKTIVUJÍ MOLEKULÁRNÍMI MECHANISMY, KTERÉ JSOU ZAPOJENY DO SIGNÁLNÍCH DRAH PŘI POŠKOZENÍ DNA

TOMÁŠ BÁRTA^{a,b}, VLADIMÍR VINARSKÝ^a, ZUZANA HOLUBCOVÁ^a, DÁŠA DOLEŽALOVÁ^{a,b}, PETR DVOŘÁK^{a,b} a ALEŠ HAMPL^{a,b}

*^aOddělení molekulární embryologie, Ústav experimentální medicíny AVČR, v.v.i., Kamenice 5, 625 00 Brno-Bohunice,
^bBiologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno-Bohunice
tom.barta@gmail.com*

Lidské embryonální kmenové (hES) buňky jsou pluripotentní buňky derivované z embryoblastu preimplantačních blastocyst. Díky své schopnosti diferencovat se do všech zárodečných vrstev jsou potencionálním zdrojem pro buněčnou terapii. Potencionální využití v buněčné terapii je však limitováno akumulací poškození DNA během kultivace hES buněk *in vitro*.

V somatických buňkách jsou v průběhu buněčného cyklu strategicky rozmístěny kontrolní body, které zajišťují integritu genomu. Regulace kontrolních bodů a buněčného cyklu v embryonálních kmenových buňkách se liší od regulace v diferencovaných somatických buňkách. Cílem této studie bylo zjistit, zda hES buňky obsahují molekulární komponenty zapojené do ATM/ATR signalizace a zda mají plně vyvinuty a funkční G1/S a G2/M kontrolní body.

V této studii jsme stanovili efekt různých dávek UVC záření na hES buňky. Zjistili jsme, že poškození DNA v G1 fázi způsobuje akumulaci hES buněk v G1/S fázi buněčného cyklu, což naznačuje přítomnost G1/S kontrolního bodu. CDK2 a regulátoři její aktivity (Cdc25A a p21) jsou klíčové molekuly, které jsou odpovědné za blok v G1/S kontrolním bodu. Při poškození DNA dochází k rychlé aktivaci stresových drah (p38, p53) s následnou degradací Cdc25A a snížením aktivity CDK2 i CDK1. U hES buněk není za snížení aktivit CDK1/2 zodpovědný p21, ale rychlá degradace aktivační Cdc25A fosfatasy.

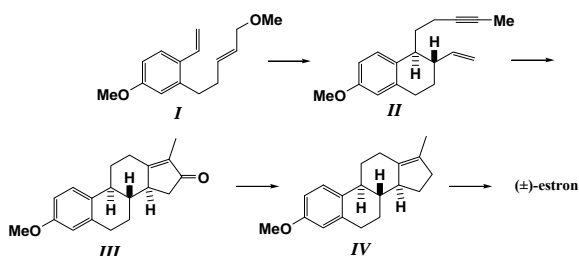
Tato práce vznikla za podpory grantu MSM0021622430, AV0Z50390512, AV0Z50390703, 1M0538, LC06077, LSHG-CT-2006-018739.

FORMÁLNÍ TOTALNÍ SYNTÉZA ESTRONU

ROBERT BETÍK^a a MARTIN KOTORA^{a,b}^aKatedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2^bÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
rbetik@seznam.cz; kotora@natur.cuni.cz.

Naším cílem bylo vyvinout novou stereoselektivní a enantioselektivní metodu přípravy látek se steroidním skeletem, která by umožňovala přípravu jejich *ent*-derivátů. Nedávno byl publikován nový syntetický postup přípravy steroidního skeletu, který byl založený na opakované cyklizaci α,ω -dienů pomocí Cp_2ZrBu_2 a následné reakci s allylhalogenidy^{1,2}. Byla jím i realizována formální totální syntéza estronu³. My jsme se rozhodli tuto metodiku modifikovat a zefektivnit.

Nová formální totální syntéza estronu využívá cyklizace dienu **I** (připraveného podle literatury^{1,2}) pomocí Cp_2ZrBu_2 následované reakcí s 2-brombuta-2,3-dienem katalyzované CuCl . Cyklizace probíhá diastereoselektivně v jednom kroku za vzniku enynu **II**. Dalším krokem, při němž vznikají steroidní kruhy C a D, je Pausonova-Khandova reakce enynu **II** zprostředkovaná $\text{Co}_2(\text{CO})_8$, která vedla, téměř kvantitativně a diastereoselektivně, k derivátu **III**. Posledním krokem je redukce keto skupiny pomocí směsi $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$. Tato reakce poskytla známý meziprodukt **IV**, který může být převeden na estron ve 2 krocích⁴. Celkově byl meziprodukt **IV** připraven z komerčně dostupných látek v 7 krocích (50 %). Nejnovější výsledky ukazují, že modifikace tohoto postupu umožní i enantioselektivní přípravu derivátu **IV**.



Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 1M0508.

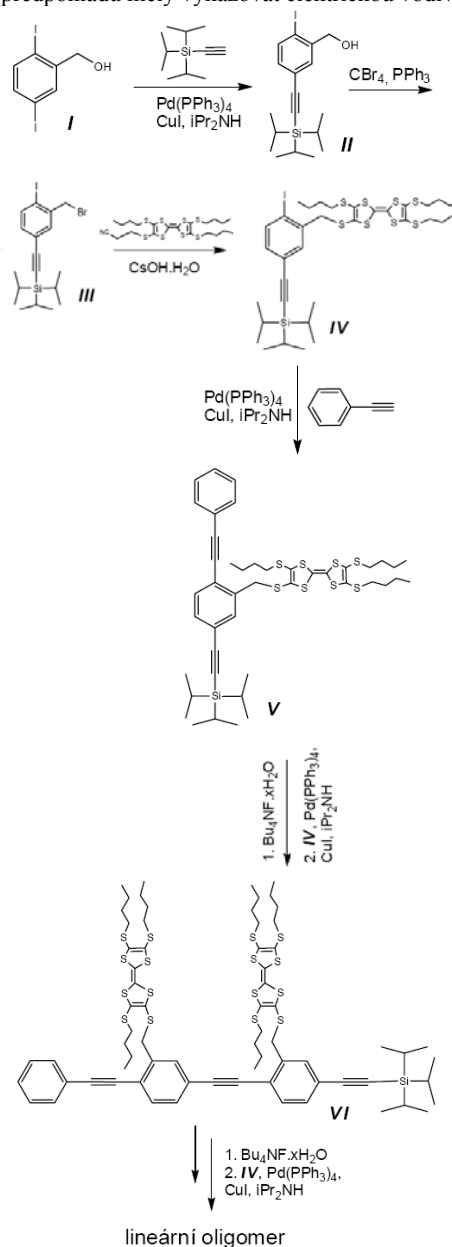
LITERATURA

- Herrmann P., Kotora M., Buděšínský M., Šaman D., Císařová I.: *Org. Lett.* 8, 1315 (2006).
- Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: *Chem. Lett.* 36, 1268 (2007).
- Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: *J. Org. Chem.* 73, 6202 (2008).
- Barlett P. A., Johnson, W. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 7501 (1973).

OLIGOFENYLENACETYLENY NESOUCÍ TETRATHIAFULVALENOVÉ JEDNOTKY JAKO MATERIÁLY PRO MOLEKULÁRNÍ ELEKTRONIKU

VÁCLAV DEKOJ, MARTIN BĚLOHRADSKÝ a IVO STARY*^{*}Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
dekoj@uochb.cas.cz

Připravované lineární oligomery by dle všech předpokladů měly vykazovat elektrickou vodivost.



Schema 1. Základní koncepce přípravy lineárních oligomerů

K využití naznačené syntetické cesty došlo díky objevu selektivity Sonogashirovy reakce I → II, kde je jod v meta-poloze reaktivnější a očekávaný izomer látky II při ní vůbec nevzniká. Je tedy možné jednoduchou syntetickou sekvencí syntetizovat oligomery s jistotou ekvidistance tetrathiafulvalenových (TTF) jednotek. Na oligomerech bude studována změna absorpce v UV-VIS oblasti v závislosti na oxidačním stavu TTF jednotek a dále také srovnání elektrochemických a absorpčních vlastností jednotlivých oligomerů v závislosti na počtu TTF jednotek v oligomeru.

RICINUSIN– NOVÝ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTID Z KLÍŠTĚTE *Ixodes ricinus*

VERONIKA DORŇÁKOVÁ^{a,*}, NATALIIA RUDENKO, MARYNA GOLOVCHENKO a LIBOR GRUBHOFFER

*Biologické Centrum v.v.i., AV ČR - Parazitologický ústav a Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
dornav00@prf.jcu.cz*

Nový gen kódující antimikrobiální protein – ricinusin – byl charakterizován u klíštěte *I. ricinus*. Získaná 405 bp dlouhá cDNA obsahuje jeden čtecí rámec (135 aminokyselin), který kóduje protein velký 14,5 kDa s 19 aminokyselin dlouhou signální sekvencí. Ricinusin obsahuje konzervativní šestici cysteinů typickou pro defensiny a unikátní HEAHEAHEA repetice, čímž se od defensinů liší. Analýza proteinové sekvence prokázala podobnost ricinusinu k antimikrobiálním proteinům z klíštěte *Boophilus microplus* (microplusin)¹ a *Amblyomma hebraeum* (hebraein)² se stejnými vlastnostmi. Ricinusin se tímto stal třetím členem nové rodiny klíštěcích obranných proteinů bohatých na histidin.

Diferenciální exprese ricinusinu byla indukována sáním u larvy, nymfy i dospělci. Výrazná exprese tohoto genu ve slinných žlázách a ve střevě ukázala, že ricinusin se podílí na širokém spektru imunitních reakcí. Analýza genomové sekvence ricinusinu prokázala přítomnost intronů. Rekombinantní protein, získaný pomocí bakteriálního expresního systému, byl použit pro testování antimikrobiální aktivity ricinusinu a jeho účinnosti proti patogenům. Byla určena minimální inhibiční koncentrace (MICs) ricinusinu proti jednotlivým Gram-negativním a Gram-positivním bakteriím.

Tato práce vznikla za podpory grantu MSM 6007665801 a C06009 (Ministerstvo školství ČR), Grantová agentura České republiky (524/03/H133 a 524/06/1479), Z60220518 (výzkumný projekt Parazitologického ústavu AV ČR).

LITERATURA

1. Fogaça A.C., Lorenzini D.M., Kaku L.M., Esteves E., Bulet P., Daffre S.: *Dev.Comp. Immunol.* 28, 191 (2004).

2. Lai R., Takeuchi H., Lomas L.O., Jonczy J., Rigden D.J., Rees H.H., Turner P.C.: *FASEB J.* 18, 1447 (2004).

FIBRINOGENU PODOBNÉ PROTEINY U KLÍŠTĚTE *Dermacentor marginatus*

JARMILA DUPEJOVÁ^{a,*}, JÁN ŠTĚRBA^a, MARIE VANCOVÁ^{a,b}, VOJTĚCH KOVÁŘ^{a,b} a LIBOR GRUBHOFFER^{a,b}

*^aPřírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, ^bParazitologický ústav, Biologické centrum, AVČR, v.v.i, Branišovská 31, České Budějovice
dupejova@paru.cas.cz*

Proteiny FReD (fibrinogen-related domain) patří mezi lektiny a u bezobratlých živočichů se pravděpodobně účastní procesů přirozené imunity. Z hemolymfy klíštěte *Ornithodoros moubata* byl již dříve izolován a charakterizován FReD protein Dorin M. V této práci byly identifikovány a charakterizovány metodami analytické biochemie a molekulární biologie další podobné proteiny u klíštěte *Dermacentor marginatus*.

Konkrétní proteiny FReD1, 2, 3 a 4 byly detegovány protilátkami proti Dorinu M. Všechny tyto proteiny jsou glykosylovány, a mají vazebnou specifitu pro N-acetyl hexosaminy, sialoglykoproteiny a kyselinu sialovou.

FReD1 (36 kDa) je modifikován glykany obsahujícími D-mannosu a terminální D-galaktosu; FReD2 a FReD3 (79/80 kDa) jsou pravděpodobně izomery, které ve svých glykanech obsahují D-mannosu a terminální kyselinu sialovou; FReD4 (177 kDa) ve svých glykanech o obsahuje D-mannosu.

Imunofluorescencí bylo prokázáno, že se všechny proteiny nachází ve střevě, FReD1 a 2/3 byly lokalizovány v hemocytech a FReD1 a 4 ve slinných žlázách *D. marginatus*.

Na základě molekulárně biologických analýz byl dále u *D. marginatus* identifikován protein DMFREP1. Nukleotidová a aminokyselinová sekvence potvrdily, že je tento protein blíže příbuzný FReD proteinu z klíštěte *Ixodes ricinus*, *Ixoderinu A*. Další dva nové proteiny FReD byly nalezeny u klíšťat *Haemaphysalis punctata* a *Hyalomma impeltatus*. Fylogenetické analýzy třech nových proteinů FReD potvrdily jejich příbuznost s ostatními klíštěcími proteiny FReD, a stejně tak i s Tachylektiny 5A a 5B (*Tachypleus tridentatus*). Jejich sekvence jsou uloženy v databázi Genbank pod čísly FJ176386, FJ176387, FJ176388.

TOTÁLNÍ SYNTÉZA 4-F₃₁-NEUROPROSTANU A JEHO 4-EPIMERU

BARBARA EIGNEROVÁ^{a,b}, THIERRY DURAND^c
a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, 128 43 Praha 2; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, 166 10 Praha 6; ^cIBMM, UMR CNRS 5247, Université Montpellier 1 et 2, Faculté de Pharmacie, 15. Av. Ch. Flahault, F-34093 Montpellier cedex 05, France
katora@natur.cuni.cz

Polynenasycené mastné kyseliny (PMK) hrají klíčovou roli v obraně organismů vůči oxidativnímu stresu. Působením volných radikálů jsou přeměňovány *in vivo* na odbouratelné organické sloučeniny jako neuroprostany, isoprostany a fytprostany. Nedostatek PMK může být příčinou vážných neuronálních poškození, o jejichž rozsahu vypovídá měření koncentrace neuroprostanů v nervové tkáni. Pro širší biologickou studii vyvstal požadavek na větší množství 4-F₃₁-neuroprostanu **Ia**, a tudíž byla v rámci tohoto projektu vypracována jeho první totální syntéza¹. Příprava intermediátu **IV** je popsána ve 13 krocích^{2,3}, následuje kruciólní připojení dvou postranních řetězců Wittigovou a Horner-Wadworth-Emmonsovou olefinací (schéma 1)¹. Biologická studie bude zahrnovat i zkoumání fluorovaných analogů těchto sloučenin.

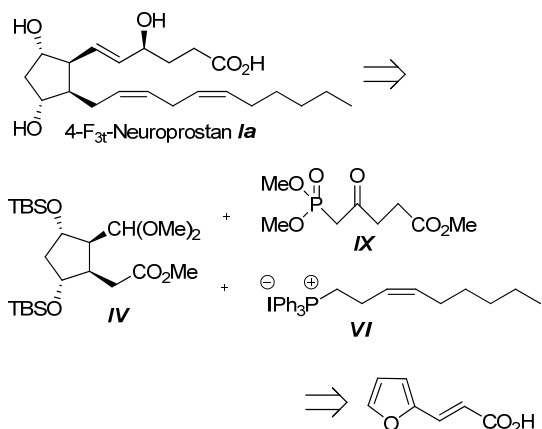


Schéma 1. Retrosyntéza 4-F₃₁-neuroprostanu **Ia**

Tato práce vznikla za podpory Centra pro nová antivirotika a antineoplastika MŠMT (projekt č. 1M0508) a grantů č. MSM0021620857 MŠMT a University Montpellier 1 BQR-2008.

LITERATURA

1. Auvinet A.-L., Eignerová B., Guy A., Kotora M., Durand T.: *Tetrahedron Lett.*, v tisku.
2. Pinot E., Guy A., Guyon A. L., Rossi J. C., Durand T.: *Tetrahedron: Asymmetry* 16, 1893 (2005).
3. Pinot E., Guy A., Fournial A., Balas L., Rossi J. C., Durand T.: *J. Org. Chem.* 73, 3063 (2008).

KOMPLEXNÁ ÚLOHA FGF-2 U ĽUDSKÝCH EMBRYONÁLNYCH KMEŇOVÝCH BUNIEK

LÍVIA EISELLEOVÁ^a, KAMIL MATULKA^a,
MICHAELA KUNOVÁ^a, VLADIMÍR
ROTREKL^a, ALEŠ HAMPL^{a,b} a PETR DVOŘÁK^{a,b}

^aBiologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno; ^bOddělení molekulární embryologie, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Kamenice 5, 625 00 Brno
eiselle@med.muni.cz

Ľudské embryonálne kmeňové (hES) bunky sú unikátnym bunkovým typom, ktorý prináša predovšetkým dva veľké prísľuby: pochopenie molekulárnych mechanizmov ľudského vývinu a chorôb, a stávajú sa zároveň nekonečným zdrojom pre bunkové terapie. Zásadným krokom k naplneniu oboch týchto smerov je otázka, ako udržať a expandovať hES bunky v nediferencovanom stave bez genetických abnormalít. Naše súčasné poznatky o optimálnom kultivačnom prostredí zahŕňajú okrem iného aj niektoré rastové faktory, z nich najdôležitejší, ktorý sa rutinne používa ako prídavok do kultivačného média, je FGF-2 (fibroblastový rastový faktor 2).

V predošlých štúdiách sme ukázali, že prídavok exogénneho FGF-2 stimuluje MAPK signálnu dráhu aktiváciou FGFRs (FGF receptorov) a expresiou "kmeňových" génov, a potláča gény apoptózy a bunkovej smrti. Naša súčasná štúdia demonštruje komplexnú úlohu FGF-2 u hES buniek: priamo podporuje ich samoobnovu (endogénny FGF-2) a stimuluje bunkové prežívanie a adhéziu (exogénny FGF-2), čo sú dva javy, ktoré nepriamo vplyvajú na nediferencovaný rast. Syntéza FGF-2 u hESCs sa zvyšuje v odpovedi na stresové podmienky a zároveň FGF-2 zohráva protektívnu úlohu pri apoptóze indukovanej stresom. Ukazujeme tiež, že exogénny FGF-2 zvyšuje klonogénnu schopnosť hESCs. Tieto dáta naznačujú, že prídavok exogénneho FGF-2 prispieva významnou mierou k prežitiu a adhézii hES buniek.

Táto práca vznikla za podpory Ministerstva športu, mládeže a telovýchovy (MSM0021622430, LC06077, 1M0538) a Akadémie Věd ČR (AV0Z50390512, AV0Z50390703).

STUDIUM DYNAMIKY MOLEKUL VODY V ÚSTÍ TUNELU HALOGENALKANDEHALOGENAS

ANDREA FOŘTOVÁ^a, JAN SÝKORA^b, AGNIESZKA
OLŽYŇSKÁ^b, JAN BREZOVSKÝ^a, ZBYNĚK
ZDRÁHAL^c, MARTIN HOF^b a JIŘÍ DAMBORSKÝ^a

^aLoschmidtovy laboratoře, PŘF MU, 62500 Brno; ^bInstitut fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., 182 23 Praha 8; ^cOddělení funkční genomiky a proteomiky, PŘF MU, 625 00 Brno
andrea@chemi.muni.cz

Halogenalkandehalogenasy (EC 3.8.1.5) jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují štěpení vazby mezi

uhlíkem a halogenem v řadě halogenovaných alifatických uhlovodíků. Aktivní místo vnořeno mezi hlavní a čepičkovou doménu halogenalkandehalogenas je spojeno s povrchem proteinu tunelem, který slouží jako transportní cesta pro substráty a produkty. Ústí tunelu představuje evolučně nejvariabilnější oblast enzymu.

Tato práce je zaměřena na studium dynamiky molekul vody v blízkosti ústí tunelu u dvou halogenalkandehalogenas DbjA a DhaA s použitím časově rozlišené fluorescenční spektroskopie a počítačové simulace molekulové dynamiky. Pro použití časově rozlišené fluorescenční spektroskopie je nutné protein označit fluorescenční sondou. V projektu jsme využili mechanismus kovalentního označení halogenalkandehalogenas nesoucích mutaci v katalytickém histidinu fluorescenční sondou kumarin a vyvinuli jsme protokol umožňující specifické označení ústí tunelu a současnou eliminaci volných a nespecificky vázaných molekul kumarinu. Časově rozlišená emisní spektra komplexu kumarinu s halogenalkandehalogenasou prokázala rozdíly v polaritě, dostupnosti a pohyblivosti sondy a jejího okolí u obou studovaných enzymů. Kumarin vázaný v halogenalkandehalogenase DbjA je pohyblivější a vykazuje vyšší míru hydratace než sonda vázaná v halogenalkandehalogenase DhaA. Okolí kumarinu vázaného v halogenalkandehalogenase DbjA ukazuje vyšší polaritu a nižší viskozitu než je tomu u DhaA. Experimentální data korespondují výsledky získanými z výpočtů molekulové dynamiky. Výsledky odrážejí geometrii ústí tunelu patrnou z krystalové struktury obou enzymů. Dynamika solventu v ústí tunelu bude studována u dalších halogenalkandehalogenas a jejich variant konstruovaných místně-cílenou mutagenézí.

Tato práce vznikla za podpory GA ČR 203/08/0114 (M.H., J.D.), MŠMT ČR (J.S.), LC06010 (J.B.), MSM0021622412 (J.D.), MSM0021622413 (A.J.) a MSM0021622415 (Z.Z.).

BENZOTRISTIAZOL - NOVÁ ŠTRUKTÚRNA DOMÉNA PRE ZLÚČENINY S NELINEÁRNO OPTICKOU ODOZVOU

ANDREA FÜLÖPOVÁ, PAVOL ZAHRADNÍK a IVICA SIGMUNDOVÁ

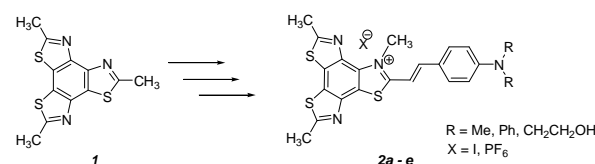
Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
fulopovaa@fns.uniba.sk

Organické molekuly obsahujúce vo svojej štruktúre konjugované systémy vykazujú zaujímavé elektrické, spektrálne a iné vlastnosti. Všeobecne tieto zlúčeniny možno popísať schémou donor – π -konjugovaný systém – akceptor. V súčasnosti sa rozvíja štúdium kvadrupolárnych a oktapolárnych štruktúr. Tieto zlúčeniny vykazujú nelineárne optické vlastnosti, t.j. po prechode žiarenia s veľkou intenzitou cez ne dochádza k zmenám fyzikálnych vlastností žiarenia. Je možné pozorovať NLO javy ako napr. zdvojnásobenie frekvencie žiarenia alebo dvojfotónovú absorpciu, teda súčasnú absorpciu dvoch fotónov a prenos

energie na jeden elektrón. Toto nazývame aj kubickou nelineárnou optickou odozvou. Materiály s NLO vlastnosťami majú široké uplatnenie nielen vo fotonike, prenose optických údajov, ale aj v neinvazívnej biomedicínskej diagnostike a terapii.

Z hľadiska chemickej štruktúry a fotochemickej a termickej stability sú vhodnými derivátmi látky obsahujúce heterocykly. Zameriavame sa na syntézu a teoretické štúdium spektrálnych vlastností a elektrónových charakteristík oktapolárnych štruktúr, konkrétne derivátov benzotristiazolu. Na teoretické štúdium elektrónových vlastností cieľových zlúčenín boli použité semiempirické kvantovochemické výpočty.

Naším cieľom bolo zoptimalizovať prípravu 2,3,8-trimetylbistiazolo[4,5-e; 5,4-g]-1,3-benzotiazolu (**1**), pripraviť jeho deriváty (**2a - e**) a študovať ich elektrické a optické vlastnosti.



INTERAKCE STRUKTURNÍ A OBALOVÝCH PROTEINŮ U RETROVIRŮ

PETRA GRZNÁROVÁ^a, JAN LIPOV^a, JASMINE RAINEY^b, ERIC HUNTER^b a TOMÁŠ RUMIL^a

^aVysoká škola chemicko technologická Praha, Technická 3, 166 28 Praha; ^bYerkes National Primate Research Center, Gatewood Rd 954, Atlanta 30329, USA
petra.grznarova@vscht.cz

Transport retrovirových obalových glykoproteinů a jejich interakce se strukturním polyproteinem Gag v pozdní fázi životního cyklu viru zatím nejsou plně objasněny. Tento projekt je zaměřen na retroviry typu D, mezi které patří i Mason-Pfizerův opičí virus, jehož částice jsou skládány v cytoplasmě infikované buňky a následně transportovány k plasmatické membráně.

Pro studium transportu obalových glykoproteinů a jejich interakcí s polyproteinem Gag byly připraveny konstrukty pro expresi obalových glykoproteinů fúzaných s fluorescenčním proteinem (žlutý, modrý a červený fluorescenční protein), a to vložením genu pro daný fluorescenční protein za sekvenci kódující cytoplasmatický konec povrchové podjednotky obalových glykoproteinů. Dále byly připraveny i konstrukty pro expresi retrovirového strukturního polyproteinu Gag fúzaného se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP), a to vložením genu pro GFP do expresního vektoru obsahujícího gen pro polyprotein Gag a sekvenci pro obalové glykoproteiny. Správnost vložení byla ověřena sekvencí a plasmidy byly transfekovány do buněk tkáňové linie COS-1 (buňky ledvin opice *African green monkey*). V různých časových intervalech od transfekce byly tyto buňky pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Expresie fúzních

proteinů a jejich inkorporace do složených virových částic byla ověřena pomocí tzv. „pulse chase“ experimentu. Transport obou polyproteinů v reálném čase byl sledován i v dalších dvou buněčných liniích. Pohyb virových proteinů značených fluorescenčními proteiny v infikované buňce a jejich potenciální interakce byly pozorovány pomocí „Delta Vision Live Imaging“ mikroskopu v reálném čase. Prvotní pozorování naznačují, že Gag migruje v kooperaci s obalovými glykoproteiny a buněčnými vesikuly. Tento předpoklad bude předmětem podrobnějšího ověřování v dalších experimentech.

Tato práce vznikla za podpory grantů Ministerstva školství IM6837805002, MSM 514 6046137305, ME 904 a Grantové agentury České republiky KAN200100801, KAN208240651.

ZMENY SYNTÁZ OXIDU DUSNATÉHO V PRIEBEHU ISCHÉMIE A REPERFÚZIE MYOKARDU A OVPLYVNENIE SIMVASTATÍNOM

**ANNA HARČÁROVÁ^a, MONIKA BARTEKOVÁ^b,
PETER KRÉNEK^a, ADRIANA ADAMEOVÁ^a, JANA
MATEJÍKOVÁ^b, TÁŇA RAVINGEROVÁ^b
a MAGDALÉNA KUŽELOVÁ^a**

^a*Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta UK, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava; ^bÚstav pre výskum srdca SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava
harcarova@fpharm.uniba.sk*

Oxid dusnatý produkovaný endotelovou NO syntázou (eNOS) znižuje ischemicko-reperfúzne poškodenie myokardu (IRPM), nadmerná produkcia indukovateľnou NO syntázou (iNOS) priebeh ischemie a reperfúzie zhoršuje¹. Diabètes, hypercholesterolemia a niektoré hypolipidemiká ovplyvňujú expresiu a funkčnosť syntáz NO. Naše predchádzajúce výsledky dokázali, že uvedené faktory významným spôsobom zasahujú do procesu IRPM². Cieľom práce preto bolo sledovať zmeny expresie proteínov eNOS, jej aktívnej fosforylovanej formy pSer1177eNOS a iNOS počas ischemie a reperfúzie myokardu potkanov s vyvolaným diabétom (streptozotocín, 80 mg/kg *i.p.*) a hypercholesterolemiou (tukovo-cholesterolová diéta, 20 g/deň) a premedikovaných hypolipidemikom simvastatínom podávaným ako súčasť stravy (10 mg/kg/deň). Globálna ischemia (30 min) a reperfúzia (120 min) sa vyvolala na izolovaných srdciach podľa Langendorffa. Expresia vybraných proteínov sa sledovala v ľavej komore myokardu s využitím metód SDS-PAGE a Western Blot.

Počas ischemie sa vo všetkých sledovaných skupinách signifikantne znížil ($P < 0,01$) podiel fosforylovanej formy eNOS v tkanive ľavej komory myokardu. Po dvojhodinovej reperfúzii sme významné obnovenie fosforylácie zaznamenali len u kontrolných zvierat ($P < 0,001$) a potkanov s indukovaným diabétom a hypercholesterolemiou premedikovaných simvastatínom ($P < 0,001$). V celkovej expresii eNOS sme nezaznamenali významné zmeny. Premedikácia diabeticko-hypercholesterolemických potkanov simvastatínom signifikantne znížila expresiu iNOS v porovnaní

s rovnakou nepremedikovanou skupinou ($P < 0,05$). Simvastatín ovplyvnil expresiu iNOS a dynamiku fosforylácie eNOS, čo môže prispievať k protektívnym účinkom na IRPM.

Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA 1/4296/07 a FaFUK/34/2008.

LITERATÚRA

- Judgutt B. I.: Heart Fail. Rev. 7, 391 (2002).
- Adameová A., Kuželová M., Faberová V., Švec P.: Pharmazie 61, 807 (2006).

KOLONIE *S. cerevisiae* A ROLE *FLO11* A DALŠÍCH GENŮ V JEJICH STRUKTUROVANOSTI

**MARKÉTA HILSKÁ, BLANKA JANDEROVÁ
a ZDENA PALKOVÁ**

*Katedra genetiky a mikrobiologie, Univerzita Karlova, Viničná 5, 128 44 Praha 2
mark.hill@post.cz*

Buňky kvasinky *S. cerevisiae* vytvářejí při růstu na pevném médiu kolonie představující mnohobuněčné organizované struktury, ve kterých dochází k mezibuněčným interakcím. Tyto interakce pak mají vliv na formování a morfolonii kvasinkové kolonie, která je za daných podmínek charakteristická pro určitý rod, druh i kmen¹. Kvasinkové kolonie druhu *S. cerevisiae* jsou obvykle nestrukturované, téměř hladké, kmen *S. cerevisiae* $\Sigma 1278$ však vytváří kolonie silně zvrásněné. Roli ve vytváření této morfologie by mohl hrát protein buněčné stěny Flo11 či další komponenty buněčné stěny.

Cílem této práce bylo pokusit se objasnit roli genu *FLO11* a dalších genů podílejících se na syntéze buněčné stěny, v morfolonii kolonií kmene ΣS^h odvozeného od *S. cerevisiae* $\Sigma 1278$. Byl studován vliv různých zdrojů uhlíku na morfolonii kolonií a buněk, schopnost buněk zarůstat do agaru a vytvářet agregáty. V koloniích byla sledována exprese *FLO11* s použitím Northern blot analýzy a měřením fluorescence fúzního proteinu Flo11-GFP. Časový průběh lokalizace proteinu Flo11-GFP v buňkách byl sledován také pomocí fluorescenční mikroskopie. Výsledky experimentů ukazují, že kvantita a lokalizace fúzního proteinu Flo11-GFP, v daném čase vývoje kolonie závisí na zdroji uhlíku v kultivačním médiu. Expresie *FLO11* na médiích se zdrojem uhlíku glycerolem nebo ethanolem byla oproti fermentovatelným zdrojům výrazně vyšší. Glycerol a ethanol tedy pozitivně ovlivňují expresi genu *FLO11*, jejíž vyšší intenzita zároveň odpovídala výraznějšímu zvrásnění kolonií. Dále byl u kmenů s delecemi některých genů sledován vliv změn v obsahu komponent buněčné stěny na zvrásněnost kolonií.

Práce byla podporována granty IAA500200506 a LC531.

LITERATURA

- Palková, Z., Váchová, L.: Int. Rev. Cytol. 225, 229 (2003).

CENTROSOMÁLNÍ ABNORMALITY - POTENCIÁLNÍ ZDROJ GENETICKÉ NESTABILITY LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK?

**ZUZANA HOLUBCOVÁ^a, TOMAŠ BÁRTA^{a,b}, DÁŠA
DOLEŽALOVÁ^{a,b}, PETR DVORÁK^{a,b} a ALEŠ
HAMPL^{a,b}**

^aBiologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita,
Kamenice 5, 625 00 Brno; ^bOddělení molekulární
embryologie, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.,
Kamenice 5, 625 00 Brno
zholub@med.muni.cz

Lidské embryonální kmenové (hES) buňky jsou nediferencované pluripotentní buňky derivované z lidské blastocysty. Mohou dát vzniknout jakémukoli buněčnému typu lidského těla a tím představují obrovský příslib pro buněčnou terapii budoucnosti. Jejich praktickému uplatnění v regenerativní medicíně se však staví do cesty skutečnost, že během *in vitro* kultivace tyto buňky hromadí spontánní mutace, jejichž výsledkem může být nádorová transformace. Genetickou nestabilitu buněk řady maligních nádorů provází výskyt centrosomálních abnormalit. Zjistili jsme, že kultury hES buněk se vyznačují zvýšeným výskytem buněk, které vykazují numerické aberace centrosomů. Frekvence výskytu centrosomálních abnormalit v hES buňkách je do značné míry ovlivnitelná kultivačním povrchem. Během dlouhodobé *in vitro* propagace hES buněk frekvence multicentrosomálních mitos klesá, pravděpodobně jako výsledek „adaptace“ hES buněk na kultivační podmínky. K redukci numerických centrosomálních aberací vede také chemická inhibice CDK2, jejíž aktivita v hES buňkách je neobyčejně vysoká. Tato kinasa je klíčová pro start centrosomální duplikace. Také hladina kinasu Aurora A, další molekuly spojené se zvýšeným výskytem nadpočetných centrosomů, je v hES buňkách velmi vysoká ve srovnání s lidskými somatickými buňkami. Navíc chemická inhibice její aktivity je doprovázena snížením frekvence multicentrosomálních mitos. Na základě těchto pozorování předpokládáme, že CDK2 a Aurora A se spoluúčastní na hyperamplifikaci centrosomů v hES buňkách. Abnormální mitotická dělení iniciovaná přespočetnými centrosomy se pak mohou stát zdrojem genetické nestability v kulturách lidských embryonálních kmenových buněk.

Tato práce vznikla za podpory MSM0021622430, AV0Z50390512, AV0Z50390703, IM0538, IQS500040507, NR/9293-3/200.

VÝBĚR REFERENČNÍCH GENŮ PRO STUDIUM ZMĚN GENOVÉ EXPRESE BĚHEM ŽIVOTA SAMCŮ ČMELÁKA ZEMNÍHO (*Bombus terrestris*)

**DARINA HORŇÁKOVÁ, PETRA MATOUŠKOVÁ,
JIRÍ KINDL, IRENA VALTEROVÁ a IVA PICHOVÁ**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo
nám. 2, 166 10 Praha 6
hornakova@uochb.cas.cz

Čmeláci jsou důležitými opylovači rostlin a představují vhodný model pro studium komunikace sociálního hmyzu. Pro řadu aktivit, jako např. pro značkování území a páření využívají feromony, které jsou druhově vysoce specifické. U čmeláka *B. terrestris* dochází s věkem ke kvalitativnímu i kvantitativnímu složení sexuálních feromonů, související se změnou struktury sekrečních buněk labiální žlázy samečka¹. Naším cílem je určit, které enzymy se podílejí na biosyntéze feromonů, a sledovat profil exprese genů kódujících tyto enzymy u *B. terrestris* různého stáří.

Biologická variabilita vzorků a správná kvantifikace mRNA transkripčních hladin genů vyžadují identifikaci vhodných referenčních genů, které doposud nebyly pro čmeláky identifikovány. Pomocí programů geNorm² a NormFinder³ jsme z 9 kandidátů vybrali geny pro arginin kinasu a fosfolipasu A2, které mají nejstabilnější úroveň exprese v labiální žláze i v tukovém tělese *B. terrestris* různého stáří a které mohou sloužit jako referenční geny pro normalizaci qPCR experimentů pro *B. terrestris*.

Tato práce vznikla za podpory grantu 203/09/1446 od GA ČR.

LITERATURA

- Šobotník J., Kalinová B., Cahlíková L., Weyda F., Ptáček V., Valterová I.: *J. Insect. Physiol.* 54, 1 (2008).
- Vandesompele J., De P. K., Pattyn F., Poppe B., Van R. N., De P. A., Speleman F.: *Genome Biol.* 3, 7 (2002).
- Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F.: *Cancer Res.* 64, 15 (2004).

VLIV PROBIOTICKÝCH KULTUR NA REGULACI EXPRESE ZÁNĚTLIVÝCH GENŮ V MAKROFÁZÍCH

JAN HOŠEK^a a MILAN BARTOŠ^{a,b}

^aVeterinární a farmaceutická univerzita Brno,
Farmaceutická fakulta, Palackého 1-3, 612 42 Brno;
^bGenex CZ, Viniční 235, 615 00 Brno
hosekj@vfu.cz

Probiotika jsou skupina specifických nepatogenních mikroorganismů, které vykazují pozitivní efekt na zdraví. Zahrnují nejen léčiva nebo potravinové doplňky, ale také bakteriální kultury obsažené v jídle, např. kysané mléčné výrobky. Přesný mechanismus jejich působení však doposud není, přes intenzivní studium, uspokojivě vysvětlen.

Jako zánět se označuje souhrn fyziologických reakcí na porušení integrity organismu, které vedou k ochraně proti infikování poškozeného místa, k lokalizaci poškození a zhojení. V regulaci zánětu a imunitní odpovědi hrají důležitou roli makrofágy.

V této práci jsme zkoumali vliv probiotické kultury *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium sp.* na expresi mRNA prozánětlivých genů pro TNF α (Tumor necrosis

factor α) a MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) a protizánětlivého genu pro ZFP36 (Zinc finger protein 36). Jako biologický objekt jsme zvolili makrofágy odvozené z buněčné linie THP-1. Makrofágy byly ošetřeny tepelně inaktivovanými probiotickými kulturami a následně byla sledována jejich schopnost modulovat expresi vybraných genů, resp. zánětlivou reakci vyvolanou lipopolysacharidy (LPS).

L. acidophilus indukoval statisticky nevýznamně nižší expresi všech sledovaných genů než *Bifidobacterium sp.* Spolupůsobení LPS a probiotických bakterií vykazovalo rysy kompetice u exprese TNF α a ZFP36 1 h po stimulaci. U exprese MCP-1 se naopak objevoval aditivní účinek obou komponent. Statisticky významný po 4 h stimulaci LPS byl aditivní efekt na expresi MCP-1 při ošetření *L. acidophilus* a kompetitivní účinek na expresi TNF α u *Bifidobacterium sp.*

Výsledky této studie ukazují zvýšenou schopnost *Bifidobacterium sp.* indukovat prozánětlivý expresní profil u makrofágů. Fyziologické a patofyziologické konsekvence toho zjištění budou dále podrobněji zkoumány a objasněny.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA VFU 112/2008/FaF a TANDEM FT-TA5/025, Ministerstvo průmyslu a obchodu České republiky.

HOMEBOXOVÉ GENY V GENOMU A TRANSKRIPTOMU SLADKOVODNÍ MEDÚZY *CRASPEDACUSTA SOWERBYI*. POTENCIÁLNÍ ÚLOHA *POU* GENŮ V EVOLUCI SMYSLOVÝCH ORGÁNŮ

**MILUŠE HROUDOVÁ, JAKUB RÍDL, HYNEK
STRNAD, ČESTMÍR VLČEK, PETR VOJTA, PAVEL
VOPÁLENSKÝ a VÁCLAV PAČES**

Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky,
Videňská 1083, 142 20 Praha 4
hroudova@img.cas.cz

Sladkovodní medúza *Craspedacusta sowerbyi* je zástupcem živočišného kmene žahavci (*Cnidaria*, třída *Hydrozoa*), který se v posledních letech stal předmětem intenzivního studia v oblasti molekulární genetiky a vývojové biologie. Komplexní genom žahavců kontrastující s jednoduchou stavbou jejich těl je v mnoha ohledech podobnější genomům obratlovců včetně člověka, než je tomu u některých evolučně vyšších modelových organismů (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*).

Významnou skupinou genů regulujících ontogenezi jsou homeoboxové geny. Kódují transkripční faktory a jejich nukleotidové sekvence jsou silně konzervovány napříč celou živočišnou říší. V raných stádiích vývoje organismu se podílejí na formování důležitých morfologických znaků, jako je například tělesná symetrie, na vývoji nervové soustavy a smyslových orgánů. Některé z nich jsou součástí významných signálních drah.

V rámci tohoto projektu byly v genomu *Craspedacusta sowerbyi* pomocí sekvencí z příbuzných žahavců

identifikovány 4 homeoboxové geny patřící do rodiny *POU* a 6 genů rodiny *SINE*. U genů *POU* byly metodou *in situ* hybridizace na celém jedinci lokalizovány oblasti jejich exprese. Byla připravena a částečně sekvenována kosmidová genomová knihovna *Craspedacusta sowerbyi* za účelem získání přehledu o struktuře genomu tohoto sladkovodního žahavce. Dále byla zkonstruována BAC genomová knihovna pro snadnou identifikaci a sekvenaci dalších homeoboxových genů a jejich okolí. Další část této práce spočívá ve studiu a porovnání transkriptomu *Craspedacusta sowerbyi* a *Tripedalia cystophora* (zástupce žahavců třídy *Cubozoa*). Pro sekvenování genomové DNA a cDNA využíváme moderní sekvenační technologie GS20, FLX a Titanium.

Z počtu genů na jeden průměrně 35 kb dlouhý insert v kosmidové knihovně lze usuzovat na velikost genomu *Craspedacusta sowerbyi* kolem 220 MB. Transkriptom dospělého jedince (medúzy) *Craspedacusta sowerbyi* obsahuje kolem tří tisíc unikátních genů včetně 22 genů homeoboxových. Z porovnání počtu *POU* a *SINE* genů v genomu a transkriptomu vyplývá, že se do mRNA medúzy transkribují všechny geny *POU* a polovina genů *SINE*, což svědčí o jejich významné úloze v dospělém stádiu. Expresí genů *POU6* a *POU4F3* kolokalizuje souměrně ve středu kvadrantů zvonu medúzy v místech, kde se předpokládá kumulace senzorických receptorů. Nukleotidové sekvence genů *POU4F1*, *POU4F2* a *POU4F3* poukazují na pravděpodobnou existenci společného pragenomu *POU4* před evolucioním vznikem žahavců. V transkriptomu larvy *Tripedalia cystophora* je téměř pět tisíc unikátních genů včetně 16 genů homeoboxových. Vyšší množství transkribovaných genů v tomto případě odpovídá potřebě součinnosti více faktorů v rané ontogenezi živočicha.

Tato studie byla podporována výzkumnými záměry a granty MŠMT 1M6837805002 (Center for Applied Genomics) a NB Project AC CZ AV0Z50520514.

EXPRESNÍ ANALÝZA GENŮ IMUNITNÍHO SYSTÉMU V PATOGENEZI DIABETU 1 TYPU

**MILUŠE HUBÁČKOVÁ^a, ZBYNĚK HALBHUBER^b,
VENDULA ŠTAVÍKOVÁ^a, MÁRIA KRIVJANSKÁ^b
a KATEŘINA ŠTECHOVÁ^a**

^a2. LF Univerzity Karlovy a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06
Praha 5; ^bCentral European Biosystems, U Habrovky
247/11, 140 00 Praha 4
milka@centrum.cz

Diabetes 1. typu (T1D) je orgánově specifické Th1 autoimunitní onemocnění. Th1 lymfocyty infiltrují Langerhansovy ostrůvky a jimi produkované cytokiny podporují selektivní destrukci beta buněk cytotoxickými lymfocyty, což vede zpočátku k nedostatečné a posléze nulové produkci inzulínu. Cílem studie tedy bylo analyzovat novou expresi některých imunoregulačních genů v mononukleárních buňkách periferní krve před a po stimulaci syntetickými diabetogenními autoantigeny. Pro některé

cytokiny (Th1, Th2, Th3 a Th17) byla expresní data korelována také s výsledky proteinových microarray.

Pro pilotní studii byly získány vzorky 6 pacientů s T1D, 14 příbuzných diabetika (5/14 bylo pozitivních aspoň na jednu autoprotilátku = skupina DRLpoz) a 4 zdravých kontrol. Poté byly buňky periferní krve stimulovány diabetogenními peptidy (derivovaný peptid 3 GAD65, peptid IA2 a proinzulin). Cytokiny byly měřeny pomocí ELISA a kvantitativní proteinové microarray, genová exprese pak pomocí high density Phalanx gene microarray s 30968 genomovými a 1082 kontrolními próbami. Pro následnou analýzu pak bylo vybráno 58 imunoregulačních genů.

Po specifické stimulaci byla nalezena nejvyšší genová exprese u skupiny DRLpoz. Tyto osoby mají pozitivní autoprotilátky, ale normální intravenózní toleranční glukosový test. U skupiny DRLpoz byla nalezena významně vyšší exprese pro: IFN-gamma, IL-1, -2, -6, -13, -22, -31, GATA-3, JUNB, IL-6R, STAT-6, TGF-beta. Nejvýznamnější deregulace byla zjištěna u IL-23R: 12krát pro DRLpoz a 23krát pro T1D pacienty. U T1D pacientů byla nalezena po stimulaci buněk významná aktivace genů IL-2, IL-33 a JUNB a deregulace IL-4, STAT-6 a GATA-3. Data proteinových microarray byla v souladu s daty genových expresí.

Výsledky pilotní studie naznačují, že nejen buňky Th1, ale i nerovnováha buněk Th2/Th17 může být v patogenezi T1D velmi důležitá. Další studium je však nezbytné.

Tato práce byla podporována projekty č.: 00064203 a NPVII 2B06019.

PŘÍPRAVA TERAPEUTICKY AKTIVNÍCH PEPTIDŮ V BAKTERIÍCH *Escherichia coli*

ZUZANA CHRASTILOVÁ^{a,b}, BARBORA HOUSKOVÁ^a, KLÁRA RICHTEROVÁ^a, MARTINA HLADÍKOVÁ^c, AKSANA DZIAHTSIARYK^c, MARTINA MACKOVÁ^a, VLADIMÍR KRÁL^{a,b} a JOST LUDWIG^{c,d}

^aVŠCHT Praha, Ústav biochemie a mikrobiologie, 166 28 Praha 6; ^bZentiva a.s. Praha, 102 37 Praha 10; ^cJihočeská univerzita, Ústav fyzikální biologie, 373 33 Nové Hradky; ^dUniversität Bonn, IZMB / MolekulareBioenergetik, Kirschallee 1, D-53115 Bonn, Německo
zuzana.chrastilova@vscht.cz

Pozice a význam peptidových a proteinových léčiv ve farmaceutickém průmyslu neustále sílí a stává se jeho nezastupitelnou součástí. Tzv. biofarmaceutika či bioléčiva se využívají pro léčbu řady dříve neléčitelných nebo obtížně léčitelných nemocí, jako je rakovina, autoimunitní onemocnění, cukrovka atd. V minulosti se peptidy a proteiny s farmakologickým účinkem získávaly extrakcí z přírodních zdrojů, nyní se jejich výroba přesouvá k novým, moderním technologiím, a to především k technologiím využívajícím DNA rekombinantní techniky, které navíc umožňují úpravu peptidů a proteinů „na míru“ tak, aby měly optimální farmakologické vlastnosti.

Cílem naší práce je vybrat a připravit vhodný expresní systém pro produkci terapeutického peptidu ve vysokých výtěžcích, tento peptid izolovat a purifikovat z mikrobiální kultury a nakonec připravit ve vhodné lékové formě, která peptid ochrání a dopraví do cílového místa v organismu.

Pro produkci terapeutického peptidu (TP) byla zvolena bakterie *Escherichia coli* a bylo testováno několik expresních systémů: a) exprese samotného genu pro TP, b) exprese s využitím fúzního proteinu (exprese genu pro TP ve fúzi s genem pro protein vázající maltosu (maltose binding protein, MBP)) a c) exprese s využitím genové polymerace (exprese genu pro TP v osmi kopiích, tzv. TP oktameru).

Připravili jsme několik expresních systémů využívajících výše zmíněné přístupy s cílem zvýšit výtěžek produkce peptidů v bakteriích *Escherichia coli*. Přístupy s využitím fúzního proteinu (b) a s využitím genové polymerace (c) se ukázaly jako vhodné metody přípravy terapeutických peptidů v *E. coli*. Nejvyšší výtěžky poskytuje technika genové polymerace. V současné době se zabýváme přípravou lékové formy připraveného peptidu s využitím nanočástic vhodného biodegradovatelného polymeru.

Tato práce vznikla za podpory grantu MPO 2A-2TP1/030 a MSM 6046137305.

ÚLOHA AROMATICKÝCH REZIDUÍ TRANSMEMBRÁNOVÝCH DOMÉN VE STRUKTUŘE A FUNKCI P2X RECEPTORŮ

MARIE JINDŘICHOVÁ^a, VOJTĚCH VÁVRA^a, TOMÁŠ OBŠIL^a, S. S. STOJILKOVIČ^b a HANA ZEMKOVÁ^a

^aFyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; ^bSection on Cellular Signaling, Program in Develop. Neuroscience, NICHD, NIH, Bethesda, USA
jindrichova@biomed.cas.cz

Purinergní P2X receptory (P2XR) jsou iontové kanály aktivované extracelulárním ATP. Jsou důležité při přenosu bolesti, kontrakci hladkých svalů, imunitní odpovědi a mnoha jiných fyziologických procesech. U obratlovců bylo doposud objeveno sedm P2X podjednotek (P2X1-7). Každá podjednotka se skládá ze dvou transmembránových domén (TM1, TM2), spojených extracelulární klíčkou obsahující ATP vazebné místo a intracelulárního N- a C-konce. Obě TM domény mají helikální uspořádání, tvoří pór iontového kanálu a jsou zapojeny v mechanismu jeho otevírání a zavírání (gating). TM1 doména nepřímým způsobem ovlivňuje citlivost P2XR k ATP. Použili jsme alaninovou skenovací mutagenezi a elektrofyziologickou techniku „patch clamp“ a identifikovali jsme aromatická rezidua TM1 domény P2X4R, která jsou důležitá pro funkci receptoru. Zaměnili jsme za alanin také aromatická rezidua v horní části TM1 u receptorů P2X1, P2X2, P2X3 a P2X7. Náhrada konzervovaného TM1 tyrosinu měla receptor-specifický účinek: u P2X1 vznikl nefunkční receptor; P2X2, P2X3 a P2X4 mutace měly zvýšenou citlivost k ATP doprovázenou prodlouženým uzavíráním iontového kanálu.

Funkce receptoru P2X7 nebyla významně ovlivněna. Alaninová záměna některých dalších aromatických reziduí v horní části TM1 domény P2X receptorů měla podobný, avšak menší účinek. U P2X4R jsme zjistili, že náhrada konzervovaného tyrosinu za další aminokyseliny způsobí zvýšení citlivosti receptoru v pořadí: Gly > Ile > Ala > Cys > Trp > Phe > Tyr. Dále jsme zjistili, že dvojitě mutovaný receptor se kinetikou podobá divokému typu P2X4R, pokud alaninem byla nahrazena aromatická rezidua nacházející se na stejné straně TM1 helixu jako konzervovaný tyrosin, a naopak mutace nacházející se na opačné straně helixu byla bez účinku. Výsledky prokázaly, že aromatická rezidua v horní části TM1, především konzervovaný tyrosin, jsou důležitá pro vazbu ATP a gating iontového kanálu P2X receptorů.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA AV IAA500110910.

NOVÉ *N,N*-DIOXIDY V ASYMETRICKÉ SYNTÉZE PŘÍRODNÍCH LÁTEK

ANETA KADLČÍKOVÁ^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, 128 43 Praha 2; ^bÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, 166 10 Praha 6
daise@seznaml.cz; kotora@natur.cuni.cz

Deriváty chirálních bipyridinů jsou jedny z nejvíce využívaných katalyzátorů v asymetrické syntéze, kde vystupují buď jako Lewisovské báze nebo mohou sloužit jako ligandy pro přechodné kovy. My bychom chtěli představit novou metodu pro přípravu nových nesymetricky substituovaných chirálních bis(tetrahydroisochinolinů), jejichž oxidací vzniknou dva diastereomerní bis(tetrahydroisochinolin)-*N,N*-dioxidy. Tato metoda spočívá v [2+2+2]-cyklotrimerizaci tetraynu s benzonitrilem a (*R*)-tetrahydrofuran-2-karbonitrilem za použití katalyzátoru CpCo(CO)₂ za vzniku bis(tetrahydroisochinolinu), který byl poté oxidován pomocí kyseliny *meta*-chlorperoxybenzoové na příslušný *N,N*-dioxid (schéma 1)¹⁻³.

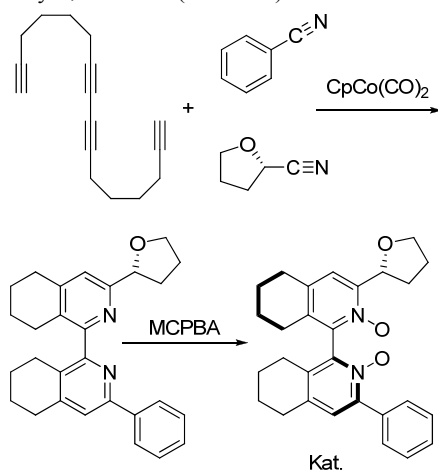


Schéma 1

Vzniklé (*R,R*)- a (*S,S*)-diastereomery byly od sebe odděleny jednoduchou sloupcovou chromatografií na silikagelu. Katalytická aktivita a asymetrická indukce připravených *N,N*-dioxidů byla vyzkoušena v allylačních reakcích benzaldehydů. Optická čistota získaných homoallylalkoholů dosahovala 96%ee (schéma 2). Tyto homoallylalkoholy sloužily jako chirální synthony pro přípravu intermediátů využitelných v syntéze přírodních látek (schéma 2).

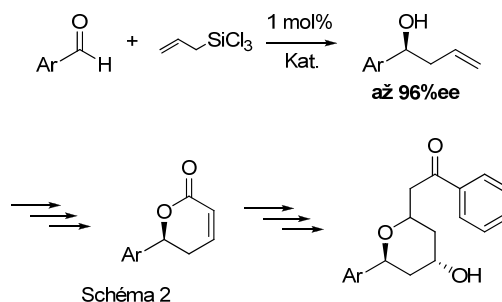


Schéma 2

Tato práce vznikla za podpory Centra základního výzkumu MŠMT (projekt č. LC06070, Struktura a syntetické aplikace komplexů přechodných kovů GA ČR (projekt č. 203/05/0102).

LITERATURA

- Hrdina R., Kadlčíková A., Valterová I., Hodačová J., Kotora, M.: *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 3185 (2006).
- Hrdina R., Valterová I., Hodačová J., Kotora M.: *Adv. Synth. Catal.* 349, 822 (2007).
- Hrdina R., Dračinský, M., Valterová, I., Hodačová J., Císařová I., Kotora M.: *Adv. Synth. Catal.* 350, 1449 (2008).

PROTEIN C-MYB SNÍŽUJE FREKVENCÍ APOPTÓZY BUNĚK KARCINOMU STŘEVA BEZ ÚČASTI PROTEINU COX2

LUCIA KNOPFOVÁ, KRISTINA NEŠPOROVÁ, PETR BENEŠ a JAN ŠMARDA

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
l.knopfova@seznam.cz

Kolorektální karcinom představuje jedno z nejčastějších nádorových onemocnění postihující obyvatele průmyslových zemí. Proces transformace střevních buněk zahrnuje postupné hromadění mutací a/nebo změny exprese několika protoonkogenů a nádorových supresorů. Jedním z nich je protoonkogen *c-myb*. Hladina proteinu *c-Myb*, který funguje jako transkripční faktor a podílí se na regulaci proliferace, diferenciace a apoptózy, je v buňkách střevních nádorů často zvýšena. Mezi geny, jejichž exprese je regulována proteinem *c-Myb* a jejichž zvýšená aktivita byla také prokázána ve střevních nádorech, patří *cox-2* kódující

cyklooxygenasu 2. Inhibitory Cox-2 jsou považovány za perspektivní protinádorová léčiva. Význam aktivace Cox-2 pro pronádorový účinek proteinu c-Myb ve střečních buňkách je tedy z klinického hlediska zajímavý a není dosud objasněn.

Cílem tohoto projektu je určit funkci proteinu c-Myb v řízení apoptózy střečních buněk a objasnit význam Cox-2 při zprostředkování účinků tohoto transkripčního faktoru. Připravili jsme deriváty buněčných linií karcinomu střeva HCT116 a HT-29 se zvýšenou, resp. sníženou hladinou c-Myb. Ověřili jsme korelaci mezi hladinou proteinu c-Myb a mírou exprese *cox-2*. Testovali jsme citlivost buněk se změněnou hladinou proteinu c-Myb ke dvěma induktorům apoptózy: k cis-platině a TRAILu. Podařilo se nám prokázat, že buňky se zvýšenou hladinou c-Myb jsou k cis-platině i TRAILu odolnější než buňky kontrolní. Analogicky, buňky se sníženou hladinou c-Myb byly k uvedeným induktorům apoptózy citlivější. Následně jsme v buňkách vystavených cis-platině a TRAILu inhibovali aktivitu Cox-2. Zjistili jsme, že inhibice Cox-2 zvyšuje viabilitu buněk ovlivněných induktory apoptózy. Tyto výsledky dokazují, že protein c-Myb snižuje frekvenci apoptózy buněk karcinomu střeva a tento anti-apoptotický účinek není zprostředkován cyklooxygenasou 2.

Tato práce byla podporována granty 204/08/H054 a 301/09/1115 GAČR a MSM0021622415 MŠMT a IAA501630801 GAAV ČR.

ŠTUDIUM PROTEÍNŮ TIAREDOXÍNOVÉHO SYSTÉMU BAKTÉRIE *Streptomyces coelicolor* A3(2)

MICHAELA KOHÁRYOVÁ^a, PETRA ŠTEFANKOVÁ^a, IMRICH BARÁK^b a MARTA KOLLÁROVÁ^a

^a*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava;* ^b*Ústav molekulární biologie SAV, Dúbravská cesta, 845 51 Bratislava 45 kollarm@fns.uniba.sk*

Všetky aeróbní organismy napřík tomu, že žijí vo vysoko oxidačnom prostredí (21 % kyslíka na úrovni hladiny mora), vnútro buniek uchovávajú v redukovanom stave. V cytoplazme boli identifikované dva dôležité systémy, ktoré uchovávajú redukovaný stav proteínov: tioredoxínový systém a glutatión/glutaredoxínový systém¹. Gram-pozitívna pôdna baktéria *S. coelicolor* A3(2) je unikátnym modelovým organizmom, pretože nedokáže syntetizovať glutatión. Tioredoxínový systém je jej hlavným redoxným systémom udržiavajúcim redoxnú homeostázu, ovplyvňujúcim aktivitu mnohých ďalších bielkovín a zúčastňujúcim sa ochrany pred oxidačným stresom. Genóm *S. coelicolor* A3 (2) kóduje až 3 gény pre tioredoxíny, 2 gény pre pravdepodobné tioredoxíny, 1 gén pre tioredoxínreduktázu a ďalšie dva pre pravdepodobnú tioredoxínreduktázu. Skonštruovali sme nadprodukčné kmene v bunkách *E. coli* pre tioredoxín A, A2, A3 a tioredoxínreduktázu B. Proteíny sme izolovali a charakterizovali ich vlastnosti. Tioredoxín A2 a A3 vykazujú odlišné vlastnosti v porovnaní s tioredoxínom A.

Tioredoxínreduktáza B má vyššiu afinitu k tioredoxínu A. Podarilo sa nám vyriešiť kryštalovú štruktúru tioredoxínu A v rozlíšení 1,5 Å (cit.²).

LITERATÚRA

- Holmgren A.: Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 237 (1985).
- Štefanková P., Maderová J., Barák I., Kollárová M., Otwinowski Z.: *Acta Crystallogr. F* 61, 1 (2005).

NOVÉ POLYMERY PRO KRYSALIZACI BIOLOGICKÝCH MAKROMOLEKUL: APLIKACE NA PROTEIN CD69

PETR KOLENKO^{a,b}, JAN DOHNÁLEK^{a,c}, JARMILA DUŠKOVÁ^a, TOMÁŠ KOVAL^c, TEREZA SKÁLOVÁ^a, ANDREA ŠTĚPÁNKOVÁ^{a,b} a JINDŘICH HAŠEK^a

^a*Ústav makromolekulární chemie AV ČR, 162 06 Praha 6;* ^b*Katedra inženýrství pevných látek, FJFI, ČVUT, Trojanova 13, 120 00 - Praha 2;* ^c*Fyzikální ústav AV ČR, Cukrovarnická 10, 162 00 Praha 6 kolenpe1@jfifi.cvut.cz, hasek@imc.cas.cz*

Krystalizace biologických makromolekul je nejproblematičtějším krokem při určování 3D struktur biologických makromolekul. Omezené množství polymerů používaných v komerčních krystalizačních sadách volá po návrhu a testování nových polymerů nebo ko-polymerů. Databáze struktur proteinů (PDB) poskytuje záznamy o stovkách struktur, ve kterých byly pozorovány interakce polymer-protein^{1,2}. Tyto interakce byly analyzovány, aby byl umožněn racionální návrh nových polymerů s potenciálem krystalizovat doposud neúspěšně testované a nové proteiny i jejich komplexy.

Soubor osmi nových polymerů byl úspěšně testován na několika proteinech. Nejlepší difrakční kvalitu prokázaly krystaly extracelulární domény lidského receptoru CD69 připravené pomocí nového polymeru. Struktura CD69 byla určena v rozlíšení 1,37 Å, což je nejvyšší rozlíšení ze všech známých struktur tohoto proteinu. Struktura podává detailnější náhled na intra- a intermolekulární interakce proteinu CD69.

Bylo prokázáno, že nové polymery použité v námi připravené krystalizační sadě jsou vhodnými kandidáty rozšiřujícími nízký počet polymerů používaných v komerčních sadách. Některé z nich mohou být použity dokonce jako kryoprotektanty.

Tato práce vznikla za podpory GA AV ČR (projekt IAA 500500701), GA ČR (projekt 305/07/1073) a Integrovaného projektu SPINE2-Complexes Evropské komise číslo 031220.

LITERATURA

- Berman H.M., Westbrook J., Feng Y., Gilliland G., Bhat T.N., Weiss H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.: *Nucleic Acid Res.* 28, 235 (2000).
- Hašek J.: *Z. Kristallogr. Suppl.* 23, 613 (2006).

PURIFIKÁCIA REKOMBINANTNÉHO TRANSKRIPČNÉHO FAKTORA NFI PRE ANALÝZU A IDENTIFIKÁCIU PROTEÍNOVÝCH PARTNEROV

**GABRIEL KOLLÁROVIČ^a, DUŠANA MAJERA^b,
KATARÍNA LUCIAKOVÁ^a a PETER BARÁTH^a**

^aÚstav experimentálnej onkológie SAV, Vlárská 7, 833 91 Bratislava, Slovenská republika ^bPresent address: Jozef Stefan Institute, Jamova 39, SI-1000, Ljubljana, Slovenia
gabriel.kollarovic@savba.sk

Transkripčný faktor NFI (Nuclear Factor I) hrá dôležitú úlohu v signálnych dráhach, ktoré vedú k vývinu a diferenciácii buniek u vyšších eukaryotov¹. Pri štúdiu expície génu pre translokátor adenínových nukleotidov – 2 (*ant2*) sme identifikovali NFI ako transkripčný faktor zodpovedný za represiu transkripcie v G₀ fáze bunkového cyklu². Cieľom tejto práce bolo exprimovať a purifikovať rekombinantný NFI proteín s N-terminálnymi značkami His6 a GST a identifikovať proteínových partnerov NFI pomocou afinitnej chromatografie.

Pri snahe o priamu purifikáciu NFI proteínov prostredníctvom fúznych značiek sme zaznamenali výskyt kopurifikovaných kontaminantov. Tieto kontaminanty sme odstránili prepurifikáciou na imobilizovanom heparíne, ktorý svojom štruktúrou mimikuje DNA molekulu. Po úspešnej purifikácii rekombinantného NFI-A1 na Heparin-Sepharose a následne na Ni- a GSH-Sepharose s výtazkom 3 až 10 µg purifikovaného proteínu na liter bakteriálnej kultúry sme potvrdili jeho funkčnosť pomocou EMSA a DNaseI protection assay. Použitím takto pripravenej proteínovej návnady sme metódou afinitnej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie identifikovali niekoľko potenciálnych partnerov NFI-A1, s ktorých heRNP K a eEF1A môžu hrať úlohu pri rastom regulovanej expície génov.

Za analýzu pomocou hmotnostnej spektrometrie ďakujem RNDr. Zbynkovi Zdráhalovi, PhD., z Ústavu experimentálnej biológie Masarykovskej Univerzity, Brno. Táto práca bola podporovaná grantmi APVT, č. 26-002102 a VEGA, č. 2/6060/26 a č. 2/0074/08.

LITERATÚRA

1. Gronostajski R. M.: *Gene* 249, 31 (2000).
2. Luciaková K., Baráth P., Poliaková D., Persson A., Nelson B., D.: *J. Biol. Chem.* 278, 30624 (2003).

PŘÍPRAVA APO-CYTOCHROMU b₅ HETEROLOGNÍ EXPRESÍ V *Escherichia coli* A JEHO VYUŽITÍ PRO OBJASNĚNÍ MECHANISMU PŮSOBNÍ CYTOCHROMU b₅ V REAKCÍCH KATALYZOVANÝCH CYTOCHROMY P450

**VĚRA KOTRBOVÁ, DAGMAR AIMOVÁ, MAREK
INGR, LUCIE BOŘEK-DOHALSKÁ a MARIE
STIBOROVÁ**

*Katedra biochemie, PŘF UK, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
verakotrbova@centrum.cz*

Cytochrom b₅ (cyt b₅) je hemoprotein lokalizovaný v membránách endoplasmatického retikula, kde se podílí na reakcích katalyzovaných cytochromy P450 (CYP). V závislosti na izoformě CYP a použitím substrátu, působí buď jako stimulator nebo inhibitor CYP, anebo jako protein, který aktivitu CYP neovlivňuje. Předpokládá se, že působení cyt b₅ může vycházet ze dvou mechanismů: (i) jeho přímé participace na přenosu elektronů na CYP a (ii) jeho allosterického působení na konformaci CYP. K vysvětlení, jakým mechanismem cyt b₅ reakce CYP skutečně ovlivňuje, je tedy nezbytné posoudit efekt nejen nativního cyt b₅, ale i vzhledem k přítomnosti hemového kofaktoru schopný přenosu elektronů, ale i cyt b₅, u něhož je tato neproteinová prosthetická skupina odstraněna (apo-cytochrom b₅, apo-cyt b₅). Postup pro efektivní odstranění hemové složky z nativního cyt b₅, a tedy získání apo formy v jeho přirozené konformaci, není dosud znám. V našich experimentech jsme zkoušeli dva potenciální postupy. Jedním byla extrakce hemu z nativního cyt b₅ chemickou cestou, acetonem při pH 3. Tento postup však vedl k denaturaci jeho proteinové molekuly. Druhou metodou byla příprava apo-cyt b₅ heterologní expící v *E. coli*. Pro přípravu apo-cyt b₅ byl vyvinut originální postup jeho expice, a to za absence prekurzoru syntézy hemu v růstovém médiu pro produkci bakteriální kmen. Gen pro membránovou formu králíčího cyt b₅ byl připraven z komerčně syntetizovaných oligonukleotidů pomocí PCR a správnost jeho sekvence byla ověřena sekvenováním. Expresním vektorem z plasmidu pET-22b byly transformovány buňky *E. coli* BL-21 (DE3) Gold. Produkce apo-cyt b₅ byla indukována pomocí IPTG. Rekombinantní apo-cyt b₅ byl izolován z membránové frakce, do které byl exprimován, solubilizací a purifikací ionexovou chromatografií na DEAE-Sepharose CL6B. Purifikovaný apo-cyt b₅ byl úspěšně rekonstituován na nativní, hemovou, plně funkční formu titrací roztokem heminu. Ta vykazovala identické vlastnosti jako nativní cyt b₅ jater králíka.

Podporováno MŠMT ČR (MSM0021620808), GA UK (127208) a GA ČR (203/09/0812).

NEZVYKLÁ REGIOSELEKTIVITA V CHEMII THIACALIXARENŮ (META-SUBSTITUCE) A JEJÍ VYUŽITÍ PRO SYNTÉZU ANIONTOVÝCH A FULLERENOVÝCH RECEPTORŮ

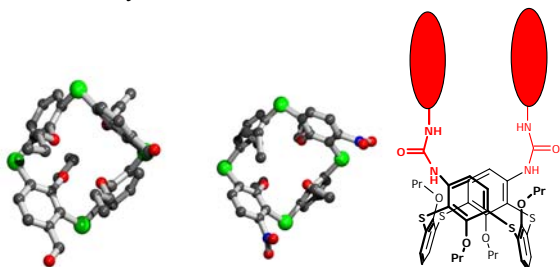
**ONDŘEJ KUNDRÁT^a, JAN KROUPA^a, VÁCLAV
EIGNER^b, MICHAELA POJAROVÁ^b, STANISLAV
BŮHM^a, JAN BUDKA^a, IVAN STIBOR^a a PAVEL
LHOTÁK^a**

^aÚstav organické chemie, ^bÚstav chemie pevných látek,
VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
kundrao@vscht.cz

Supramolekulární chemie využívá slabých, tzv. ne vazebných interakcí k návrhu a syntéze látek schopných rozpoznávat a tvořit komplexy s kationty, anionty, případně neutrálními látkami, a to v mnoha případech s vysokou selektivitou.

Deriváty thiacalix[4]arenu hrají ve skupiny relativně snadno modifikovatelných makrocyclů významnou roli. Protože dosud je známa jediná práce zabývající se S_E aromatickou tetraalkylovaného derivátu thiacalixarenu, zaměřili jsme se na tento typ reakcí. Byl proveden systematický výzkum nitrace, bromace, sulfonace a přímé formylace. Vůbec poprvé byly syntetizovány deriváty se substituenty v *meta*-polohách, oproti tomu v calixarenové chemii dochází za daných podmínek výhradně k *para*-substituci.

Takto připravené deriváty byly dále převedeny na iminové a močovinnové receptory, jejichž komplexační chování vůči aniontům a fullerénům C_{60} a C_{70} v různých rozpouštědlech pomocí 1H NMR anebo UV-VIS titrací jsou právě studovány.



Obr. 1. Krystalografické struktury formyl- (vlevo) a nitro-derivátu (uprostřed), ukázka struktury anion/fullerenového receptoru (vpravo)

Tento výzkum byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (grant 104/07/1242 a grant 203/09/0691).

APOPTÓZA NEUTROFILŮ PO KULTIVACI S BAKTERIEMI

TEREZA LANGROVÁ^a a PETR SLÁMA^{a,b}

^aMendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ^bVýzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno
xlangrov@node.mendelu.cz

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která představuje geneticky řízený sled morfologických a biochemických pochodů. Apoptóza může být vyvolána nejen regulátory vývoje organismu, ale také působením toxických faktorů¹. Mezi morfologické změny apoptotických buněk patří kondenzace cytoplasmy a chromatinu jádra - karyopyknosis, svraštění buněk a zaškrcování cytoplasmatické membrány - zeiosis a fragmentace buněk do apoptotických tělísek. Mezi biochemické znaky apoptózy patří vedle fragmentace jaderné DNA také translokace fosfatidylserinu z vnitřní na vnější stranu cytoplasmatické

membrány. Annexin V je protein, který se váže s fosfatidylserinem a umožňuje tak detekci apoptotických buněk průtokovou cytometrií².

V této studii byly neutrofilů získané výplachem mléčné žlázy jalovic kultivovány po dobu šesti hodin s bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis* a bylo zjišťováno, jak tato kultivace ovlivní apoptózu neutrofilů a dynamiku změn, které během apoptózy probíhají. Podíl apoptotických buněk byl zjišťován průtokovým cytometrem po barvení Annexinem V a propidium jodidem, stádia apoptózy světelnou mikroskopií.

Výsledky ukázaly, že interakce obou bakterií s neutrofilů vede k výraznému poklesu počtu apoptotických buněk a také ve změnu zastoupení jednotlivých stádií apoptózy. Statisticky velmi významně vyšší podíl byl zaznamenán v počtu apoptotických tělísek u buněk kultivovaných s bakteriemi. *S. aureus* a *S. uberis* jsou původci zánětu mléčné žlázy skotu. Výsledky studie prokázaly, že ovlivňují fyziologické funkce buněk obranného systému – neutrofilů. Ve studiu apoptózy buněk imunitního systému organismu je nutné pokračovat a zjištěné skutečnosti pak využít v prevenci a terapii zánětlivých onemocnění.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE0002716202.

LITERATURA

1. Squier M. T., Sehnert A. J., Cohen J. J.: *J. Leukoc. Biol.* 57, 1 (1995).
2. Zhang G., Gurtu V., Kain S. R., Yan G.: *Biotechniques*. 23, 3 (1997).

IMUNOCHEMICKÁ DETEKCE ISOFLAVONOIDŮ V AVOKÁDU AMERICKÉM (*Persea americana*)

PETRA LANKOVÁ^a, JELENA A. PROKUDINA^a, LADISLAV KOKOŠKA^b a OLDŘICH LAPČÍK^a

^aFakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6; ^bČeská zemědělská univerzita v Praze, Institut tropů a subtropů, 165 21 Praha 6
petralankova@vscht.cz

Isoflavonoidy (3-fenylchromony) jsou charakteristické sekundární metabolity bobovitých rostlin (Leguminosae), postupně ale narůstá evidence o jejich výskytu v řadě dalších taxonů¹.

V této studii jsme testovali zástupce čeledi Lauraceae (vavřínovité). Listy a plody avokáda amerického (*Persea americana*) byly lyofilizovány, rozemlety a extrahovány směsí methanol – voda 70 : 30. Extrakty byly analyzovány následujícími dvěma metodami:

a) Extrakty byly frakcionovány semipreparativní HPLC na reverzní fázi C18 a poté analyzovány ELISA metodami specifickými pro daidzein, genistein, biochanin A a jejich deriváty v polohách 7 a 4¹.

b) Extrakty byly analyzovány pomocí HPLC-MS-SIM.

V rostlině byly zaznamenány frakce, jejichž imunochemické charakteristiky a retenční časy odpovídaly

standardům daidzeinu, genisteinu, isoformononetinu, formononetinu, biochaninu A.

Jedná se o první průkaz jednotlivých isoflavonoidů u zástupce čeledi Lauraceae.

Práce vznikla za podpory projektů 525/09/0994 GAČR a MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Macková Z., Koblůvská R., Lapčík O.: *Phytochemistry* 67, 849 (2006).

ÚLOHA CYTOSKELETU A FOSFOLIPASY D V SIGNÁLNÍCH KASKÁDÁCH PŘI OBRANNÉ REAKCI ROSTLIN

JINDŘIŠKA MATOUŠKOVÁ^{a,c}, ZUZANA NOVOTNÁ^a, JAN PETRÁŠEK^{b,c}, KATEŘINA SCHWARZEROVÁ^b, LUCIE KUBÍNOVÁ, LENKA BURKETOVÁ^{a,c}, JIŘINA DUŠKOVÁ a OLGA VALENTOVÁ^a

^aVysoká škola chemicko-technologická, 166 28 Praha 6;

^bPřírodovědecká fakulta UK, 128 43 Praha 2; ^cÚstav experimentální botaniky, 165 02 Praha 6
jinmat@centrum.cz

Po napadení rostliny patogenem nastává komplexní obranná odpověď. Rostlinná buňka reaguje současně na několika úrovních například změnou elektrických potenciálů na membránách, mechanickým přeskupováním cytoskeletu¹ a organel uvnitř buňky a biochemickými změnami např. aktivací enzymů a produkcí sekundárních posílů a potažmo efektorových proteinů a jiných sloučenin. Tyto tři druhy změn se různě kombinují při indukci a uskutečňování signálních kaskád, které nakonec vyústí v obrannou odpověď². Tím, že buňka reaguje na několika úrovních současně, zajišťuje větší robustnost, rychlost, a tak i efektivitu celé reakce. Pochopit a popsat načasování a propojení všech reakcí je úkol nadmíru složitý.

Naším úkolem je najít souvislost mezi signální kaskádou kyseliny salicylové a dynamikou aktinových filament a mikrotubulů. Spojovacím článkem těchto dvou systémů by mohla být fosfolipasa D - PLD. V práci bylo prokázáno, že po ošetření kyselinou salicylovou nedochází u rostlin *Arabidopsis thaliana* (s inzerční mutací v genu pro fosfolipasu D- *PLDγ3*) ke zvýšené expresi PR proteinů (pathogen related). Expresie těchto PR proteinů je produktem signální kaskády, ve které je zapojena kyselina salicylová³. Isoforma fosfolipasy D- *PLDγ3* navíc přímo interaguje s aktinem. Dále byla sledována dynamika mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu po aplikaci kyseliny salicylové v netransformovaných a transgenních rostlinách *A. thaliana* s cytoskeletem vizualizovaným pomocí navázaného GFP a u rostlin *A. thaliana* s inzerční mutací genu pro fosfolipasu D- *PLDγ3*.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT (výzkumné centrum LC06034).

LITERATURA

1. Kobayashi I., Hakuno H.: *Planta* 217, 340 (2003).
2. Wang X.: *Plant Physiol.* 139, 566 (2005).
3. Durrant W.E., Dong X.: *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185 (2004).

STUDIUM DIFUZE V ČÁSTICOVÝCH KOMPOZITECH NA EPOXIDOVÉ BÁZI

TOMÁŠ MOŤKA a JAROMÍR ŠŤUPÁREK

*Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice
tomas.motka@student.upce.cz*

Epoxidové pryskyřice mají díky svým vlastnostem velmi široké použití v mnoha průmyslových odvětvích včetně tradičního využití ve stavebnictví a průmyslu nátěrových hmot. Díky svým vynikajícím elektroizolačním vlastnostem nacházejí také uplatnění v elektrotechnickém průmyslu jako izolanty a zalévací prostředky. Mezi další vhodné vlastnosti patří skvělá adheze, dobrá odolnost proti mechanickému namáhání, chemická a tepelná odolnost. Částicové kompozity, vzniklé přidáním poměrně nízkého množství plniv a jiných přísad, mají výrazně lepší vlastnosti než samotná epoxidová matrice¹.

Pochody vedoucí ke zhoršení či úplné ztrátě vlastností systému je nutno posuzovat komplexně jako souhrn několika fyzikálně-chemických procesů, které jsou navzájem propojeny a ovlivněny. Jedním z těchto procesů je difuze pronikajícího agresivního média, nejčastěji kapaliny, vytvrzeným epoxidovým systémem.

Metody hodnocení mechanické vlastnosti exponovaného kompozitu jsou například dynamická termomechanická analýza (DMA) a termomechanická analýza (TMA). Mezi již klasické způsoby studia difuze patří metoda optické mikroskopie, jenž je založena na expozici vzorku sledovaného systému v obarveném roztoku difundující kapaliny a následné optické detekci postupu difuzního čela barviva matricí. Další metoda mikroskopových sklíčků využívá základních principů metody optické mikroskopie, umožňuje však oproti metodě optické mikroskopie studium difuze i u plněných, mírně průsvitných epoxidových systémů. Vzhledem ke změnám v matrici, způsobené difundující kapalinou, dochází pronikajícím světlem k jeho lomu na rozhraní „exponované matrice – neexponovaná matrice“ a tím i k vytvoření difuzního čela. A to po expozici v roztoku neobarvené difundující kapaliny².

Cílem práce je postihnout souvislosti mezi mechanickými vlastnostmi a stupněm difuze v závislosti na stupni vytvrzení epoxidového systému a obsahu částicového plniva.

LITERATURA

1. Kalenda P., Kalendová A.: *Dyes and Pigments* 27, 305 (1995).
2. Mořka T.: *Studium vlastností zalévací epoxidové pryskyřice Veropal 148, Pardubice, (2005)*

ANALÝZA EXPRESE A FUNKCE MICRORNA U CHRONICKÉ LYMFATICKÉ LEUKÉMIE

MAREK MRÁZ, KARLA MALINOVÁ, ŠÁRKA PAVLOVÁ, JIRÍ MAYER a ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ

*Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno
marek.mraz@email.cz*

Představy o komplexnosti regulace genové exprese byly nedávno rozšířeny o úlohu molekul microRNA (miRNA), což jsou vysoce konzervované RNA tvořící 3-5 % ze všech genů v lidském genomu (tj. cca 1000 genů). miRNA ovlivňují stabilitu a translaci mRNA cílových genů a mají zásadní funkce v buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptóze¹. Prvním potvrzením významu miRNA u nádorů bylo zjištění o lokalizaci dvou miRNA *miR-15a* a *miR-16-1* v oblasti 13q14, která je deletována u 50 % případů chronické lymfatické leukémie (CLL). Za protein regulovaný těmito miRNA byl později označen Bcl2, který se významně podílí na deregulaci apoptózy a buněčného cyklu u CLL. K vzniku dalších defektů v regulaci bun. cyklu může docházet v průběhu onemocnění (např. delece/mutace p53) a tím k progresi choroby. V naší práci jsme se zaměřili na analýzu exprese miRNA u nejagresivnějšího subtypu onemocnění s delecí/mutací genu p53 a hledání miRNA hrajících úlohu v patogenezi CLL.

Pro analýzu byla odebrána periferní krev 30 pacientů s CLL, u nichž byly zjištěny standardní prognostické údaje (FISH, mutační status p53, mutační status těžkého řetězce imunoglobulinu (IgV_H), exprese ZAP±). Pomocí metodiky qRT-PCR (35 vybraných miRNA) a microArray byla v separovaných nádorových buňkách studována exprese miRNA. Byla zjištěna snížená exprese tří miRNA – *miR-34a*, *miR-29c* a *miR-17-5p* – u pacientů s deletovaným a/nebo mutovaným p53 (del/mut p53 n=12 vs. wt p53 n=18)². Tyto miRNA regulují proteiny často studované v souvislosti s patogenezi CLL. *miR-34a* reguluje expresi Bcl2 proteinu a *miR-29c* reguluje proto-onkogeny Tc11 a Mcl1, jejichž abnormální exprese je známa z myších modelů vzniku CLL. *miR-17-p* je regulována c-myc (klastř *miR-17-92*) a řídí expresi E2F1, p21, cyklinu D1. Výsledky naznačují, že analýza exprese miRNA může být nástrojem pro určení prognózy a přístupu k terapii pacientů. Vzhledem k předpokládanému vlivu zmíněných miRNA na další důležité proteiny mohou tyto hrát podstatnou roli v samotné kancerogenezi CLL^{2,3}.

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NR/9293-3/2007.

LITERATURA

1. Kusenda B., Mráz M., Mayer J., Pospíšilová Š.: *Biomedical Papers* 150, 205 (2006).
2. Mráz M., Malinová K., Kotašková J., Pavlová Š., Tichý B., Malčíková J., Staňo Kozubík K., Šmardová J., Brychtová Y., Doubek M., Trbušek M., Mayer J., Pospíšilová Š.: *Leukemia*, e-pub ahead of print (22 Jan., 2009), doi:10.1038/leu.2008.377.

3. Mráz M., Pospíšilová Š., Malinová K., Šlapák I., Mayer J.: *Leukemia and Lymphoma*, v tisku (2009)

EFEKT NENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN NA BUNĚČNOU SMRT VYVOLANOU PŮSOBENÍM NASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN

VLASTA NĚMCOVÁ-FÜRSTOVÁ, TEREZA KOPSKÁ a JAN KOVÁŘ

*Oddělení buněčné a molekulární biologie ÚBBMB & Centrum pro výzkum diabetu, metabolismu a výživy, 3. lékařská fakulta UK, Ruská 87, 100 00 Praha 10
vlasta.furstova@tiscali.cz*

Chronicky zvýšená hladina mastných kyselin (MK) v krvi přispívá u nemocných s diabetem 2. typu k úbytku pankreatických beta buněk, a to zejména mechanismem buněčné smrti (apoptózy). Na experimentálním modelu linie lidských pankreatických beta buněk NES2Y jsme již dříve ukázali, že saturované MK (e.g. kyselina palmitová a stearová), na rozdíl od nenasycených MK (kyselina palmitolejová a olejová) indukují v koncentraci 1 mM a vyšších buněčnou smrt¹. Cílem práce bylo otestovat vliv nenasycených MK na proapoptické působení nasycených MK u buněčné linie NES2Y.

Nenasycené MK již od koncentrace 0,2 mM kompletně inhibují apoptotický efekt 1 mM koncentrace nasycených MK ($P < 0,01$), jak jsme zjistili spočtením živých buněk po 96 hodinách inkubace buněk NES2Y s testovanými MK. Po indukci buněčné smrti působením nasycených MK (1 mM, 24 h) jsme detegovali signifikantní zvýšení hladiny aktivované kaspasy-2 ($P < 0,02$) a mírné zvýšení hladiny aktivovaných kaspas-8 a kaspas-9 ($P < 0,05$). Nedetegovali jsme však signifikantní zvýšení hladiny aktivované kaspasy-3. Hladinu aktivovaných kaspas výrazně snížila přítomnost nenasycených MK ($P < 0,05$). Působení nasycených MK nevyvolalo ve sledovaných buňkách zvýšení hladiny „reactive oxygen species“ (ROS) ani výrazné snížení mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$), které by předcházelo aktivaci kaspas.

Buněčná smrt indukovaná nasycenými MK u pankreatických beta buněk je zprostředkována zejména aktivací kaspasy-2 bez aktivace kaspasy-3 a nedochází při ní k výrazným změnám v hladinách ROS a v úrovni $\Delta\psi_m$. Nenasycené MK jsou schopny efektivně inhibovat buněčnou smrt indukovanou působením nasycených MK včetně aktivace kaspas. Výsledky našich experimentů poukazují na skutečnost, že mitochondriální dráha indukce apoptózy není hlavní drahou buněčné smrti spouštěné působením nasycených MK.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem 3. LF UK MSM 0021620814.

LITERATURA

1. Furstova V., Kopska T., James R.F., Kovar J.: *Life Sci.* 82, 684 (2008).

EXPRESÍ GENŮ OPERONU PRO KONVERZI ALDOXIMŮ, NITRILŮ A AMIDŮ Z *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* A4

ADAM PAVLÍK, O. VOLKOVA, M. KNOPPOVÁ,
J. NEŠVERA a M. PÁTEK

Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Vítězská 1083, 142 20 Praha 4
adam.pavlik@biomed.cas.cz

Kmen *Rhodococcus erythropolis* A4 produkuje vysoké aktivity nitrilhydratasy (>14000 U/L) a amidasy (>1700 U/L) v kulturách, u nichž byly optimalizovány zdroje živin a induktorů. Tyto enzymy lze využít pro hydrolyzu alifatických i aromatických nitrilů a amidů. Geny pro podjednotky nitrilhydratasy byly klonovány a izolací okolních chromosomových oblastí byl nalezeny geny odpovědné za dráhu přeměny aldoximů na karboxylové kyseliny. Kompletní sekvence tohoto úseku (9552 bp, GenBank Acc. No. AM946017) zahrnuje osm stejně orientovaných genů řídících metabolismus aldoximů, nitrilů a amidů: *nhr4* (regulátor 4), *oxd* (aldoximdehydratasa), *nhr2* (regulátor 2), *nhr1* (regulátor 1), *ami* (amidasa), *nha1*, *nha2* (alfa a beta podjednotky nitrilhydratasy) a *nhr3* (regulátor 3). RNA-hybridizace neprokázala společný velký transkript těchto genů, ale kratší transkripty pokrývající 1 až 4 geny. Gen pro amidasu (*ami*) je přepisován samostatně (transkript 1,6 kb), dále společně s geny *nha1*, *nha2* (transkript 3 kb) a do společného transkriptu genů *ami*, *nha1*, *nha2* a *nhr3* (5 kb). Fragmenty obsahující potenciální promotorové oblasti operonu byly klonovány v *promoter-probe* vektoru pEPR1. Transkripční aktivitu vykazovaly oblasti před geny *oxd*, *nhr2*, *nhr1*, *ami*, *nha1* a *nhr3*. Metodou *primer-extension* byl nalezen transkripční počátek genu *ami*. S použitím DNA-afinitní chromatografie a hmotnostní spektrometrie jsou vyhledávány proteiny, které se vážou na regulační oblast genu *ami*. Gen *ami* byl klonován v expresních vektorech pEXT20 (exprese v *Escherichia coli*) a pFEX16 (exprese v *R. erythropolis*). Aktivita enzymu produkovaného buňkami *E. coli* potvrdila, že pro expresi genu pro amidasu v heterologním systému není potřeba přítomnost dalšího genu (např. aktivátoru). Cílem analýz mechanismu regulace genu *ami* a jeho homologní nebo heterologní exprese je získat kmen, který by vykazoval vysokou aktivitu amidasy.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT LC06010 BIOTRANS.

INTERAKCE N-TERMINÁLNÍHO ZBYTKU KYSELINY MYRISTOVÉ S MATRIXOVÝM PROTEINEM MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU

JAN PRCHAL^a, MICHAL DOLEŽAL^a, JIŘÍ VLACH^a,
JAN LIPOV^a, MICHAELA RUMLOVÁ^b, ERIC
HUNTER^c, TOMÁŠ RUML^a a RICHARD HRABAL^{a*}

^aVysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5 CZ-166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie,

CZ-166 10 Praha 6; ^cEmory Vaccine Center at Yerkes Nat. Primate Res. C., Atlanta, USA
richard.hrabal@vscht.cz

Polyprotein Gag je prekursorem všech strukturních proteinů a hraje významnou úlohu při tvorbě a pučení virové částice. N-terminální doména Gag, matrixový protein (MA), interaguje s buněčnou membránou, protože je na povrchu nezralé virové částice. MA interaguje s cytoplasmatickou membránou pomocí kladně nabitých zbytků aminokyselin a myristoylu kovalentně připojeného k N-terminálnímu glycinu. Bylo popsáno několik jedno a vícebodových mutací MA, které ovlivňují životní cyklus M-PMV¹.

V naší práci jsme se zaměřili na určení molekulární podstaty změny fenotypu způsobené mutacemi T411/T781 a Y28F/Y67Fv M-PMV MA. Částice nesoucí tyto mutace nejsou schopny pučet skrz cytoplasmatickou membránu a akumulují se u ní^{1,2}.

Určili jsme třírozměrné struktury obou mutantů a divokého typu MA pomocí NMR spektroskopie. Mutace nezpůsobila zásadní změny celkové struktury proteinu, ale zmutované hydrofobní aminokyseliny jsou orientovány do jádra proteinu, kde mohou interagovat se zbytkem kyseliny myristové. Tato zjištění podporují hypotézu, že zvýšení hydrofobicity jádra proteinu brání uvolnění myristoylu pro interakci s membránou, a tak brání pučení nezralých virových částic z buňky. Pro potvrzení této hypotézy jsme se zaměřili na určení struktury myristoylovaného MA s důrazem na interakci myristoylu s jádrem proteinu a na rozdíly mezi mutanty a divokým typem.

Tato práce byla financována z prostředků: Ministerstvo školství ČR 1M6837805002, MSM 6046137305 a ME 904, GAČR # 203/07/0872 a grant # CA 27834 od National Institutes of Health

LITERATURA

1. Rhee S. S., Hunter E.: EMBO J. 10, 535 (1991).
2. Stansell E., Tytler E., Walter M. R., Hunter E.: J. Virol. 78, 5023 (2004).

NEUROBLASTOMOVÁ BUNĚČNÁ LINIE REZISTENTNÍ K ELLIPTICINU – GENETICKÁ A EXPRESNÍ CHARAKTERISTIKA

PAVEL PROCHÁZKA^{a*}, JITKA POLJAKOVÁ^{a,b},
ANTONÍN LIBRA^c, MARTIN BUNČEK^c,
JAN HRABĚTA^a, MARIE STIBOROVÁ^b
a TOMÁŠ ECKSCHLAGER^a

^aKlinika dětské hematologie a onkologie UK, 2. LF, 150 06 Praha 5, ^bKatedra biochemie PřF UK, 128 40 Praha 2, ^cGeneri Biotech, 500 11 Hradec Králové
proch.pavel@gmail.com

Neuroblastom vysokého rizika (HR NBL) je jedním z nejhůře léčitelných nádorů dětského věku. Stále se proto hledají nové léky a léčebné postupy. Jedním z nich může být i cytostatikum ellipticin, u kterého jsme prokázali

cytotoxický efekt na buňky HR NBL *in vitro*. Interkalace do DNA a inhibice topoizomery II alfa (*TOP2A*) jsou považovány za jedny z hlavních mechanismů jeho cytotoxického účinku. Ellipticin působí po metabolické aktivaci také jako alkylační činidlo, kovalentně modifikující DNA. Významným faktorem ovlivňujícím jeho účinek a specificitu může být i rozdílná individuální výbava enzymů důležitými pro jeho bioaktivaci. Cílem naší práce bylo poznat mechanismy, které vyvolávají rezistenci vůči ellipticinu. Lidská HR NBL linie rezistentní k ellipticinu (UKF-NB-4rELLI) byla získána dlouhodobou kultivací UKF-NB-4 s postupně se zvyšující koncentrací ellipticinu. UKF-NB-4rELLI jsme analyzovali pomocí komparativní genomové hybridizace, změny chromosomových oblastí ověřili fluorescenční *in situ* hybridizací, expresi genů jsme testovali metodou expresní „microarray“ a ověřili RT PCR. Zjistili jsme změny v expresi řady genů. Za nejvýznamnější u rezistentní linie považujeme snížení exprese topoizomery 1 a 2A, provážené ztrátou zmožení genu *TOP2A*. Dalším mechanismem, který může být zodpovědný za rezistenci vůči ellipticinu, je zvýšená exprese antiapoptotického genu *Bcl-2*. Apoptózu je možné zablokovat i delecí genu *BAX*. UKF-NB-4rELLI¹ má oblast 19q s lokalizací genu *BAX* „deletovanou“, exprese mRNA *BAX* však zůstává beze změn. Oblasti chromosomů 7q21 (*MDR1*), 10q24 (*MRP2*), 12q13-14 (*LRP1*), 16p13 (*MRP1*), bývají u chemorezistentních nádorů amplifikované. UKF-NB-4rELLI žádné takové změny, ani změny exprese na úrovni mRNA, nevykazuje. Na úrovni proteinu jsme však našli zvýšení exprese *LRP* a *MRP2*. Získané výsledky potvrzují, že rezistence vůči ellipticinu je podmíněna několika rozdílnými mechanismy.

Práce vznikla za podpory MŠMT (MSM0021620813) a GA UK (7926/2007).

PEPTIDOGLYKÁNOVÉ HYDROLÁZY Z ČELADE *Enterococcaceae* AKO POTENCIÁLNĚ ENZYBIOTIKÁ

LENKA SERENČOVÁ, MÁRIA PIKNOVÁ, PETER PRISTAŠ a PETER JAVORSKÝ

Ústav fyziologie hospodářských zvířat, SAV, Šoltésovej 4-6,
040 01 Košice
serencova@saske.sk

Hydrolázy bakteriálních bunčových stěn sú v súčasnosti značne študovanou triedou enzýmov. Ich substrátom je najdôležitejšia zložka bunčových stien baktérií – peptidoglykán. Vďaka ich úzkej cieľovej špecificite a nízkej pravdepodobnosti vzniku rezistencie sa uvažuje o možnostiach ich terapeutického využitia, ako alternatívy klasických antibiotík¹. Purifikované peptidoglykánové hydrolázy majú oproti bežne používaným antibiotikám niekoľko výhod, predovšetkým cieleňé usmrcovanie antibioticky rezistentných patogénnych baktérií, schopnosť, ktorú zabezpečujú ich CWT (cell wall tagreting) domény².

V poslednej dobe sa jednou z hlavných príčin nozokomiálnych infekcií stávajú enterokoky³. O peptidoglykánových hydrolázach s cieľovou špecificitou proti tejto

skupine baktérií existuje len málo poznatkov. V našej práci sme sa zamerali na štúdium enterolyzínu A (EnlA), peptidoglykánovej hydrolázy s lytickou aktivitou proti širokému spektru potenciálnych patogénov, vrátane enterokokov. EnlA bol na našom ústave heterologicky exprimovaný a purifikovaný, ako rekombinantný, biologicky aktívny proteín⁴. V našej práci sme študovali modulárnu organizáciu EnlA s využitím komparatívnej sekvenčnej analýzy. Následnou fúziou CWT domény EnlA so zeleným fluorescenčným proteínom (GFP) a testovaním tohto fúzneho proteínu sme potvrdili predpokladanú funkciu CWT domény a jej význam pre cieľovú špecificitu EnlA. Podobným spôsobom plánujeme kombinovať CWT a katalytické domény rôznych peptidoglykánových hydroláz s cieľom pripraviť nové, účinnejšie a úzko cieľovo špecifické enzýmy.

Táto práca bola podporovaná grantom APVV-0586-07 a VEGA 2/0006/08.

LITERATÚRA

1. Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. Q.: *J. Appl. Microbiol.* 104, 1 (2008).
2. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A.: *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 231, 366 (2006).
3. Sood S., Malhotra M., Das B. K., Kapil A.: *Indian J. Med. Res.* 128, 111 (2008).
4. Nígutová K., Serenčová L., Píknová M., Javorský P., Pristas P.: *Protein Expr. Purif.* 60, 20 (2008).

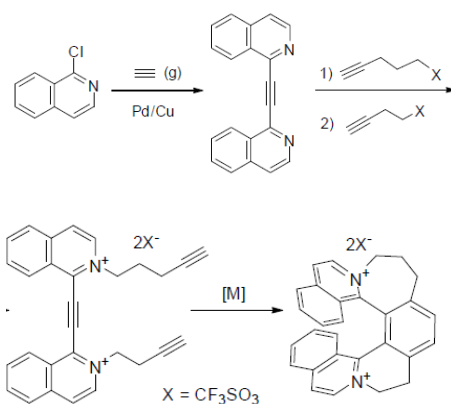
[7]HELQUAT: FLEXIBILNÍ SYNTÉZA SYMETRICKÝCH A NESYMETRICKÝCH HELIKÁLNÍCH DIKATIONTŮ

**LUKÁŠ SEVERA^a, IVANA ČÍSAŘOVÁ^b,
DAVID ŠAMAN^a a FILIP TEPLÝ^{a,*}**

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bKatedra anorganické
chemie, Přírodovědecká fakulta UK, 128 43 Praha 2
severa@uochb.cas.cz

Byl vyvinut modulární vysoce praktický syntetický přístup k nové skupině vodorozpustných fluorescentních dikationických helikálních struktur se sedmi kondenzovanými kruhy – [7]helquatům. Prvním krokem této přípravy je Sonogashirův kaplink chloroisochinolinu s plynným acetylenem. Pro syntézu symetrických [7]helquatů je produkt biskvarternizován příslušným triflátem za vzniku symetrického triynu¹, při přípravě nesymetrických struktur se provede nejprve monokvarternizace prvním triflátem v toluenu a po izolaci se monokation kvarternizuje jiným triflátem v dichlormethanu za vzniku nesymetrického triynu. Následuje klíčová [2+2]cykloisomerace² triynu, kdy vzniká příslušný [7]helquat. Na purifikaci kationických struktur není třeba chromatografie – stačí promytí vhodnými rozpouštědly či extrakce. Struktury některých triynů a helquatů byly potvrzeny rentgenovou difrakcí¹.

Dikationty plánujeme testovat jako organokatalyzátory. Na základě podobnosti s viologeny lze očekávat herbicidní aktivitu³. Možná interakce s DNA je zkoumána.



Projekt byl podpořen projekty UOCHB (Z4 055 0506) a GA ČR (203/09/0705).

LITERATURA

- Adriaenssens L., Severa L., Šálová T., Císařová I., Pohl R., Šaman D., Rocha S.V., Finney N.S., Pospíšil L., Slaviček P., Teplý F.: *Chem. Eur. J.* 15, 1072 (2009).
- [2+2+2] cykloizomerace jako klíčový krok syntézy neionických helikálních struktur byla vyvinuta ve skupině Dr. Starého: Stará I.G., Starý I., Kollárová A., Teplý F., Šaman D., Tichý M.: *J. Org. Chem.* 63, 4046 (1998).
- Khambay B. P. S., Bromilow R. H., v knize: *The New Chemistry*, s. 232. (Hall N., ed.) Cambridge University Press 2000.

FOSFANYL FERROCENOVÉ AMIDY NESOUCÍ 2-HYDROXYETHYLOVÉ SKUPINY NA AMIDOVÉM DUSÍKU

JIŘÍ SCHULZ, IVANA CÍSAŘOVÁ
a PETR ŠTĚPNIČKA*

Univerzita Karlova v Praze, PřF, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
schulz@natur.cuni.cz, stepnic@natur.cuni.cz

Během studia koordinačních vlastností a katalytického uplatnění fosfinoferrocenových karboxylových kyselin¹ jsme se zaměřili rovněž na studium odvozených fosfinoamidů. S cílem navázat na předchozí práci² jsme se rozhodli připravit dva nové fosfinoferrocenové amidy nesoucí 2-hydroxyethyllové skupiny na amidovém dusíku a studovat jejich koordinační vlastnosti a možnosti katalytického využití.

Amidy **1** a **2** byly připraveny amidací 1'-(difenylofosfino)-ferrocenkarboxylové kyseliny (HdPf)^{1,3}. Tyto ligandy mohou díky svému polárnímu charakteru a možnosti tvorby vodíkových vazeb vykazovat zvýšenou rozpustnost

v polárních organických rozpouštědlech a také sloužit jako synthony pro supramolekulární chemii komplexů přechodných kovů. Z tohoto důvodu byly připraveny rovněž palladnaté komplexy (**3**, L = 1; **4**, L = 2). Pomocí rentgenostrukturní analýzy bylo zjištěno, že připravené ligandy i jejich palladnaté komplexy tvoří v pevném stavu komplikované supramolekulární struktury prostřednictvím vodíkových vazeb, měnící se od jednorozměrných řetězců až po trojrozměrné molekulární sítě. Katalytická aktivita palladnatých komplexů **3** a **4** byla testována v palladiem katalyzované Suzukiho reakci fenyloborité kyseliny s arylbromidy ve vybraných polárních rozpouštědlech.

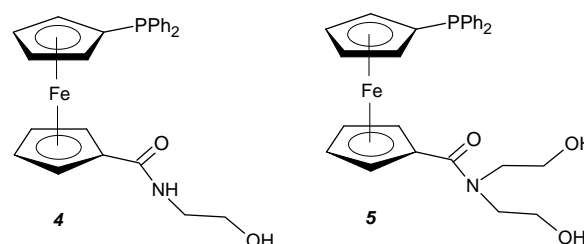


Schéma 1. Fosfanylamidy **1** a **2**

LITERATURA

- Štěpnička P.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005, 3787.
- Štěpnička P., Schulz J., Císařová I., Fejfarová K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 72, 453 (2007).
- Podlaha J., Štěpnička P., Ludvík J., Císařová I.: *Organometallics* 15, 543 (1996).

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE HYBRIDIZACE DNA AFLATOXINOGENNÍCH PLÍSNÍ S VYUŽITÍM UHLÍKOVÝCH ELEKTROD

PETRA ŠNĚVAJSOVÁ^a, LUKÁŠ TISOŇ^a
a JARMILA VYTRÁSOVÁ^b

^a Katedra analytické chemie, FCHT, Univerzita Pardubice, 532 10 Pardubice; ^b Katedra biologických a biochemických věd, FCHT, Univerzita Pardubice, 530 03 Pardubice
petra.snevajsova@upce.cz

Bioanalytické stanovení DNA má obvykle za úkol určit přítomnost určité sekvence nukleotidů ve vzorku. Pro analýzu se využívá hybridizace vzorku s komplementární sekvencí (sondou či próbou) na základě komplementarity bazí v DNA. K elektrochemické detekci hybridizace DNA se nejvíce používají elektrody uhlíkové a zlaté. Detekce hybridizace DNA na elektrodách využívá nejrůznějších principů, včetně vlastní elektroaktivity DNA, elektrochemicky aktivních indikátorů, kovalentně značených signálních sond¹ atd.

Cílem práce je zavést metodiku pro elektrochemickou detekci vybraného úseku DNA kódujícího biochemickou cestu syntézy aflatoxinu B₁ u některých kmenů plísní rodu *Aspergillus*. Princip metody se zakládá na aktivitě enzymu alkalické fosfatasy (ALP). Cílová DNA je nejdříve imobilizována na povrch elektrody, poté hybridizuje se sondou značenou biotinem. Na biotin je navázán konjugát

streptavidinu s ALP. Alkalická fosfatasa katalyzuje přeměnu elektroinaktivního substrátu 1-naftylfosfátu na elektroaktivní produkt 1-naftol, jehož signál je detegován voltametriky.

K tomuto účelu bylo využito tříelektrodeového uspořádání, kdy jako měrná elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda (CPE) nebo uhlíková tištěná elektroda (SPCE), srovnávací argentchloridová elektroda a jako pomocná elektroda platinová. Metoda byla nejdříve optimalizována pro syntetické oligonukleotidy. Nejvhodnější parametry jednotlivých kroků elektrochemické detekce hybridizace DNA byly následně využity při analýze vzorků DNA izolovaných z některých kmenů aspergilů.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR (MŠM0021627502), GA ČR (203/08/1536; 203/09/0148) a LC 06035.

LITERATURA

1. Vacek J., Masařík M., Paleček E., Fojta M.: Čs. Čas. Fyz. 56, 293 (2006).

AKCEPTORY A SEKUNDÁRNÍ ZDROJE SINGLETOVÉHO KYSLÍKU A JEJICH SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY S CYKLODEXTRINŮ

LENKA SLAVĚTÍNSKÁ^a, JIŘÍ MOSINGER^b a PAVEL KUBÁT^c

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, 166 10 Praha 6; ^bKatedra anorganické chemie, PřF UK, 128 40 Praha 2; ^cÚstav fyzikální chemie AV ČR, 182 23 Praha 8
slavetinska@uochb.cas.cz

Singletový kyslík ¹O₂ našel uplatnění především díky svému silnému cytotoxickému a oxidativnímu působení v řadě aplikací, jako jsou např. fotodynamická léčba nádorových onemocnění a aterosklerosy, inaktivace virů a bakterií, fotodesinfekce mikrobiálně znečištěných vod a vývoj nových ekologicky šetrných herbicidů a insekticidů¹. Singletový kyslík reaguje [4+2] cykloadicí s aromatickými sloučeninami (anthracenové a naftalenové deriváty) za vzniku různě stabilních endoperoxidů. Jejich termolýzou dochází ke zpětné reakci, při které vzniká původní sloučenina a uvolňuje se kyslík, částečně v singletovém stavu. Takovéto aromatické sloučeniny pak mohou být označovány za akceptory a sekundární zdroje ¹O₂ (cit.^{2,3}).

Cyklodextriny CD jsou známé tvorbou inkluzních „host-guest“ komplexů s řadou organických i anorganických molekul vázaných do cyklodextrinové kavity kombinací hydrofobních a elektrostatických interakcí. Tvorba „host-guest“ komplexů má za následek změnu fyzikálních a fotofyzikálních vlastností inkludovaných látek. Cyklodextriny jsou studovány zejména jako nosiče léků, neboť zvyšují stabilitu „guest“ molekul vůči tepelné degradaci, zvyšují jejich rozpustnost a také biologickou aktivitu⁴.

V této studii byla připravena série vodorozpustných aromatických endoperoxidů využitelných jako sekundární zdroje ¹O₂, u nichž byla prokázána schopnost vytvářet „host-guest“ komplexy s cyklodextriny. Sledován byl také vliv cyklodextrinů na fyzikální a fotofyzikální vlastnosti inkludovaných akceptorů/sekundárních zdrojů ¹O₂.

LITERATURA

1. Schweitzer C., Schmidt R.: Chem. Rev. 103, 1685 (2003).
2. Aubry J. M., Pierlot C., Rigaudy J., Schmidt R.: Acc. Chem. Res. 36, 668 (2003).
3. Slavětinská L., Mosinger J., Kubát P.: J. Photochem. Photobiol., A: 195, 1 (2008).
4. Szejtli J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).

NOVÉ MOŽNOSTI PŘI DETEKCI LATENTNÍ INFEKCE BAKTERIÍ *Mycobacterium tuberculosis* – STANOVENÍ CYTOKINŮ POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE A KVANTITATIVNÍHO PCR

ONDŘEJ STANĚK^a, IRENA LINHARTOVÁ^a, ILONA BÍBOVÁ^a, MARCELA ŠIMŠOVÁ^b a PETER ŠEBO^a

^aMikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, Václavská 1083, 142 20 Praha 4; ^bProteix s.r.o., Nad Safinou II/365, 252 42 Vestec
stanek@biomed.cas.cz

V poslední době opět stoupá počet lidí nakažených tuberkulózou a to nejen v rozvojových zemích třetího světa, ale v důsledku migrace také v zemích vyspělých. Odhaduje se, že jedna třetina světové populace je nakažena latentní formou tohoto onemocnění, otevřená forma se následně rozvine u desetiny takto infikovaných, v polovině případů v prvních dvou letech po kontaktu s bakterií. Každý člověk s otevřenou formou tuberkulózy pak přibližně infikuje dalších 10-15 lidí. Kritickým bodem v boji proti této zákeřné nemoci je včasné a přesné odhalení latentní infekce bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI). V současné době pro tyto účely nejpoužívanější Tuberkulinový kožní test, založený na stimulaci PPD (Purified Protein Derivative), je však nepřesný díky křížovým reakcím s antigeny environmentálních mykobakterií a používané BCG vakcíny. Tento nedostatek se podařilo vyřešit u nových diagnostických testů použitím antigenů CFP-10 (10-kDa culture filtrate protein) a ESAT-6 (6-kDa early secreted antigenic target). Ty jsou kódovány v lokusu RD1 (Region of Difference) přítomném pouze u infekčních kmenů. Tyto antigeny společně s antigenem Tb 7.7 jsou používány v komerčně dostupném kitu „Quantiferon TB-gold in tube“ pro detekci latentní tuberkulózy, založeném na *in vitro* restimulaci T-buněčné odpovědi v krvi pacienta provázenou zvýšenou expresí IFN- γ , který je následně stanoven metodou ELISA. Porovnávali jsme hladinu IFN- γ po *in vitro* restimulaci periferních mononukleárních krevních buněk jak volnými antigeny CFP-10, Esat-6 a Tb 7.7, tak i ekvimolárním komplexem CFP-10/Esat-6, směsí všech tří antigenů a ve formě antigen-fúzního proteinu s adenylát

cyklázovým toxoidem, jako nosiče a dopravce antigenu. Hladina IFN- γ byla stanovena pomocí průtokové cytometrie (FACS) a kvantitativním PCR (q-PCR). Získaná data byla souběžně porovnávána s komerčním kitem Quantiferonem TB-gold. Z prvních výsledků je patrné, že pro stimulaci buněk s kvantifikací na průtokovém cytometru a q-PCR je třeba jen čtvrtiny času a díky dostatečně nízkému detekčnímu limitu je využito i velmi nízkého počtu paměťových T-buněk. Mezi další výhody patří možnost stanovit počet CD4+ a CD8+ T-buněk uvolňujících IFN- γ u metody průtokové cytometrie, což je obzvláště důležité u CD4+ deficientních pacientů a u q-PCR je podstatnou výhodou možnost snadného stanovení ostatních cytokinů.

Tato práce vznikla za podpory grantů KAN200520702 a NPVII 2B06161.

ANALÝZA EXPRESE CYKLINU D1 U LYMFOMU Z BUNĚK PLÁŠŤOVÉ ZÓNY

LENKA ŠTEFANČÍKOVÁ^{a,b}, MOJMÍR MOULIS^{a,c}, PAVEL FABIAN^d, IVA FALKOVÁ^a, INGRID VÁŠOVÁ^e a JANA ŠMARDOVÁ^{a,b,c}

^aÚstav patologie a ^eInterní hematologická klinika, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, ^bÚstav experimentální biologie, PŘF MU, 611 37 Brno, ^cLF MU, 662 43 Brno, ^dOddělení patologie, MOU, Žlutý kopec 7, 565 53 Brno stefancikoval@seznam.cz

Lymfom z buněk pláštěvé zóny (mantle cell lymphoma, MCL) je vzácné, agresivní a prognosticky málo příznivé nádorové onemocnění. Vzniká abnormální proliferací B buněk ve vnějším okraji folikul lymfatických uzlin. Cytogeneticky je MCL charakterizován translokací t(11;14)(q13;q32), která je přítomná v nádorové tkáni téměř všech pacientů. Tato translokace vede k předřazení zesilovače transkripce genu pro těžký řetězec imunoglobulinu před gen pro cyklin D1. Důsledkem je vysoká exprese cyklinu D1, regulátoru buněčného cyklu.

Detailně jsme analyzovali cyklin D1 v nádorové tkáni 33 pacientů s MCL diagnostikovaných ve FN Brno v letech 2003 až 2008. Translokaci t(11;14) jsme stanovovali fluorescenční hybridizací *in situ* (FISH). Zvýšenou hladinu mRNA cyklinu D1 jsme zjišťovali kompetitivně reverzně transkriptázovou PCR (RT-PCR) a množství proteinu jsme detegovali westernovým přenosem a imunohistochemicky. Výsledky všech metod spolu korelovaly. U 31 případů (94 %) jsme prokázali translokaci t(11;14) a zvýšenou hladinu jak mRNA, tak proteinu cyklinu D1. Ke stanovení proteinu cyklinu D1 westernovým přenosem jsme použili dvě protilátky (SP4 a CD1.1). Zatímco protilátka SP4 byla vysoce citlivá a specifická a detegovala pouze cyklin D1, protilátka CD1.1 ukazovala u některých případů vedle cyklinu D1 i další protein. Na základě jeho molekulové hmotnosti a srovnáním s výsledky kompetitivní RT-PCR se mohlo jednat o cyklin D2. To jsme prokázali protilátkou Ab-4 specifickou pro cyklin D2, která jasně určila jeho zvýšenou hladinu u 2 případů (6 %) bez t(11;14). Onkogenní účinek

cyklinu D1 je u těchto vzácných případů MCL nahrazen cyklinem D2.

Práce byla podpořena IGA MZ NR/9305-3, MŠMT 0021622415 a GA ČR 204/08/H054.

PREFERENČNÍ SELEKCE ISOMERU D-GALAKTONO-1,5-LAKTONU ENZYMEM β -GALAKTOSIDASOU Z *Arthrobacter* sp. C2-2 PRO VAZBU DO AKTIVNÍHO MÍSTA

ANDREA ŠTĚPÁNKOVÁ^{a,b}, TEREZA SKÁLOVÁ^b, JAN DOHNÁLEK^b, JARMILA DUŠKOVÁ^b, PETR KOLENKO^b, JINDŘICH HAŠEK^b a PETRA LIPOVÁ^c

^aKatedra inženýrství pevných látek, FJFI, ČVUT, Trojanova 13, 120 00 Praha 2; ^bÚstav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 00 Praha 6; ^cKatedra biochemie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6

Stanovení třidimenzionální (3D) struktury nativního enzymu a 3D struktur jeho komplexů s různými ligandy v řadě případů pomohlo vysvětlit mechanismus katalyzované reakce. Struktura přirozeného typu enzymu β -galaktosidasy¹ z antarktické bakterie *Arthrobacter* sp. C2-2, vyřešená v naší laboratoři, je nyní doplněna o struktury komplexů tohoto enzymu se třemi různými ligandy. Tato série komplexů enzymu vysvětluje strukturální změny způsobené vazbou jednotlivých typů (analog tranzitního stavu, produkt, inhibitor) ligandů do aktivního místa enzymu.

Molekula inhibitoru D-galaktonolaktonu byla nalezena v aktivním místě enzymu ve své méně stabilní formě² – jako D-galaktono-1,5-lakton, ačkoli krystal byl máčen v roztoku isomeru D(-)-galaktono-1,4-laktonu (Sigma-Aldrich, synonymum D(-)-galactonic acid γ -lactone). Přítomnost isomeru δ -galaktonolaktonu je důsledek specifity enzymu. Tento δ isomer vytváří specifické kontakty s Glu442 a iontem Na⁺, které by v případě přítomnosti isomeru γ nebyly možné. Vazba molekuly D-galaktono-1,5-laktonu do aktivního místa způsobuje rozsáhlé strukturální změny enzymu, které budou diskutovány.

V další prezentované 3D struktuře je molekula produktu D-galaktosy navázána v podobné poloze a také vytváří specifické kontakty s Glu442 a iontem Na⁺. V případě komplexu enzymu s inhibitorem – isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) – je molekula IPTG navázána v jiné poloze v aktivním místě, ale hydroxyly 4- a 6- vytvářejí stejné specifické interakce jako u předchozích dvou komplexů.

Tato práce vznikla za podpory grantů GA AV (projekt KJB500500512), GA ČR (projekt 305/07/1073) a IGS ČVUT (projekt CTU0803914).

LITERATURA

- Skálová T., Dohnálek J., Spiwok V., Lipová P., Vondráčková E., Petroková H., Dušková J., Strnad H., Králová B., Hašek J.: J. Mol. Biol., 353, 282 (2005).

2. Bierenstiel M., Schalf M.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1474.

MOLEKULÁRNÍ A FUNKČNÍ ANALÝZA PROTEINŮ INTERAGUJÍCÍCH S ADAPTÉROVÝM PROTEINEM Daxx

JAN ŠVADLENKA, LUKÁŠ ČERMÁK, JAN BRAŽINA a LADISLAV ANDĚRA

*Oddělení buněčné signalizace a apoptózy, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, 142 20 Praha 4
Jan.Svadlenka@img.cas.cz*

Daxx je multifunkční adaptérový protein. Podílí se na apoptotické signalizaci po aktivaci receptorů Fas, TGFβ či při oxidačním stresu a glukosové deprivaci, potlačení jeho exprese ovlivňuje citlivost některých buněčných linií k apoptóze a jeho genetická inaktivace vede k úhynu myších zárodků v důsledku masivní apoptózy¹. O komplexnosti dějů, jichž se Daxx účastní, svědčí i jeho úloha při regulaci transkripce. Daxx je převážně jaderný protein asociovaný s chromatinem a PML-tělísky^{2,3}, který interaguje s mnoha transkripčními faktory (např. NF-κB, p53, Smad4, aj.) a zřejmě prostřednictvím své asociace s histonacetylásami HDAC1 a 2, proteinem asociovaným s DNA-metylasou DMAP1 či chromatinremodelující ATPasou ATRX, aj. se podílí na jejich represi¹.

Pro objasnění funkce proteinu je důležité poznání jeho interaktomu. Proto jsme se zaměřili na vyhledání nových interakčních partnerů proteinu Daxx v kvasinkovém dvojhybridním systému. Kromě dvou jeho již dříve popsaných interakcí s ATRX a DMAP1 jsme takto našli 10 dalších potenciálních interakčních partnerů, např. tumor-supresorovou chromatin-remodelující ATPasu Brg1 či ubikvitin-hydrolasu asociovanou s komplexem BRCA1 BAP1. Daxx s těmito proteiny interaguje jak *in vitro*, tak po nadprodukci v buňkách HEK293FT. Navíc kolokalizuje s Brg1 na promotorech některých genů a potlačení jeho exprese vede k inhibici aktivace těchto genů indukované Brg1. Náš následující výzkum se zaměřil na podrobnější charakterizaci uvedených interakcí a objasnění úlohy proteinu Daxx při regulaci funkce těchto interakčních partnerů.

LITERATURA

1. Salomoni P., Khelifi A. F.: Trends. Cell Biol. 16, 2 (2006).
2. Pluta A. F., Earnshaw W. C., Goldberg I. G.: J. Cell Sci. 111, 14 (1998).
3. Ishov A. M., Sotnikov A. G., Negorev D., Vladimirova O. V., Neff N., Kamitani T., Yeh E. T., Strauss J. F. 3rd, Maul G. G.: J. Cell Biol. 147, 2 (1999).

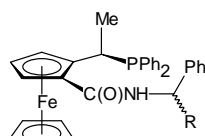
FOSFINOFERROCENOVÉ KONJUGÁTY VYBRANÝCH AMINOKYSELIN – SYNTÉZA, KOORDINAČNÍ VLASTNOSTI A KATALYTICKÉ POUŽITÍ

JIŘÍ TAUCHMAN, IVANA CÍSAŘOVÁ a PETR ŠTĚPNIČKA*

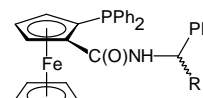
*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
tauchman@natur.cuni.cz, stepnic@natur.cuni.cz*

Naše skupina se dlouhodobě zabývá chemií fosfinokarboxylových kyselin odvozených od ferrocenu¹. V poslední době jsme se zaměřili především na fosfinoferrocenové amidy a to včetně chirálních sloučenin použitelných v asymetrické katalýze (např. **1–3**)^{2,3}.

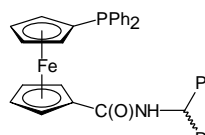
Spektrum připravených sloučenin jsme nedávno rozšířili o nové karboxyfosfino-ferrocenové deriváty s aminokyselinovými pendanty, viz např. sloučenina **4**. Koordináční vlastnosti jednoduchého amidu **4** a ligandů příbuzných byly zkoumány v palladnatých komplexech a jejich katalytické vlastnosti testovány v Suzukiho-Miyauraově reakci prováděné v různých rozpouštědlech. Chirální obdoby ligandu **4** (odvozené od chirálních aminokyselin a/nebo chirálních ferrocenových fosfinokarboxylových kyselin) byly rovněž připraveny a testovány v asymetrické allylové alkylaci.



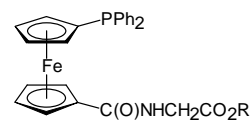
1
R = H (*R_p, R*)
R = Me (*R_p, R, R*), (*R_p, R, S*)



2
R = H (*S_p*)
R = Me (*S_p, R*), (*S_p, S*)



3
R = Me (*R*), (*S*)



4
R = H, Me

Tato práce je součástí projektů MŠMT ČR (LC06070 a MSM0021620857).

LITERATURA

1. Štěpnička P.: Eur. J. Inorg. Chem. 2005, 3787.
2. Lamač M., Císařová I., Štěpnička P.: Eur. J. Inorg. Chem. 2007, 2274.
3. Lamač M., Tauchman J., Císařová I., Štěpnička P.: Organometallics 26, 5042 (2007).

**VAZBA MUTANTNÍ FORMY PROTEINU p53
K INTRONOVÝM A INTERGENNÍM SEKVENCÍM
TVOŘÍCÍM TRIPLEX DNA REGULUJE EXPRESI
GENŮ U BUNĚK U251**

**VLASTIMIL TICHÝ^a, TIMO QUANTE^b, LARS
TÖGEL^b, KORDEN WALTER^b, LUCIE
NAVRÁTILOVÁ^a, MATĚJ LEXA^c, WOLFGANG
DEPERT^b, GENRICH V. TOLSTONOG^b, EMIL
PALEČEK^a a MARIE BRÁZDOVÁ^{a,b*}**

^aBiofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., 612 65 Brno; ^bTumor Virology, HPI for Experimental Virology and Immunology, D-20251 Hamburg, BRD; ^cMasarykova univerzita, Fakulta informatiky, 602 00 Brno, ČR

Mutace v genu pro TP53 je častou příčinou výskytu karcinomů u lidí. Nejvíce modifikací tohoto genu je tvořeno missense bodovou mutací (změna jedné aminokyseliny), díky které jsou mutantní proteiny p53 (mutp53) funkčně pozmeněny. Mutp53 proteiny přitom ztrácí schopnost sekvenčně specifické vazby na DNA, a tím i funkce nádorového supresoru, a naopak získávají vlastnosti onkogenní. V naší práci jsme spojili chromatinovou imunoprecipitaci (ChIP) s DNA klonováním a sekvenováním (ChIP-cloning) k identifikaci vazebných míst mutp53 proteinů v glioblastomové linii U251 a dokázali jsme jejich funkčnost jak *in vitro* tak *in vivo*. Pomocí gelové retardací analýzy (EMSA) jsme potvrdili, že získané sekvence jsou rozpoznávány izolovaným rekombinantním proteinem R273H především v superhelikální DNA. Vazebná místa lokalizovaná především do intronových oblastí genů měla repetitivní charakter nezbytný pro tvorbu sekundárních struktur stabilizovaných superhelicitou DNA, jejichž výskyt se nám podařilo dokázat pomocí S1 nukleasy. Navíc funkční analýzy vedly k identifikaci genů *PPARGC1A* a *FRMD5*, které jsou regulovány mutp53 prostřednictvím vazby na zmíněné sekvence DNA a pravděpodobně také díky asociaci s jadernou matrix a transkripčními faktory Sp1 a YY1.

Na základě těchto poznatků se domníváme, že onkogenní funkce mutp53 proteinu mohou být způsobeny jeho interakcí s intronovými a intergenními sekvencemi tvořícími sekundární struktury, které vedou k regulaci specifických genů na základě reorganizace chromatinu.

Tato práce vznikla za podpory grantu EC QLGA-CT-2001-52001, EC MERG-6-CT-2005-014875, MŠMT IK04119, GA ČR 204/06/P369 a 204/08/1560 a Výzkumného Centra LC06035.

**ZNAČENÍ DNA STABILNÍMI ISOTOPY: VZTAH
MEZI METABOLICKÝM DĚJEM A JEHO
MIKROBIÁLNÍMI PŮVODCI**

**ONDŘEJ UHLÍK^{a,b}, KATEŘINA JEČNÁ^a, MARTINA
MACKOVÁ^a, ČESTMÍR VLČEK^c, PETR ŠTURSA^a
a TOMÁŠ MACEK^{a,b}**

^aFPBT VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, 166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, 166 10 Praha 6; ^cÚstav molekulární genetiky AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
ondrej.uhlik@seznam.cz

Molekulárně biologické techniky v posledních letech rozšířily možnosti studia bakteriálních populací, mimo jiné hlavních účastníků bioremediace kontaminovaných lokalit, často nekultivovatelných a tedy neidentifikovatelných v laboratoři. Revoluční metoda, která umožňuje najít vztah mezi metabolickým dějem probíhajícím v prostředí a identitou jeho mikrobiálních původců, je založena na značení DNA stabilními isotopy uhlíku ¹³C. Jejím principem je inkubace environmentálního vzorku s ¹³C-značeným substrátem, který část bakteriální populace využívá jako zdroj uhlíku, a dochází tak k inkorporaci isotopů ¹³C do DNA. Následná izolace celkové DNA a ultracentrifugace v gradientu cesné soli umožňuje oddělení ¹³C-DNA od nezačtené DNA inaktivní části populace. Získaný metagenom je dále využíván pro sekvenční analýzu zajišťující taxonomické zařazení populací i analýzu funkčních genů. Uvedenými postupy byly charakterizovány bakteriální populace metabolizující bifenyly v půdě kontaminované polychlorovanými bifenyly (PCB) a v rhizosféře křenu selského rostoucího v této zemině. Analýza knihoven genů 16S rRNA sestavených z ¹³C-DNA ukázala, že metabolismu bifenyly v nevegetované půdě dominují bakterie rodu *Paenibacillus*, zatímco v rhizosféře křenu selského to jsou bakterie rodu *Hydrogenophaga*. Analýza funkčních genů nasvědčuje tomu, že tyto bakterie jsou schopny degradovat obdobné spektrum PCB jako kmen *Pseudomonas alcaligenes* B-357. Další bakterie metabolizující bifenyly přísluší rodům *Achromobacter*, *Variovorax*, *Methylovorus*, *Methylophilus*, a některé bakterie se nepodařilo na úrovni rodu identifikovat a je možné, že se jedná o dosud nepopsané rody. Výsledky této práce poukazují na vliv rostlin na aktivitu jednotlivých populací. Zároveň potvrzují nezastupitelnou úlohu techniky značení DNA stabilními isotopy v mikrobiální ekologii.

Tato práce vznikla za podpory projektů MSMT NPVII 2B0 8031, GA ČR 525/09/1058, MSM 6046137305 a Z 40550506.

**VYUŽITÍ 1-ADAMANTYLU PRO MODIFIKACI
BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK**

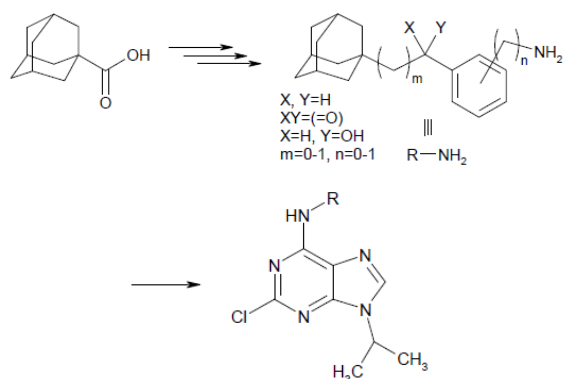
**ROBERT VÍCHA^{*}, MICHAL ROUCHAL a ZUZANA
KOZUBKOVÁ**

Ústav chemie, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Náměstí T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
rvicha@ft.utb.cz

V roce 1964 byly poprvé popsány antivirové účinky 1-adamantylaminu¹, což spolu s objevem metody syntézy adamantanu použitelné i v průmyslovém měřítku², vyvolalo prudký rozvoj chemie derivátů adamantanu. V současné době nachází sloučeniny obsahující ve struktuře

adamantanový skelet uplatnění v celé řadě oblastí, zejména pak v chemii léčiv a polymerních materiálu. Jistým pojítkem mezi těmito dvěma oblastmi je schopnost adamantanu vytvářet relativně pevné inkluzní komplexy s cyklodextriny, čehož se využívá pro transport léčiv biologických systémech nebo pro tvorbu supramolekulárních polymerních asambláží.

Protože použití jednoduchých, komerčně dostupných derivátů adamantanu (adamantylamin či deriváty kyseliny adamantankarboxylové) může vést ke ztrátě biologických účinků díky značné sterické náročnosti adamantanu³, připravili jsme sérii anilinů a benzylaminů substituovaných v poloze *meta* nebo *para* 1-adamantylem, odděleným od aromatického kruhu linkerem s proměnnou polaritou (viz Schéma 1) a studovali jsme strukturu jejich komplexů s β -cyklodextrinem (CD) a vliv na inhibiční aktivitu derivátů purinu vůči CDK 2. U samotných aminů s polárními substituenty byla prokázána v roztoku i v pevné fázi tvorba dimerů stabilizovaných vodíkovými vazbami. Komplexy aminů s CD pak vykazovaly pseudorotaxanovou strukturu. Pozitivní výsledek představuje pozorovaná inhibiční aktivita některých nových purinových derivátů srovnatelná s analogy bez adamantylového substituentu a neovlivněná komplexací s CD.



Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 203/06/P362.

LITERATURA

1. Davies W. L., Grunert R. R., Haff R. F., McGahen J. W., Neumayer E. M., Paulshock M., Watts J. C., Wood T. R., Hermann E. C., Hoffmann C. E.: *Science* 144, 862 (1964).
2. Schleyer P. von R.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3292 (1957).
3. Otyepka M., Kryštof V., Havlíček L., Siglerová V., Strnad M., Koča J.: *J. Med. Chem.* 43, 2506 (2000).

IZOLACE A CHARAKTERIZACE KATECHOL-1,2-DIOXYGENASY KVASINKY *Candida tropicalis* PARTICIPUJÍCÍ NA BIODEGRADACI FENOLICKÝCH LÁTEK

L. VILÍMKOVÁ, V. KREMLÁČKOVÁ, J. PÁČA Jr., J. PÁČA a MARIE STIBOROVÁ

*Katedra biochemie, PŘF, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2
lenvil@post.cz*

Biodegradace chemických látek mohou probíhat díky metabolickému potenciálu řady mikroorganismů, kdy dochází k začlenění xenobiotika do jejich intermediárního metabolismu. U kvasinky *Candida tropicalis* byla zjištěna schopnost využívat fenol jako hlavní zdroj uhlíku a energie. Pro nás je tedy vhodným mikroorganismem pro studium enzymů podílejících se na degradaci fenolu. Naše laboratoř pracuje s kmenem Ct2, který byl izolován z kontaminované půdy na Mostecku.

Fenol indukuje u kvasinky *C. tropicalis* tvorbu enzymů podílejících se na jeho degradaci. V cytoplasmě je lokalizovaná NADPH-dependentní fenolhydroxylasa (EC 1.14.13.7), která katalyzuje 1. krok degradace, tedy oxidaci fenolu na katechol. Enzym katechol-1,2-dioxygenasa (EC 1.13.11.1) poté štěpí vzniklý katechol tzv. *ortho*-dráhou (intradiolovým štěpením) na kyselinu *cis,cis*-mukonovou. Ta je dále odbourána až na sukcinát a acetyl-CoA.

Výše zmíněné enzymy byly z cytosolu izolovány za použití chromatografie na sloupci DEAE-Sepharose (k eluci proteinů byl použit gradient NaCl). Eluát byl rozdělen na frakce, ve kterých byla detekována fenolhydroxylasová a katecholdioxygenasová aktivita. Tyto frakce byly poté separátně dialyzovány a podrobeny rechromatografií na DEAE-Sepharose. Nakonec byly získané enzymové preparáty lyofilizovány a v této formě zmrazeny pro další experimenty. Purifikovaná katechol-1,2-dioxygenasa byla částečně charakterizována. Jedná se o dimer, jehož molekulová hmotnost byla určena pomocí gelové chromatografie na sloupci Sephadexu G-100 a SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). pH optimum tohoto enzymu leží v oblasti pH 7,5–9,5. Provedena byla rovněž *N*-terminální sekvenace.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR (303/05/2195 a 104/04/0686) a MŠMT ČR (0021620808).

MOŽNÉ VYUŽITÍ VIROVÝCH ČÁSTIC JAKO VEKTORŮ PRO DORUČENÍ GENŮ

IRENA VORÁČKOVÁ, PAVEL ULBRICH, TIBOR FŮZIK a TOMÁŠ RUML

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28, Praha 6; Ústav biochemie a mikrobiologie a Centrum aplikované genomiky
irena.vorackova@vscht.cz*

Při genových terapiích se jako nosičů (vektorů) terapeutických genů nejčastěji používá replikačně defektních virů. V poslední době se začínají intenzivněji využívat upravené virové částice. Tyto částice mají některé vlastnosti podobné celým virům, ale jsou neinfekční, protože neobsahují žádné virové geny.

Naše práce je zaměřena na terapeutické využití upravených virových částic odvozených od Mason-Pfizerova

opičího viru, který patří mezi retroviry. Již dříve jsme prokázali tvorbu částic z retrovirového strukturního polyproteinu Gag v systému *in vitro* v přítomnosti různých typů nukleových kyselin (RNA, DNA). Takto vzniklé částice se po modifikaci povrchu určitými oligopeptidy dají využít buď jako vektory pro genové terapie či pro imunizace. Peptidy, vystavené na povrchu částic, by měly interagovat s receptory cílových buněk a doručit tak prostřednictvím částic nesený gen do buňky či sloužit jako antigen pro tvorbu protilátek.

Byly vybrány oligopeptidy, které by měly interagovat s receptory prostatických nádorových buněk a vaskulárních endoteliálních buněk. Byla potvrzena tvorba modifikovaných částic v přítomnosti RNA i DNA. Byl testován vstup částic s inkorporovaným genem pro zelený fluorescenční protein (GFP) do specifických tkáňových kultur. Zatím nebyla potvrzena exprese GFP v buňkách inkubovaných s modifikovanými částicemi. Nyní se proto zaměřujeme na průkaz interakce částic s receptory příslušných buněk pomocí imunofluorescenční mikroskopie či přenosu virových proteinů na membránu s následnou imunochemickou detekcí.

Pro imunizace byla vybrána část sekvence prostatického membránového antigenu a částicemi s touto sekvencí byly imunizovány myši. Obdrželi jsme monoklonální protilátky, které jsou nyní testovány. Na využití tohoto systému je podána patentová přihláška.

Tato práce je podporována granty 1M6837805002, MSM 6046137305, KJB 50127070 a SCO/06/E001.

ZOBRAZOVÁNÍ DISTRIBUCE LIPIDŮ NA POVRCHU ROSTLIN A HMYZU METODOU MALDI IMAGING

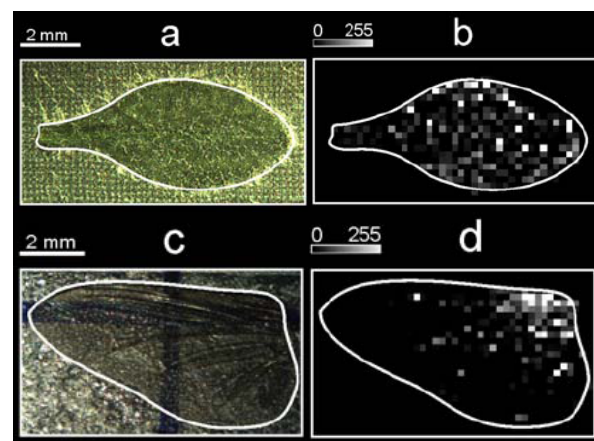
VLADIMÍR VRKOSLAV^a, ALEXANDER MUCK^b,
JOSEF CVAČKA^a a ALEŠ SVATOŠ^b

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., 166 10 Praha 6; ^bMax Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Str. 8, D-07745 Jena, Germany
vrkoslav@uochb.cas.cz

Povrch těla vyšších rostlin a hmyzu je pokryt vrstvou kutikulárního vosku. Složení kutikulárních vosků se u jednotlivých organismů liší, vždy se ale jedná o látky s nízkou polaritou. Kutikulární vosky mají hlavně ochrannou funkci, ale některé jeho složky také mohou hrát důležitou roli v komunikaci hmyzu nebo ovlivňovat vztahy mezi rostlinami a jejichmi škůdci. Znalost lokalizace lipidů na povrchu organismů může výrazně přispět k pochopení těchto vztahů.

V předloženém projektu jsme demonstrovali využití metody MALDI imaging pro mapování lipidů na listech rostlin a křídlech hmyzu. Sledována byla distribuce voskových esterů (WE) a uhlovodíků (HC). Jako matrice byla použita kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB), její lithná (LiDHB) a sodná (NaDHB) sůl. Homogenní vrstvy LiDHB a NaDHB byly vytvořeny sprejováním. DHB byla deponována sublimací. Při ionizaci s matricí NaDHB byly ve spektrech identifikovány molekulové adukty WE [M+Na]⁺.

U vzorků pokrytých DHB docházelo k ionizaci WE také. Kationizačním činidlem se staly sodné a draselné ionty přítomné na povrchu biologického materiálu. Pokud byla použita matrice LiDHB, ve spektrech byly pozorovány navíc ionty odpovídající lithným aduktům HC. Na obrázku jsou uvedeny fotografie listu rostliny *Arabidopsis thaliana* pokrytého matricí (a), distribuce WE C46H92O2 na jeho povrchu (b), fotografie křídla mouchy *Neobellieria bullata* (c) a distribuce HC C39H76 (d).



Obr. 1.

Vyvinutá metoda je vhodným nástrojem pro zobrazování distribuce lipidů na kutikule hmyzu a rostlin.

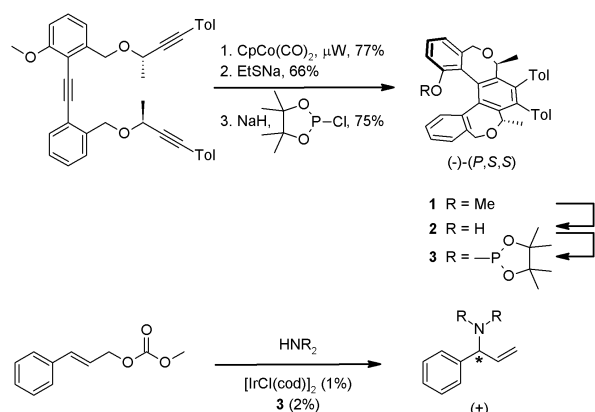
Tato práce byla financována z výzkumného záměru č. Z40550506 a z grantu GA ČR 203/09/0139.

VYUŽITÍ HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH LIGANDŮ V ENANTIOSELEKTIVNÍ KATALÝZE

JAROSLAV ŽÁDNÝ, NATHAN C. CLEMENCE,
ZUZANA KRAUSOVÁ, IRENA G. STARÁ*
a IVO STARÝ*

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
zadny@uochb.cas.cz

Helikálně chirální sloučeniny byly doposud jen omezeně využívány v asymetrické syntéze. Důvodem byla jejich obtížná příprava v opticky čisté formě. Pomocí [2+2+2] diastereoselektivní cyklotrimerizace¹ trynů se podařilo syntetizovat methoxyhelicen **1** o vysoké optické čistotě (>99 % *ee*). Následným odchráněním byl připraven příslušný helicenol **2**, který byl reakcí s chlórdioxfosfolanem převeden na fosfit **3**. Tento chirální ligand byl využit v asymetrické allylové aminaci se sekundárními aminy² katalyzované komplexem iridia, kdy bylo dosaženo enantiomerního nadbytku až 82 % *ee*.



Bylo tak potvrzeno, že uvedené helicity a jejich deriváty představují skupinu látek potencionálně zajímavou pro využití v enantioselektivních reakcích katalyzovaných komplexy přechodných kovů.

Podporováno GA ČR (reg.č. 203/07/1664 a 203/09/1766), MŠMT (Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg.č. LC512).

LITERATURA

- Sehnal P., Krausová Z., Teplý F., Stará I. G., Starý I., Rulišek L., Šaman D., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 73, 2074 (2008).
- Ohmura T., Hartwig J. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 15164 (2002).

MECHANISMUS VAZBY SMH PROTEINŮ NA TELOMERICKOU DNA

MICHAL ZIMMERMANN, CTIRAD HOFER, PAVLA ŠULTESOVÁ, IVA MOZGOVÁ, PETRA PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFŮVÁ a JIŘÍ FAJKUS

Oddělení Funkční Genomiky a Proteomiky PřF MU,
 Kamenice 5, 625 00 Brno
 zimmer@sci.muni.cz

Telomery jsou nukleoproteinové struktury, které chrání konce chromozomů a zajišťují zachování stability a integrity genomu. Výzkum struktury a regulace délky telomer je v současné době v centru vědeckého zájmu, zejména díky prokázané souvislosti mezi zkracováním telomer a stárnutím buněk (sencence) na jedné straně a mechanismem zachování délky telomer při přeměně zdravých buněk na buňky rakovinné (karcinogeneze) na straně druhé.

Telomery modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* jsou tvořeny mnohonásobným opakováním sekvence 5'-TTTAGGG-3'. Předchozí studie zabývající se hledáním telomer-vazebných proteinů u *Arabidopsis* identifikovaly jako možné kandidáty na tuto funkci proteiny rodiny Single-Myb-Histone (SMH), nazývané AtTRB. AtTRB proteiny se *in vitro* váží na dvouřetězcovou telomerickou DNA a jsou

schopny interagovat s proteinem AtPOT1, účastnícím se regulace délky telomer.

Náplní práce je kvantitativní popis interakcí DNA a SMH proteinů AtTRB1 a AtTRB3 *in vitro*. Pomocí spektroskopického měření anizotropie fluorescence a gelové retardační analýzy byla stanovena stoichiometrie vazby a afinita proteinů AtTRB k DNA o různém počtu telomerických repetit. Měření afinity za podmínek různé iontové síly umožnilo určit podíl specifických interakcí na tvorbě komplexu. Na základě získaných výsledků byl nově navržen možný funkční model vytváření komplexu proteinů AtTRB a telomerové DNA¹. Detailní popis interakcí zástupců SMH proteinů a telomerické DNA přispěl k pochopení strukturní dynamiky telomer.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR č. MSM0021622415 a GAČR č. 521/08/P452 a 204/08/H054.

LITERATURA

- Hofr C., Šultesová P., Zimmermann M., Mozgová I., Procházková Schruppřová P., Wimmerová M., Fajkus J.: *Biochem. J.* 419, 221 (2009).



SIGMA-ALDRICH

REJSTRÍK AUTORŮ

Adameová, Adriana	436	Hladíková, Martina	439
Aimová, Dagmar	442	Hof, Martin	434
Almáši, Miroslav	429	Hofr, Ctirad	455
Anděra, Ladislav	451	Holubcová, Zuzana	431, 437
Andicsová, Anita	429	Horňáková, Darina	437
Andronova, Angelina	430	Hošek, Jan	437
Babušíková, Eva	430	Housková, Barbora	439
Balušíková, Kamila	431	Hrabal, Richard	446
Bánovčín, Peter	430	Hraběta, Jan	446
Barák, Imrich	441	Hroudová, Miluše	438
Baráth, Peter	442	Hubáčková, Miluše	438
Bárta, Tomáš	431, 437	Hunter, Eric	435, 446
Barteková, Monika	436	Chrastilová, Zuzana	439
Bartoš, Milan	437	Ingr, Marek	442
Bělohradský, Martin	432	Janderová, Blanka	436
Beneš, Petr	440	Javorský, Peter	447
Betík, Robert	432	Ječná, Kateřina	452
Bibová, Ilona	449	Jeseňák, Miloš	430
Böhm, Stanislav	442	Jindřichová, Marie	439
Bořek-Dohalská, Lucie	442	Jurečková, Jana	430
Brázdová, Marie	452	Kadlčíková, Aneta	440
Bražina, Jan	451	Kindl, Jiří	437
Brezovský, Jan	434	Knopfová, Lucia	440
Budka, Jan	442	Knoppová, M.	446
Bunčec, Martin	446	Koháryová, Michaela	441
Burketová, Lenka	444	Kokoška, Ladislav	443
Cisařová, Ivana	429, 447, 448, 451	Kolenko, Petr	441, 450
Clemence, Nathan C.	454	Kollárová, Marta	441
Cvačka, Josef	454	Kollárovič, Gabriel	442
Čermák, Lukáš	451	Kopská, Tereza	445
Damborský, Jiří	434	Kotora, Martin	432, 434, 440
Dekoj, Václav	432	Kotrbová, Věra	442
Deppert, Wolfgang	452	Koval, Tomáš	441
Dobrota, Dušan	430	Kovář, Jan	431, 445
Dohnálek, Jan	441	Kovář, Vojtěch	433
Dohnálek, Jan	450	Kozubková, Zuzana	452
Doležal, Michal	446	Král, Vladimír	439
Doležalová, Dáša	431, 437	Krausová, Zuzana	454
Dorňáková, Veronika	433	Kremláčková, V.	453
Dostalíková-Čimbuřová, Markéta	431	Krivjanská, Mária	438
Dupejová, Jarmila	433	Kroupa, Jan	442
Durand, Thierry	434,	Křenek, Peter	436
Dušková, Jarmila	441, 450	Kubát, Pavel	449
Dušková, Jiřina	444	Kubínová, Lucie	444
Dvořák, Petr	431, 437	Kundrát, Ondřej	442
Dziahtsiaryk, Aksana	439	Kuželová, Magdaléna	436
Eckschlager, Tomáš	446	Langrová, Tereza	443
Eigner, Václav	442	Lanková, Petra	443
Eignerová, Barbara	434	Lapčík, Oldřich	443
Fabian, Pavel	450	Lexa, Matěj	452
Fajkus, Jiří	455	Lhoták, Pavel	442
Falková, Iva	450	Libra, Antonín	446
Forťová, Andrea	434	Linhartová, Irena	449
Fülöpová, Andrea	435	Lipov, Jan	435, 446
Füzik, Tibor	453	Lipovová, Petra	450
Golovchenko, Maryna	433,	Luciaková, Katarína	442
Grubhoffer, Libor	433	Ludwig, Jost	439
Grubhoffer, Libor	433	Macek, Tomáš	452
Grznárová, Petra	435	Macková, Martina	439, 452
Halbhuber, Zbyněk	438	Majera, Dušana	442
Hampl, Aleš	431, 437	Malinová, Karla	445
Harčárová, Anna	436	Matejčíková, Jana	436
Hašek, Jindřich	441	Matoušková, Jindřiška	444
Hašek, Jindřich	450	Matoušková, Petra	437
Hatok, Jozef	430	Mayer, Jiří	445
Hilská, Markéta	436	Mosinger, Jiří	449

Mořka, Tomáš	444	Štechová, Kateřina	438
Moulis, Mojmír	450	Štěpánková, Andrea	441, 450
Mozgová, Iva	455	Štěpnička, Petr	448, 451
Mráz, Marek	445	Štěřba, Ján	433
Muck, Alexander	454	Štursa, Petr	452
Navrátilová, Lucie	452	Šultesová, Pavla	455
Němcová-Fürstová, Vlasta	445	Švadlenka, Jan	451
Nešporová, Kristina	440	Tauchman, Jiří	451
Nešvera, J.	446	Teplý, Filip	447
Neubauerová, Jitka	431	Tereza, Skálová	450
Novotná, Zuzana	444	Tichý, Vlastimil	452
Obšil, Tomáš	439	Tisoň, Lukáš	448
Olžýňská, Agnieszka	434	Tögel, Lars	452
Páca, J.	453	Tolstonog, Genrich V.	452
Páca, J. Jr.	453	Uhlík, Ondřej	452
Pačes, Václav	438	Ulbrich, Pavel	453
Paleček, Emil	452	Valentová, Olga	444
Palková, Zdena	436	Valterová, Irena	437
Pátek, M.	446	Vancová, Marie	433
Pavlík, Adam	446	Vargová, Zuzana	429
Pavlová, Šárka	445	Vášová, Ingrid	450
Petrášek, Jan	444	Vávra, Vojtěch	439
Pichová, Iva	437	Végh, Daniel	429
Piknová, Mária	447	Vícha, Robert	452
Pojarová, Michaela	442	Vilímková, L.	453
Poljaková, Jitka	446	Vinarský, Vladimír	431
Pospíšilová, Šárka	445	Vlach, Jiří	446
Prchal, Jan	446	Vlček, Čestmír	438, 452
Pristaš, Peter	447	Vojta, Petr	438
Procházka, Pavel	446	Volkova, O.	446
Procházková Schruppfová, Petra	455	Vopálenský, Pavel	438
Prokudina, Jelena A.	443	Voráčková, Irena	453
Quante, Timo	452	Vrkoslav, Vladimír	454
Rainey, Jasmine	435	Vytřasová, Jarmila	448
Ravingerová, Táňa	436	Walter, Korden	452
Rídl, Jakub	438	Zahradník, Pavol	435
Richterová, Klára	439	Zdráhal, Zbyněk	434
Rouchal, Michal	452	Zeleňák, Vladimír	429
Rudenko, Nataliia	433	Zemková, Hana	439
Ruml, Tomáš	435, 446, 453	Zimmermann, Michal	455
Rumlová, Michaela	446	Žádný, Jaroslav	454
Serenčová, Lenka	447		
Severa, Lukáš	447		
Schulz, Jiří	448		
Schwarzerová, Kateřina	444		
Sigmundová, Ivica	435		
Skálová, Tereza	441		
Sláma, Petr	443		
Slavětínská, Lenka	449		
Staněk, Ondřej	449		
Stará, Irena G.	430, 454		
Starý, Ivo	430, 432, 454		
Stibor, Ivan	442		
Stiborová, Marie	442, 446, 453		
Stojilkovič, S. S.	439		
Strnad, Hynek	438		
Svatoš, Aleš	454		
Sýkora, Jan	434		
Šaman, David	447		
Šebo, Peter	449		
Šimšová, Marcela	449		
Šmarda, Jan	440		
Šmardová, Jana	450		
Šněvajsová, Petra	448		
Šňupárek, Jaromír	444		
Ščavíková, Vendula	438		
Štefančíková, Lenka	450		
Štefanková, Petra	441		



OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	371	EDITORIAL	371
ZAHRADA		GARDEN	
Fotoelektronová spektroskopie ve třetím tisíciletí	373	Photoelectron Spectroscopy in Third Millenium	373
Z. Bastl		Z. Bastl	
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek	381	Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography in Separation of Polar Compounds	381
J. Vacek, L. Onofrejšová, B. Klejdus a V. Kubáň		J. Vacek, L. Onofrejšová, B. Klejdus, and V. Kubáň	
Změna glykosylace na sérových glykoproteinech u pacientek s rakovinou vaječníku pravděpodobně přispívá k patogenezi nemoci	386	Glycosylation Changes of Serum Glycoproteins in Ovarian Cancer May Contribute to Disease Pathogenesis	386
R. Šaldová, P. M. Rudd a J. Káš		R. Šaldová, P. M. Rudd, and J. Káš	
Polyfenoly jablk	394	Apple Polyphenols	394
M. Ondrejovič, T. Maliar, E. Polívka a S. Šilhár		M. Ondrejovič, T. Maliar, E. Polívka, and S. Šilhár	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Vliv přítomnosti nízkomolekulárních organických kyselin na stanovení kadmia technikou difuzního gradientu v tenkém filmu	401	The Effect of Low-Molecular-Weight Organic Acids on Cadmium Assay Using Diffusive Gradient in Thin Film Technique	401
J. Jaklová Dyrtrtová, M. Jakl, D. Kolihová, D. Miholová a P. Tlustoš		J. Jaklová Dyrtrtová, M. Jakl, D. Kolihová, D. Miholová, and P. Tlustoš	
Dekontaminace zemin extrakcí roztoky alkoholů	407	Application of Alcohols in Leaching of Polluted Solid Matrixes	407
T. Nováková, M. Šváb a M. Müllerová		T. Nováková, M. Šváb, and M. Müllerová	
Tribotechnická diagnostika v prevádzke použitých olejov II. Metódy hodnotenia fyzikálno-chemických vlastností olejov	416	Tribotechnical Diagnostics of Used Oils II. Methods of Assessment of Physicochemical Properties of Oils	416
J. Mihalčová a H. Al Hakim		J. Mihalčová and H. Al Hakim	
VÝUKA CHEMIE		EDUCATION IN CHEMISTRY	
Elektrolýza v jednoduchom zariadení v školskom laboratóriu	419	A Simple Alternative Apparatus for Electrolysis in a School Laboratory	419
Z. Melichová, I. Nagyová a J. Reguli		Z. Melichová, I. Nagyová, and J. Reguli	
RECENZE	424	BOOK REVIEWS	424
IX KONFERENCE SIGMA-ALDRICH	427	IX SIGMA-ALDRICH CONFERENCE	427

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 103 (2009), čís./no. 5 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 133, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 119 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/ CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Generála Svobody 335, 533 51 Pardubice - Rosice nad Labem; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2009 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plně předplatné 2009 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2008 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou 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: D. Hnyk • Dáno do tisku 24.4.2009.