Vážení čtenáři,

dubnový úvodník je jiný než vydavatel Chemických listů, Česká společnost chemická, zamýšlela. Je nejen bilancí posledních let, kdy individuální členové společností sdružených v Asociaci českých chemických společností, dostávali čtyři „bulletinová čísla“ ročně v rámci členského příspěvku, ale i výzvou k Vám, čtenářům a našim příznivcům. Od druhé poloviny devadesátých let umožňovalo výrazné rozšiřování inzerce, spolu s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, Českého literárního fondu, Vysoké školy chemicko-technologické a dalších institucí, obsahově a graficky časopis kvalitativně měnit. Chemické listy se staly odborným časopisem, jehož náklad rostl, a který se dostával do rukou všech generací nejen chemiků, ale také veřejnosti, zajímající se o chemii v tom nejširším smyslu, a studentům středních a vysokých škol. V minulém roce došlo k legislativním změnám, které svými důsledky výrazně ovlivnily letošní rozpočet časopisu. Příjmy z předplatného, prodeje, inzerce, ale bez institucionální podpory MŠMT, již nedovolují rozesílat další „bulletinová čísla“ širokému okruhu individuálních členů Asociace.

Vydavatel a redakce, na základě Vašich ohlasů, chtějí v tradici Chemických listů jako odborného a současně také členského časopisu, pokračovat a okruh svých čtenářů si nejen zachovat, ale i stále rozšiřovat. Pro letošní rok Vám chceme nabídnout bezplatnou dostupnost všech dvanácti čísel Chemických listů v elektronické formě na známé adrese http://chemicke-listy.vscht.cz/. Tato nabídka platí pouze do konce roku. Vydavatel chce získat nové partnery a jako prvního oslovil Českou společnost průmyslové chemie, která je členem Svazu chemického průmyslu ČR. Do připravovaných jednání s vrcholnými představiteli SCHP ČR o společné účasti na vydávání našeho časopisu vkládáme naději na zachování kontinuity vydávání tohoto periodika, které nejenže přispívá ke tříbení české chemické nomenklatury, ale představuje významný chemický informační zdroj. Chemické listy by se pochopitelně přistoupením dalších členů SCHP ČR více otevřely čtenářům z oborů chemické výroby, farmaceutické chemie a dalších disciplín, ve kterých je chemie každodenní realitou či předmětem odborné středoškolské a univerzitní výchovy. Chceme dále vydávat tématicky zaměřená čísla nejen do oblastí zemědělské chemie, vztahu chemie k životnímu prostředí, ale také pokračovat v číslech věnovaných významným kongresům. V roce 2003 bude červnové číslo věnováno 6. evropskému kongresu o biokatalýze a biotransformacích a srpnové číslo 55. sjezdu Asociací českých a slovenských chemických společností. Svým spektrem článků a postavením na trhu jsou v současné době Chemické listy, po zániku Chemického průmyslu, jediným časopisem, který je fórem odborníků ze všech oblastí chemie, časopisem, ve kterém jsou vydávány přehledné odborné články v českém a slovenském jazyce. Časopis je excerptován ve všech světových databazích. Naším cílem je, aby byl zajímavý pro co nejširší okruh čtenářů – chemiků všech generací.

Chceme-li, aby vzniklá ekonomická situace neohrozila vydávání časopisu, budeme postupovat takto:

- *toto dubnové číslo je posledním bezplatným „bulletinovým číslem“,*
- *omezí se možnost sjednání dotovaného studentského předplatného,*
- *„bulletinová čísla“ – červencové a říjnové – v letošním roce a v roce 2004 – lednové, dubnové, červencové a říjnové – Vám nabízíme již za předplatné. Jeho výši musíme vykalkulovat až na základě počtu přihlášených předplatitelů (viz odpovědní lístek),*
- *pro příští rok, rovněž jako v roce letošním, budeme nabízet členské předplatné také na všech 12 čísel.*

V České republice má několik odborných společností své členské časopisy. Všechny jsou vydávány z příjmů za inzerci a členských příspěvků. Nebylo by ke cti české chemické komunitě, kdyby jeden z nejstarších, chemiky u nás a v řadě jiných zemí, respektovaný časopis v příštím roce nebo dalších letech zanikl. Pokud Vám osud Chemických listů není lhostejný, pak Vás prosíme o pomoc ve formě návrhů a podnětů, které povedou ke zlepšení ekonomické situace, jako jsou např. noví inzerenti, odběratelé na předplatné, změny ve struktuře časopisu a další. Asociace českých chemických společností, vydavatel a redakční rada Chemických listů Vám předem děkují za Vaši podporu.

Vilím Šimánek, Jiří Hanika,
Pavel Drašar, Bohumil Kratochvíl

ODESLAT DO 31.5.2003!

Vyplněný odpovědní lístek můžete poslat: poštou Česká společnost chemická, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1
faxem 222 220 184
e-mailem mblahova@csvts.cz

- ☐ Žádám o sjednání předplatného na čísla 7/2003 a 10/2003 Chemických listů (cena cca 160 Kč)
- ☐ Uvažuji o sjednání předplatného na čísla 1/2004, 4/2003, 7/2004 a 10/204 Chemických listů
- ☐ Uvažuji o sjednání předplatného na celý ročník 2004 Chemických listů (12 čísel)

Jako fakturační adresu pro předplatné uveďte:

.....

Podpis:

Chem. Listy 97, 182 – 191 (2003) Referáty

REMEMBERING THE OLD TIMES OF THEORETICAL CHEMISTRY*

CAMILLE SÁNDORFY

Département de chimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Received 1.1.03, accepted 20.02.03.

Keywords: history of quantum chemistry (approx. 1945–1960), π-electron theories, σ-electron theories, valence and Rydberg excited states, weak intermolecular interactions, hydrogen bonds

Contents

1. Introduction
2. The π-Electron Era
3. The σ-Electron Era
4. Valence and Rydberg Excited States
5. Weak Intermolecular Interactions

1. Introduction

Can you imagine theoretical chemistry without computers? Well, this was the case until about 1948 or a little after. Yet, the origins of this discipline go back to earlier times. It is an offspring of the glorious epoch of theoretical physics which gave quantum mechanics to science and to the world. The bold idea of Louis de Broglie about the dual, wave-corpuscular nature of the electron and the subsequent epoch-making publications of Erwin von Schrödinger, Werner Heisenberg, and Paul Dirac made us understand the atom, crowning the pioneering works of Jean Perrin, Niels Bohr, and Ernest Rutherford.

But chemists are interested in molecules. The first quantum mechanical calculation on the hydrogen molecule was performed by Heitler and London in 1927 (Ref.[1]), only one year after Schrödinger's famous paper. This is usually considered as the year of birth of theoretical or quantum chemistry. It looked that quantum chemical calculations on larger molecules must wait until the arrival of computers.

They did not. What can be done without superior means of computation? A great deal can be done by the simple knowledge of the properties of atomic wave functions, the ways of putting them together to form molecular wave functions; in doing this, symmetry properties play a determining role. A master of this art was Robert Mulliken from the University of Chicago whom Coulson once called the doyen of theoretical chemists. Then came Linus Pauling's book[2] on resonance theory for which he received the Nobel Prize. More recently came the very successful method of Roald Hoffmann[3,4] (The Woodward-Hoffmann rules) who introduced the idea of orbital symmetry conservation combined with correlation diagrams. Yes, much can be done without detailed calculations.

Let us have a look at Herzberg's monumental trilogy[5–7]. The interpretation of molecular spectra is one of the most important aims of theoretical chemistry. Well, Herzberg was able to interpret an immense number of spectra of diatomic as well as small polyatomic molecules without hardly any reference to actual calculations. The correlation diagrams are the secret. The molecule is placed between the united atom and the separated atoms limit (or sometimes a united molecule) and then the interatomic distances are varied. Group theory is an indispensable tool. Without Wigner and Witmer's[8,9] work modern treatment of molecular structure and spectra would be unthinkable.

As to my personal experience, in 1947 I became member of a laboratory of quantum chemistry in Paris. In those years the best known groups of theoretical chemists were in Britain: the one of Coulson and the one of Lennard-Jones. Longuet-Higgins belonged to the former, Pople to the latter. Raymond Daudel introduced theoretical chemistry into France (and beyond). I left Hungary by the end of 1946 with a postdoctoral fellowship to work with Louis de Broglie; when he saw that I was more of a chemist than a physicist he sent me to Daudel who directed a group of about ten researchers under the nominal authority of de Broglie. Daudel has just founded the Centre de Chimie Théorique de France which later became the Centre de Méchanique Ondulatoire Appliquée of the CNRS. (Centre National de la Recherche Scientifique.)

2. The π-Electron Era

This was the π-electron era. In a first approximation π-electrons which form double and triple bonds in unsaturated organic molecules can be treated as a separate problem in the field of the σ-electrons considered as uniform. This focuses quantum chemical work on aromatic and other molecules containing conjugated double bonds (olefins, acetylenes). Benzene, higher aromatics and their substituted derivatives received much attention, not only from theoretical chemists but also from molecular spectroscopists. They absorb and emit light in the visible and near-ultraviolet region of the spectrum. So they were a relatively easy target for both quantum chemists and chemical spectroscopists. The methods of calculation applied to such molecules were approximate wave mechanical methods: the molecular orbital (MO), valence-bond (VB) and free electron (FE) methods. They all had considerable success with π-electron systems. The basic idea of the MO method goes back to the works of Hund and Mulliken in 1928. An early review was given by Mulliken[10]. The MO method had the brightest future, but in those times it was generally used in the simple Hückel approximation[11]. Even that was difficult

* Dedicated to Professor Rudolf Zahradník

without computers. Just after the war, in 1947, we had only desk-calculators. The first hints about computers came in 1948. We were contacted by Bull and by IBM France. That was almost 50 years before Bill Gates.

In 1948 Daudel organized a memorable conference on quantum chemistry in Paris which many great men attended: Louis de Broglie, Max Born, Linus Pauling, C. Venkata Raman, Francis Perrin, R. S. Mulliken, C. A. Coulson, and others. This meeting contributed a great deal to establishig quantum chemistry as a recognized new discipline.

In subsequent years π-electron quantum chemistry flourished. Remarkable articles were published by Lennard-Jones[12]. Coulson and Longuet-Higgins[13,14], and others. Bernard Pullman who fought in the Free-French Army came home after the war and founded another theoretical chemistry laboratory in Paris with Alberte Pullman, Gaston Berthier, and others. Their book entitled *Les théories électroniques de la chimie organique*[15] published in 1952 is a sum of existing knowledge on conjugated organic molecules at that time. At a later stage Lionel Salem achieved an advanced wave mechanical, treatise on conjugated systems which still makes authority[16]. The book by Daudel, Lefebvre and Moser[17] published in 1959 had a different scope; it covered basic wave mechanical principles as well as methods and applications of quantum chemistry. An important contribution that originated in Daudel's laboratory was "la théorie des loges" (Odiot and Daudel[18–20]), an ingenious way of describing electronic distribution and localizability in molecules. It was followed by many attempts to investigate "atoms in molecules". At a later stage Daudel[21] gave a thorough discussion of the results obtained in this respect.

In spite of its rather approximate character the Hückel method rendered great services and was at the origin of a long and fruitful evolution. Per-Olov Löwdin reintroduced the long neglected overlap integrals. His ideas contained in an extensive paper in 1957 foreshadowed the forthcoming periods of quantum chemistry, in particular configuration[42].

The Hückel method implies some drastic approximations. The "linear combination of atomic orbitals" molecular orbitals (LCAO MO) are one-electron functions. The electrons are assigned to such molecular orbitals, two electrons at most being allowed to have the same MO, but one with spin projection α, the other with β, and the total wave function is taken as a simple product of the molecular orbitals of all the electrons considered.

This way of constructing the total wave function implies two fundamental weaknesses. (*1*) The Pauli exclusion principle is not adequately taken into account, since no spin wave functions are introduced. Therefore, spin is not allowed to exert any influence on the energy levels. An obvious consequence is the fact that excited states, where two electrons are in singly occupied orbitals, will have the same energy whether they are singlet or triplet. (*2*) Since every electron has an MO which is computed as if other electrons were not present, this method actually neglects the mutual repulsion between electrons.

Some of the shortcomings of the simple LCAO MO method can be compensated for by determining certain quantities such as the Coulombic and resonance integrals (α and β or γ with the notation of those times) empirically by comparison with experimental data, rather than computing them theoretically. This renders the method semi-theoretical, not a glorious procedure. Yet under the given circumstances in the late nineteen-forties and early nineteen-fifties this had to be done and it helped molecular science progress. Even much later theoretical methods applied to larger molecules contained some occult empirical elements.

The important next step was to include spin explicitly making the total spin-orbital wave function of any stationary state antisymmetric with respect to the exchange of the coordinates of any two electrons in order to satisfy the Pauli principle. If we neglect magnetic interactions, energies of members of the *same* multiplet will be the same since the total wave function will be simply a product of an orbital function and a spin function. At least spin is allowed in this way to influence the electronic energy levels, and make the difference between singlets and triplets, in particular. The wave functions are introduced in the form of Slater determinants which give automatically antisymmetrized wave functions in their study of the electronic spectrum of benzene. Ethylene was first treated by Hartmann[23] and an improved treatment was given by Parr and Crawford[24] in their seminal paper of 1948. This treatment entails many integrals: molecular integrals which are subsequently expressed in terms of atomic integrals. For this the LCAO MO were used. Computing these integrals was not an easy task. Parr and Crawford had the merit of correcting some of the errors made by previous authors. So quantum chemistry departed on a correct footing.

At my beginnings I had problems even with the simple Hückel method. I went through the literature hoping to find a detailed example of such a calculation. At long last I found a not-so-well known paper by Coulson which appeared in the Transactions of the Faraday Society. There he gave some details. Much later, in 1964, I published a book on "Electronic Spectra and Quantum Chemistry"[25]. Remembering the difficulties of my young age I gave detailed examples of calculations using the simple Hückel LCAO MO method, the antisymmetrized MO method, configuration interaction, self-consistent field MO, … Did this help anybody? I can only hope.

I am reproducing from that book a list of the early collections of atomic integrals. Lest we forget. Some people worked hard fifty years ago. Even then some approximations had to be made, especially for three- and four- centre integrals. Some of us still remember Mulliken's approximation. (Replacing $\psi_a\psi_b$ by $1/2\ S_{ab}[\psi_a^2 + \psi_b^2]$ where S_{ab} is the overlap integral.)

Kotani, Amemiya, Ishiguro, Kimura: *Table of Molecular Integrals* (Tokyo: Maruzen, 1955).

Preuss: *Integraltafeln zur Quantenchemie*, 4 vols. (Berlin: Springer-Verlag, 1956, 1957, 1960, 1961).

Roothaan: *Two-center Coulomb Integrals between 1s, 2s, and 2p Orbitals* (Special Technical Report) (The University of Chicago, 1955).

Miller, Gerhauser, Matsen: *Quantum Chemistry Integrals and Tables* (Austin: University of Texas Press, 1958).

Sahni, Cooley: *Derivation and Tabulation of Molecular Integrals*, (Technical Note D146-I) (Washington, D.C.: National Aeronautics and Space Administration, 1959).

More data can be found in the following publications:

Kotani, Amemiya, Simose: Proc. Phys. Math. Soc. Japan *20*, extra number 1(1938); *22,* extra number 1 (1940).

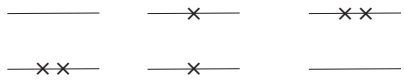
Kopineck: Z. Naturforsch. A *5*, 420 (1950); A *6*, 177 (1951); A *7*, 785 (1952).

Barnett, Coulson: Philos. Trans. R. Soc. London A *243*, 221 (1951).
Roothaan: J. Chem. Phys. *19*, 1445 (1951).
Ruedenberg: J. Chem. Phys. *19*, 1459 (1951).
Ruedenberg, Roothaan, Jaunzemis: J. Chem. Phys. *24*, 210 (1956).
Roothaan: J. Chem. Phys. *24*, 947 (1956).
Preuss: Z. Naturforsch. A *8*, 270 (1953); A *9*, 375 (1954).
Boys, Cook, Reeves, Shavitt: Nature *178*, 1207 (1956).
Mulliken, Rieke, Orloff, Orloff: J. Chem. Phys. *17*, 1248 (1949) (overlap integrals).
Coulson: Proc. Cambridge Philos. Soc. *38*, 210 (1941).
Parr, Crawford: J. Chem. Phys. *16*, 1049 (1948).
Brennan, Mulligan: J. Chem. Phys. *20*, 1635 (1952).
Scrocco, Salvetti: La Ricerca Scientifica *21*, 1629 (1951); *22*, 1766 (1952); *23*, 98 (1953).
Murai, Araki: Prog. Theor. Phys. *8*, 615 (1952) (heteronuclear).

This list is far from complete.

A decisive step forward was made by Boys who first used Gaussians to compute atomic and molecular integrals[26–28]. This made calculations much easier.

The next step was to introduce configuration interaction. In 1949 Coulson and Fischer[29] suggested that what we formerly called states should be called configurations and the word "state" should be reserved for energy levels obtained as a result of a configuration – interaction calculation. If we had the exact wave function a configuration would be a good representation for a given state. Since, however, our functions are approximate, obtained through a variational treatment the configurations can actually mix under appropriate spin and symmetry conditions, the state functions will be linear combinations of wave functions of the configurations. In the case of ethylene for example, limiting the problem to the two π-electrons, there are three configurations:



The first and third can mix. If on the other hand we consider C=N instead of C=C, all three configurations can mix. In one of my early unknown papers I could show that they mix quite appreciably[30]. For the polyelectronic case the number of mixing configurations becomes tremendous, so configuration interaction calculations are a major problem of quantum chemistry. Singly excited, doubly excited, how far to go with energy differences, etc. takes a great deal of experience and judgement. This is well beyond the scope of this paper which intends merely to remember old times.

However, it would be hard not to mention the very successful multi-reference-double-excitation-configuration method (MRD-CI) due to Buenker and Peyerimhoff[115] and the alternant molecular orbital method of Pauncz[112].

The other "great leap forward" was making the wave functions self-consistent.

In most molecular problems in wave mechanics the approximation is made that each electron can be regarded as being in a stationary state in the field of the nuclei and the other electrons. As a consequence the molecular wave function is expressed as a product of one-electron wave functions or spin orbitals.

We quote from D. R. Hartree[32], *Calculation of Atomic Structures* [p. l8]: "For such an approximate wave function ψ, $|\phi_1(j)|^2$ gives the average charge density resulting from the presence of electron j in wave function ϕ_1, and this suggests that each one of these functions ϕ_1, ϕ_2, … ϕ_n should be determined as a solution of Schrödinger's equation for one electron in the field of the nucleus and of the total average charge distribution of the electrons in the other wave functions. In such a treatment, the field of the average electron distribution derived from the wave functions ϕ_1, ϕ_2, … ϕ_n must be the same as the field used in evaluating these wave functions. This aspect has led to the term 'self-consistent field' for the atomic field so determined".

This idea implies the iterative nature of the method. For if we want to determine the field acting on a given electron we have to know the wave functions of all the others. However, we do not know more about them than about the chosen one. Now we quote from Coulson[31].

"Suppose that there are n electrons in our atom. Then let us first guess plausible wave functions for each of these electrons. …Now choose one of the electrons and find the average field provided by all the others. … This process allows us to write down, and then to solve, the wave equation for our chosen electron. We obtain what may be called a first-improved wave function for this electron. This new function may next be used to calculate the average field for a second electron, and enables us to get a first-improved wave function for this electron also. The process is continued until we have a complete bunch of first-improved orbitals. In the same way starting with these we may improve them, one by one, and calculate second-order a.o.'s. This technique is continued until successive iteration makes no appreciable difference to the orbitals. We may then say that the set of a.o.'s are self-consistent."

Fock[33] adapted the method to the very important case where the wave functions are given in the form of Slater determinants. Roothaan[34] has shown that the Hartree-Fock method can be applied with a molecular orbital taken as linear combinations of atomic orbitals. He first worked out the LCAOSCF theory for closed-shell ground states. The calculation of the energies of excited states is more complicated. In most cases excited configurations contain simply filled orbitals and their wave function contains more than one Slater determinant. The conditions of self-consistency for such wave functions were given in different manners by Lefebvre[35], McWeeny[36], and Roothaan[37].

Configuration interaction and self-consistent field remained until this day the most advanced methods of quantum chemistry and they are not mutually exclusive. A variety of methods were proposed to make such calculations easier and, of course, a great deal became possible by using advanced computer techniques.

In the meantime two approximate methods were proposed by Pariser and Parr[38] and by Pople[39] which were widely used. At that point the transition from empirical to nonempirical methods was, to some extent, disappointing. In particular, the electronic excitation energies obtained were rather far from reality. One may say in a not very scientific manner, that in removing about half of the approximations involved with the

empirical methods we diminished the chance for the various errors to cancel each other. Therefore Moffitt[40] and Pariser and Parr[38] proposed to compromise by reintroducing a reasonable amount of empiricism into the nonempirical methods. This was done by neglecting differential overlap and computing certain integrals empirically. Using the Wannier-Löwdin[41] orthogonal atomic orbitals gave a certain amount of justification to these approximations. This method was applied with great success to aromatic and heteroaromatic molecules. Pople[43] reviewed these applications up to 1957. In a series of works Dewar[44], Pople[45], Murrell[46], Longuet-Higgins[47], and McEwen[48,49] reexamined the spectra of aromatic hydrocarbons and their derivatives, combining the LCAO SCF method with perturbation calculations. They also studied some of the ions and free radicals of these molecules. Brion, Lefebvre and Moser[50] proposed other ways of obtaining SCF wave functions.

An interesting point is that the similarity of this method to the simple Hückel method makes it possible to justify the basic approximations of the latter in the case of conjugated hydrocarbons. This was surprising and encouraging at the same time. The simple LCAO and valence-bond methods are sometimes called "naive" methods. As Daudel put it "The naive methods are less naive than they seem to be"[51].

This is about where we stood at the end of the nineteen--fifties. Much of theoretical chemistry was still a π-electron molecular orbital theoretical chemistry.

However, chemistry is not only ground-state chemistry. The electronic spectra of aromatic and other conjugated organic molecules were, from the beginning, a prime target for quantum chemical calculations. These semi-empirical calculations were quite successful and by the mid-nineteen-fifties the spectroscopy of such molecules was well understood.

In addition to molecular orbital methods free electron methods were also instrumental in this. One can think of the works of Platt[52,53], Kasha[54] or H. Kuhn[55] in this respect.

Before closing my reminiscences on the π-electron era I have to say a word about the valence-bond method. There was a time when it gave as much hope for the treatment of larger molecules as did the molecular orbital method. It was actually initiated by Heitler and London who were the first to treat the problem of the hydrogen molecule by a quantum mechanical method. Also, it is behind Pauling's resonance theory[2] which in those times was widely used by chemists. In the valence--bond method the molecular wave function is built from atomic orbitals just as in the molecular orbital method, but with the important difference that the total wave function belonging to the various energy levels of the molecule is constructed directly as a product of atomic orbitals without forming LCAO molecular orbitals. Spin is included right from the beginning and the spin functions are chosen so as to make the total wave function anti-symmetric with respect the exchange of the coordinates of two electrons. As a consequence of the Pauli principle, if there is a bond between two atoms, the two atomic orbitals forming the bond must overlap and therefore the two electrons must have opposite spin projections. This allows a variety of coupling schemes, called "structures". They were called effective if the "bond" is between two neighbours and ineffective otherwise. In the case of benzene, for example, these so-called canonical structures are the two Kekulé-type and three Dewar-type structures. The total wave function is then constructed as a linear combination of wave functions which the molecule would possess if it could be represented by the respective structures alone. This procedure appears to conform more to chemical intuition than the molecular orbital method. I myself liked it very much in my youth and wrote a substantial chapter on it in my book which appeared in 1964 (Ref.[25]). Hartmann[56] and Seel[57] found ways of treating triplet states by the valence-bond method. As to polar "structures" Sklar[58] in his early paper (1937) on benzene made an attempt to include them and in 1950 Craig[59] published a series of papers on butadiene and benzene showing how this can be done.

In more recent times attempts were made to revive this method. Unfortunately, its relative complexity seems to preclude the possibility of competing successfully with the molecular orbital method. The book by Epiotis[60] is well worth reading, however.

Free-electron methods were also historically important for the treatment of the electronic spectra of π-electron systems. In these methods the wave functions of the electrons in a conjugated system are those of particles moving freely along the bonds. This idea was introduced by Pauling[61], Lonsdale[62] and Schmidt[63]; subsequently it was developed into a comprehensive system for the treatment of conjugated molecules by Platt[52,53] (rotator model) and H. Kuhn[55] (metallic or electron gas model). The free electron methods contributed a great deal to the general understanding of the electronic spectra of aromatic molecules, in particular that of Platt whose classification of states and notations are still sometimes used. Many years ago, I reviewed free electron methods in my above mentioned book[25].

Substituted derivatives of aromatic molecules also received a great deal of attention. The elegant experiments of Förster[66] (1950) showed that in OH and NH_2 substituted aromatic compounds the acidity and basicity of the molecule changes with the state of electronic excitation. In two of my unknown papers[67,68] I could show that this parallels large changes in electron density distribution. This is known to have important photochemical consequences. All over these years the Czech school pioneered the structure and reactions of heteroatomic systems. (See, for example, R. Zahradník[64], R. Zahradník, J. Koutecký[65].)

This section on π-electrons may seem to be too long. But theoretical chemistry matured on them.

3. The σ-Electron Era

Predictably, the π-electron era had to come to an end. Attempts to include the σ-electrons and the single bonds were made using bond or group orbitals. However, this is not really satisfactory, especially not when electronic excited states are involved. I felt very strongly about it. So one day in 1953 I called on Professor Daudel who was the chief of the laboratory to which I belonged at that time and asked him for permission to do some work on saturated hydrocarbons. As a result we published a preliminary note in 1954 (Ref. [69]) and later in 1955 already at Université de Montréal I published a long paper in the Canadian Journal of Chemistry[70]. These were to the best of my knowledge the first applications of the Hückel molecular orbital method to σ-electron problems and saturated organic molecules. I proposed three different approxi-

mations. The simplest of these was the "C" approximation. I am citing from the book on "Semiempirical wave mechanical calculations on polyatomic molecules", which we later published with Professor Daudel[21].

"The idea underlying this method is that, as Hückel was able to extract the π-electrons from conjugated molecules and treat them as a separate problem, it may be possible to separate the C–C bonds from the C–H bonds in saturated molecules and still be able to account for some characteristic properties of these molecules. There is clearly much less hope for such an approximation to be successful than there was for the Hückel method. While π-orbitals have a nodal plane where σ-electrons have their greatest density, no such difference exists between orbitals in C–C and in C–H bonds. Yet, one may hope that, in a rough approximation, the C–H bonds, in which the electrons are more tightly bound than in the C–C bonds make a constant contribution to the total energy in different paraffin molecules and to the electronic charge distribution in the C–C bonds.

Thus in the original "C" approximation, all H orbitals and all carbon sp^3 hybrids linked to the H orbitals were disregarded. For the remaining sp^3 orbitals, all the Hückel Coulomb integrals α_C were made equal, as were all the resonance integrals β_{C-C} between atoms which are "chemically" bonded together. Non-neighbour interactions and all overlap integrals were neglected."

For the resonance integral between two sp^3 hybrids on the same carbon atom, a parameter (m) was needed. To obtain information as to its value, this latter parameter was varied. Subsequently Yoshizumi determined its value empirically[71].

Fukui, Kato, and Yonezawa[72,73] applied this simple approximation with surprising success to the calcutation of bond dissociation energies, total energies, and ionization potentials of normal and branched paraffins and many of their substituted derivatives. Taking the energy of the highest occupied orbital for the ionization potential (Koopmans' theorem[74]), they found an almost perfect parallel with experimental values. This led them to the well known frontier orbital considerations which turned out to be important for the following of chemical reactions. Both Fukui[72,73] et al. and Klopman[75] obtained encouraging results in their studies of saturated molecules using this simple "C" approximation.

A step forward was the "H" approximation[70]. In the "H" approximation all sp^3 hybrids and all hydrogen 1s orbitals were included separately for the first time in a semiempirical treatment. Overlap integrals were fully taken into account in this approximation. They have, of course, high values for s-orbitals. The parametrization of this method is somewhat delicate. I proposed a set of parameters in my original paper; later Fukui et al.[73] used a somewhat different set. They obtained fair agreement with observed ionization potentials and heats of formation and used the electronic charge densities in the highest occupied molecular orbital as a reactivity index and found good correlations with the speed of metathetical reactions.

Fukui has reviewed in two publications[76,77] applications of the "H" approximation to problems of chemical reactivity. I should like to mention an earlier (1958) and often overlooked work by Del Re[78,79]. He put the differences in α proportional to differences in electronegativity, and in addition took into account the effect of all adjacent atoms on a given α. This leads to a set of interdependent auxiliary Coulomb parameters, and the whole procedure approaches the electronegativity equalization requirement which is at present often applied. He computed electronic charge densities for many compounds and obtained dipole moments and quadrupole coupling constants in fair agreement with experimental values.

The next stage was the extended Hückel method.

Many years earlier Mulliken[80] and Wolfsberg and Helmholtz[81] suggested a very simple type of parametrization for Hückel calculations which greatly facilitates their extension to σ-electron problems. The Coulomb integrals for an orbital i ($\alpha_i = H_{ij}$) are taken as the appropriate valence-state ionization potentials and the resonance integrals ($\beta_{ij} = H_{ij}$) are expressed as

$$H_{ij} = 0.5\ K\ (H_{ii} + H_{jj})\ S_{ij}$$

All that is needed for this are overlap integrals, which can always be calculated and valence-shell ionization potentials.

Hoffmann[82,.83] took up this parametrization and with a very rapid computer program he was able to apply it to a wealth of molecules with all valence electrons taken into account. Instead of using hybrid orbitals, as had previous authors, he used pure atomic orbitals and included all interactions and all overtop integrals. This is a crude method but it has extreme versatility. It can be applied without difficulty to three-dimensional molecules with the possibility of varying the assumed geometry. It soon revealed itself as an effective method of exploring equilibrium geometries, potential surfaces, energy differences between conformers, and other properties of three--dimensional molecules.

Pople and Santry[84] in 1963 presented a critical Hückel study related to saturated molecules. In particular, they studied the causes of delocalization of σ-electrons. They were able to show that, although the delocalization correction to the energy is appreciable, this is consistent with the approximate additivity of bond energies. (In the ground state.)

The logical next step in the study of σ-electron systems was to adapt the Pariser-Parr-Pople method for the treatment of such systems. A number of attempts have been made to apply semiempirical methods to saturated molecules. I would like to mention the one of Brown and Heffernan[85]. They pointed out in 1958 that when the electronic charge density changes on an atom the core Coulomb integral is not the only one to charge. The change has an influence on the orbital exponent itself and therefore all selected integrals must change. This idea was the basis of their variable electronegativity SCF (VESCF) method.

Then came the CNDO method due to Pople, Santry, and Segal[86,87]. It became the most widely used of the semiempirical methods applicable to all-electron problems and is amenable to a variety of adaptations and improvements. Pople et al. originally proposed two different approximations: "complete neglect of differential overlap" (CNDO) and "neglect of diatomic differential overlap" (NDDO).

In the CNDO method first the usual PPP approximations are made; that is, both overlap integrals and differential overlap are neglected. It is most important to note that some of these will concern differential overlap between atomic orbitals on the *same* atom.

At this stage Pople et al. observed that the "theory is not invariant under a rotation of local axes or under hybridization".

Furthermore, since sets of hybrid and the related "pure" atomic wavefunctions are connected by an orthogonal transformation, the results should be unchanged by such a transformation. However, the neglect of differential overlap in integrals taken over pure orbitals would not, in general, make vanish an integral taken over hybrid orbitals based on the former.

Invariance is restored in both cases if the following new approximation is adopted: "The electron interaction integrals $\gamma_{\mu\nu}$, are assumed to depend only on the atoms to which the atomic orbitals χ_μ and χ_ν belong and not on the actual type of orbital". This is the most characteristic approximation of the CNDO method.

I am not trying to go any further. We are well in the nineteen-sixties and at the "end of the beginning" of theoretical chemistry. The *ab initio* era was on and highly performing computers made quantum chemistry a computational science. The very efficient programs of Pople's group played a decisive role in this.

The semiempirical epoch was reviewed by Pople and Beveridge in their "Approximate Molecular Orbital Theory"[87]. It contains a thorough treatment of CNDO methods and their applications. Daudel and Sándorfy[21] attempted to cover the field up to 1970.

Sinanoglu and Wiberg[88] organized a memorable conference on "Sigma Molecular Orbital Theory" at Yale University. This conference and the book which was subsequently published in 1970 by Yale University Press marked, in my opinion, the watershed between old and new times, between semiempirical and *ab initio* quantum chemistry. In the words of Sinanoglu and Wiberg "Quantum chemistry may be considered to be entering a new phase." …"Semiempirical methods allow calculations on a large number of molecules at little cost. They have been useful as guides in chemical applications, and have gained more and more importance in both organic and inorganic chemistry. However, these methods often involve drastic and as-yet untested approximations. They need, therefore, to be used judiciously." … "Clearly, for predictions on chemical reactions, σ-electrons are essential".

Then came *ab initio*, density functionals, high level configuration interaction and computers and computers. I remember a conversation with Mulliken many years ago. He used the expression "Computer Calculations" with a slight contempt. The implication was that it is just technology, the principles count. Yes, but there are technological advances that transform life and science. One may think about printing, photography, the steam engine, electricity, aeroplanes, semiconductors, nuclear energy, lasers, television, and computers. At present quite advanced calculations can be made not only on electronic energies and charge distribution, but also on even more delicate problems involving molecular vibrations and rotation, even quadrupoles and nuclear spin.

The widely used programs due to Pople's group are playing an essential role.

However, it would be unjust not to add the following.

Historical attempts were made to obtain truly accurate results on small systems at an early stage. Hylleraas[89,91] with his correlated wave functions obtained a near-perfect solution of the problem of the helium atom. Subsequently these were taken up again by Roothaan and Weiss[90]. Another great success of early quantum mechanics was the treatment of the hydrogen molecule by James and Coolidge[92,93]. Like Hylleraas they introduced the interelectronic separation into the variation function. They also carried out similarly successful calculations on some of the excited states of the H_2 molecule. Kołos and Roothaan[94] in 1959 made a two-pronged attack on the ground state and lower excited states of the hydrogen molecule. They first used the best Hylleraas type correlated function, then a James and Coolidge type function with up to 50 terms. For the internuclear distance they obtained 0.74127 Å, the experimental value being 0.74116 Å. A great, hard won Victory.

4. Valence and Rydberg Excited States

I should be tempted to stop at this point. Two important comments have to be made, however. Chemistry is not only ground-state chemistry and chemical bonds are not the only ones that keep molecules together. There are excited states at the one end and weak interactions, van der Waals forces and hydrogen bonds at the other.

Let us first remember the excited states as they were dealt with in quantum chemistry. Molecular spectroscopy is an old science, theoretical chemistry was no prerequisite for it. At least not molecular quantum chemistry. With a basic knowledge of atomic structure and well founded procedures using group theory, correlation diagrams, the Mulliken-Walsh[95] rules, a glorious field has been developed. Think about the lifetime work of Mulliken, the books of F. Hund[96], Eyring, Walter and Kimball[97], H. E. White[98], G. W. King[99], and above all, the monumental volumes of Herzberg[5–7,100]. They contain solid knowledge on small molecules and molecular species, ions and free radicals including those is space. In a recent book B. Stoicheff[101] presented the scientific and human biography of Herzberg which reflects a whole epoch. Quantum chemistry comes into the picture when larger molecules are examined. I have mentioned the great success of quantum chemistry relating to aromatic and other conjugated organic molecules. This was achieved by semiempirical molecular orbital methods with a non-negligible contribution by valence-bond and free-electron considerations. Spectra are characterized by frequencies, intensities and band width; theoretical chemistry can assess all three.

Saturated paraffinic hydrocarbons absorb only in the far ultraviolet where the bands to higher electronic levels of π-electron systems are also found. The spectroscopy of larger organic molecules is sometimes called chemical spectroscopy. The word "chemical" indicates a practical aspect and there is nothing vigorous about it. There are no physical or chemical spectra, only spectra. Often the information obtainable from rotational and even vibrational fine structure has to be sacrificed, but on the other hand chemical knowledge and comparisons between parent molecules are of help with the interpretation of the spectra.

Curiously, the electronic absorption spectra of saturated hydrocarbons were not known until 1967, except the one of methane. That year they were published by Lombos, Sauvageau, and Sándorfy[102] and by Raymonda and Simpson[103] but while Simpson's group interpreted them in terms of a bond orbital method, we assessed them in Rydberg terms. This goes back to a suggestion made by Mulliken in 1935 (Ref.[104]). That in atomic spectra there are Rydberg series is known to any

student. For a long time it was not widely known that molecules also have Rydberg states. Niels Bohr seems to have been the first to have drawn attention to this. The physicists concentrated on diatomic molecules. As to larger, basic organic molecules, Price and his coworkers[105] pioneered the field from the experimental side and Mulliken[106,107] from the theoretical side. Let us cite Herzberg[7]: "More and more highly excited states are obtained by bringing an electron from one of the orbitals filled in the ground state to higher and higher orbitals. These higher orbitals are more and more like atomic orbitals and therefore give rise to Rydberg series of electronic states whose limit corresponds to the complete removal of the electron considered, i.e. to an ionization limit of the molecule". The lower Rydberg states can mix with valence states of the same symmetry and this is photochemically very important. The Rydberg excited states are today a prime target for high resolution molecular spectroscopy ("ZEKE"[108–110] spectroscopy), photoelectron spectroscopy and photochemistry. As to larger molecules Robin summed up the field in three volumes[111]. Rydberg states add a new dimension to theoretical chemistry. The bulk of the merit in this respect belongs to Buenker and Peyerimhoff. Their most important papers started appearing in 1970, but this field is somewhat beyond the scope of these reminiscences. Yet, I would like to refer to an early review by Peyerimhoff[113] and to their chapters written for our book on "The Role of Rydberg States in Spectroscopy and Photochemistry"[114]. Those of Grein and Hachey and Lefebvre-Brion should also be cited in this context. These advanced treatments use *ab initio* methods with a very great number of judiciously chosen configurations. The Rydberg orbitals are strategically located on given bonds or groups.

The electronic transitions best known to chemists are valence (or intravalency) transitions because the wave functions of both the ground and excited states are built exclusively from atomically unexcited atomic orbitals. The visible and near-ultraviolet spectra of aromatic and conjugated olefinic hydrocarbons and their heteroatomic derivatives have been interpreted quite satisfactorily within this framework. The following question, however, is quite legitimate: why do we build our molecular orbitals only from atomically unexcited atomic orbitals? This is only justified by the fact that they suffice to give a fair description of ground states and the lower valence excited states. When we go higher, Rydberg states become a fact of life. Computational techniques for entering Rydberg orbitals into the LCAO scheme consist in building them from atomic orbitals corresponding to higher principal quantum numbers. Such techniques were elaborated and perfected by Buenker and Peyerimhoff[115–116]. I am now citing from Peric and Peyerimhoff[114].

"At first sight any classification of molecular excited states in terms of atomic states as defined by principal, angular and magnetic quantum numbers is surprising. The lower symmetry of the external potential in molecules compared to atoms would speak against such characterization. However, from the earliest quantitative theoretical investigations on low-lying excited states in small molecules such states, which show close resemblance to atomic (united atom or Rydberg) states, are well known. Their occurrence can be explained by the fact that an electron far away from the nuclei experiences a nearly spherical (point charge) potential from the remaining cation.

This simple consideration, however, shows clearly that the distinction between valence (similar electronic spatial extension as the ground state) and Rydberg states (much larger electronic spatial extension than the ground state) breaks down if the molecules becomes larger. From several studies carried out in the past it became obvious, that in systems with more than 5–10 non-hydrogen atoms mixed valence-Rydberg states are frequent".

Then from Buenker, Hirsch, and Yan Li[114]:

"When configuration interaction (CI) calculations became feasible at the *ab initio* level toward the end of the 1960s, there was a widespread tendency to overlook the importance of Rydberg electronic states in molecular spectra. The semiempirical calculations which were available before this time rarely if ever treated other than valence states, as, for example, in the Hückel and Pariser-Parr-Pople treatments of π-electron systems. Rydberg states were well-known from atomic spectroscopy, and as early as 1935 Price[105] had been able to assign them in molecular spectra. The attitude nevertheless persisted among most theoreticians active in electronic structure calculations that states with such diffuse charge distributions were of secondary interest at best because they were not expected to interact strongly with conventional valence states and transitions to them were thought to be comparatively weak. To this can be added the fact that it has always been relatively difficult to achieve a satisfactory description of Rydberg states by semiempirical methods, so there was no effective way to test the above hypotheses prior to the advent of *ab initio* treatments".

Rydberg theoretical chemistry and spectroscopy of typical organic molecules, ions, and radicals was the main subject of some conferences. The first one, "Chemical Spectroscopy and Photochemistry in the Vacuum Ultraviolet". (Valmorin, Québec 1973; organized by Sándorfy, Ausloos, and Robin) brought together spectroscopists, photochemists and theoretical chemists; A. E. Douglas, W. C. Price, Th. Förster, M. B. Robin, S. P. McGlynn, P. Ausloos, D. W. Turner, H. Hartmann, S. D. Peyerimhoff, and others were there, a rare assembly of experts in different but related fields[118].

Rydberg quantum chemistry is a relatively new sector of quantum chemistry and the subject matter is far from being exhausted.

Another domain in which theoretical chemistry played a prominent role is that of charge-transfer complexes. There too, while the original impetus did not come from calculations, computerized quantum chemistry is taking over as a means of treating such systems. Charge-transfer spectra were known in the nineteen-twenties[119–120]. In those times most cases of charge transfer complexes were inorganic, but the field spread over to organic chemistry soon after. According to Mulliken's theory[123,124], the ground state wave function of donor-acceptor complexes is essentially a no-bond wave function, while the wave function of the excited state describes a polar bound state. The transition is then from a no-bond ground state to a charge transfer excited state. (This is the opposite of the case of alkali halides.)

The field of charge-transfer spectra is a very well reviewed field. An excellent review relating mainly to inorganic compounds was given in 1942 by Rabinowitch[125]. Later Andrews[126], Orgel[127], McGlynn[128], and Murrell[129] offered general reviews which treat the problems relating to molecular complexes from a variety of points of view. The "bible" of the field is Mulliken and Person's "Molecular Complexes[130].

The spectra of transition metal complexes distinguish themselves by rather conspicuous features. They have absorption bands in the visible due to their low-lying excited states. The central ions all possess incomplete 3*d* or 4*f* shells. These spectra became understandable in 1951 when Ilse and Hartmann[131] had the idea of applying crystal field theory to these complexes. The degeneracy of the five 3*d* subshells is lifted under the octahedral, tetrahedral, etc. symmetry of the field of the ligands, and transitions are possible between the resulting states. It is sometimes said that this is obvious. It was certainly not in those times. This is a tremendous field; many books and reviews appeared on it. It is beyond the scope of these reminiscences, however.

5. Weak Intermolecular Interactions

Chemistry is not only the domain of chemical, covalent, or electrovalent bonds. Weak ligands, due to van der Waals interactions, and hydrogen bonds are also very important. It is also a field where the junction with thermodynamics is the most readily made.

The concept of hydrogen bonding was introduced around 1920 by Latimer and Rodebusch[132]. Hydrogen bonds are just as ubiquitous in our world as chemical bonds. This applies to both the organic and mineral worlds. Life could not exist without them. I think it is fair to say that hydrogen bond studies became a field of science with the Symposium on Hydrogen Bonding held at Ljubljana in 1957, organized by Professor D. Hadzi[133]. Among the theoretically inclined contributors one can mention Linus Pauling, J. A. Pople, N. Sheppard, G. C. Pimentel, S. Bratos, E. Lippert, R. Blinc, C. A. Coulson, E. R. Lippincott, L. Hofacker, N. D. Sokolov, M. Davies, M. Eigen, A. Terenin, and others.

Many of the "secrets" of hydrogen bonding are linked to the great breadth of the infrared stretching bands of OH (or NH, etc.) bonds. Bratos and Hadzi in 1957 (Ref.[134]) presented a complete theory introducing vibrational anharmonicity as the decisive factor. This was the subject of animated discussions at the second hydrogen bond conference which took place at Schloss Elmau in Germany, organized by E. Lippert. A long series of meetings followed, until this day. The field of hydrogen bonding is still very much alive. Advanced theoretical works are due to Witkowski and Maréchal[135], Sokolov and Savelev[136], Lippincott and Schröder[137] and many other authors. I would like to mention our volumes on hydrogen bonding published in 1976 (Ref.[138]).

It was logical that theoretical chemistry penetrates into the bio-medical field. A. and B. Pullman were the major artisans of this field. Their extensive *Quantum Biochemistry*, was published in 1963 (Ref.[139]). This too became an immense field.

As to *Weak Intermolecular Interactions in Chemistry and Biology*, the "Bible" is the book by Pavel Hobza and Rudolf Zahradník[140] first published in 1980. It is not up to me to review that very important field.

I have to emphasize that I did not attempt to write the history of theoretical chemistry or of a part of it. These reminiscences go to about 1960 only, although some references to more recent works were inevitable. Some of the famous theoretical chemists are mentioned in the text, others whose impact was felt mainly after 1960 could not or hardly be mentioned: Buckingham, Čížek, Clementi, Csizmadia, Dalgarno, Davidson, Jortner, Karplus, Koutecký, Kutzelnigg, Lefebvre, McWeeny, Mezey, Michl, Morokuma, Paldus, Pauncz, Pulay, Ruedenberg and many others, not to speak about the younger generation.

Gerhard Herzberg, Robert Mulliken, Roald Hoffmann, Kenichi Fukui, John Pople, Walter Kohn, were awarded the Nobel Prize. The time will come when somebody will write the history of quantum chemistry which has become a tremendous field. Good luck!

In 1967 R. Daudel (France) with P.-O. Löwdin (Sweden), R. G. Parr (U.S.A.), J. A. Pople (U.K. and U.S.A.), and B. Pullman (France) founded the International Academy of Quantum Molecular Science based at Menton (France). It lends additional prestige to the community of theoretical chemists.

These reminiscences are the result of a conversation I had with Professor Zahradník at the Czech Academy of Sciences for which I am very indebted. Unfortunately, I could not possibly make a good job. First of all, I am too old (82). Then I was not active at every phase of the evolution of theoretical chemistry. I left quantum chemistry for molecular spectroscopy at an early stage. So my report is biased and both too short and too long.

At our epoch everything tends to be too long. Daily newspapers behave like magazines, magazines like books and books are 800 pages long. This is why we have to cut our forests which make oxygen for us. Daily newspapers often contain 60 to 100 pages of which perhaps 6 to 10 are readable. The contents of 800 page books could often be compressed to 80, sometimes 8. Even my report is too long.

It is also too short, because I am not able to make all the important points; nor can I render justice to all the protagonists. Many hundreds more references should be cited. My ways of putting things reflect only my personal views.

I consider myself as a man of the street in theoretical chemistry. But well, in a democracy men of the street are entitled to their opinions. There is a kind of democracy underlying science. Normally, in a scientific publication the author should not show his face. Well, I have shown a part of mine. I probably forgot many things that should have been said. When you are 82, dear Reader you will understand.

REFERENCES

1. Heitler W., London F.: Z. Phys. *44*, 455 (1927).
2. Pauling L.: *The Nature of the Chemical Bond*, 3rd edition. Cornell University Press, Ithaca 1960.
3. Woodward R. B., Hoffmann R.: J. Am. Chem. Soc. *87*, 395 (1965); *87*, 2046 (1965); *87*, 2511 (1965).
4. Woodward R. B., Hoffmann R.: *The Conservation of Orbital Symmetry.* Verlag Chemie, Weinheim 1970.
5. Herzberg G.: *Molecular Spectra and Molecular Structure. I. Spectra of Diatomic Molecules*, 2nd edition. D. Van Nostrand, New York 1950.
6. Herzberg G.: *Molecular Spectra and Molecular Structure. II. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*. D. Van Nostrand, New York 1945.
7. Herzberg G.: *Electronic Spectra and Electronic Structure of Polyatomic Molecules.* D. Van Nostrand, Princeton 1966.

8. Wigner E. P., Witmer E. E.: Z. Phys. *51*, 859 (1928).
9. Wigner E. P.: *Group Theory.* Academic Press, New York 1959.
10. Mulliken R. S.: Rev. Mod. Phys. *4*, 1 (1932).
11. Hückel E.: Z. Phys. *70*, 204 (1931); *72*, 310 (1931); *76*, 628 (1932).
12. Lennard-Jones J. E.: Proc. R. Soc. London, Ser. A *158*, 280 (1937).
13. Coulson C. A.: Proc. R. Soc. London, Ser. A *169*, 413 (1939).
14. Coulson C. A., Longuet-Higgins H. C.: Proc. R. Soc. London, Ser. A *191*, 39 (1947); Ser. A *192*, 16 (1947); Ser. A *193*, 447, 456 (1948); Ser. A *195*, 188 (1948).
15. Pullman B., Pullman A.: *Les théories electroniques de la chimie organique*. Masson, Paris 1952.
16. Salem L.: *The Molecular Orbital Theory of Conjugated Systems*. W. A. Benjamin, New York 1966.
17. Daudel R., Lefebvre R., Moser C.: *Quantum Chemistry; Methods and Applications*. Wiley-Interscience, New York 1959.
18. Daudel R.: *Les fondements de la chimie théorique*. Gauthier-Villars, Paris 1956.
19. Daudel R., Brion H., Odiot S.: J. Chem. Phys. *23*, 2080 (1955).
20. Odiot S.: Cah. Phys. *81*, 1 (1957); *82*, 23 (1957).
21. Daudel R., Sándorfy C.: *Semiempirical Wave Mechanical Calculations on Polyatomic Molecules*, Chapter 3. Yale University Press, New Haven 1971.
22. Göppert-Mayer M., Sklar A. L.: J. Chem. Phys. *6*, 645 (1938).
23. Harttmann H.: Z. Phys. Chem., B *53*, 96 (1943).
24. Parr R. G., Crawford B. L: J. Chem. Phys. *16*, 526 (1948).
25. Sándorfy C.: *Electronic Spectra and Quantum Chemistry*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs 1964.
26. Boys S. F.: Proc. R. Soc. London, Ser. A *200*, 542 (1950); Ser. A *201*, 125 (1950).
27. Boys S. F., Cook F. B., Reeves C. M., Shavitt I.: Nature *178*, 1207 (1956).
28. Boys S. F., Jones I., Shavitt I., in: *Calcul des fonctions d'onde moléculaires*, p. 253. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1958.
29. Coulson C. A., Fischer I.: Philos. Mag., Ser. 7 *11*, 386 (1949).
30. Sándorfy C.: C. R. Acad. Sci. *232*, 2449 (1951).
31. Coulson C. A.: *Valence*, 2nd edition. Oxford University Press, Oxford 1961.
32. Hartree D. R.: *The Calculation of Atomic Structures.* Wiley, New York 1957.
33. Fock V.: Z. Phys. *61*, 126 (1930).
34. Roothaan C. C. J.: Rev. Mod. Phys. *23*, 69 (1951).
35. Lefebvre R.: C. R. Acad. Sci. *240*, 1094 (1955).
36. McWeeny R.: Proc. R. Soc. London, Ser. A *235*, 496 (1956).
37. Roothaan C. C. J.: Rev. Mod. Phys. *32*, 179 (1960).
38. Pariser R., Parr R. G.: J. Chem. Phys. *21*, 466, 767 (1953).
39. Pople J. A.: Trans. Faraday Soc. *49*, 1375 (1953).
40. Moffitt W. E.: Proc. R. Soc. London, Ser. A *202*, 534 (1950); Ser. A *210*, 224 (1951).
41. Löwdin P. O.: J. Chem. Phys. *18*, 365 (1950).
42. Löwdin P. O.: Adv. Chem. Phys. *2*, 207 (1957).
43. Pople J. A.: J. Phys. Chem. *61*, 6 (1957).
44. Dewar M. J. S, Longuet-Higgins H. C.: Proc. Phys. Soc., A *67*, 795 (1954).
45. Pople J. A.: Proc. Phys. Soc., A *68*, 81 (1955).
46. Murrell J. N., Longuet-Higgins H. C.: Proc. Phys. Soc., A *68*, 329 (1955).
47. Longuet-Higgins H. C., Pople J. A.: Proc. Phys. Soc., A *68*, 591 (1955).
48. McEwen K. L., Longuet-Higgins H. C.: J. Chem. Phys. *24*, 771 (1956).
49. Murrell J. N, McEwen K. L.: J. Chem. Phys. *25*, 1143 (1956).
50. Brion H., Lefebvre R., Moser C. M.: J. Chem. Phys. *23*, 1972 (1955).
51. Daudel R.: *Structure électronique des molécules*, p. 210. Gauthier-Villars, Paris 1962.
52. Platt J. R.: J. Chem. Phys. *17*, 481 (1949); *18*, 1168 (1950).
53. Klevens H. B., Platt R.: J. Chem. Phys. *17*, 470 (1949).
54. Kasha M.: Chem. Rev. *41*, 401 (1947).
55. Kuhn H.: Helv. Chim. Acta *31*, 1441 (1948); *32*, 2243 (1949).
56. Hartmann H.: Z. Naturforsch., A *2*, 684 (1947).
57. Seel F.: Z. Naturforsch., A *3*, 180 (1948).
58. Sklar A. L: J. Chem. Phys. *5*, 669 (1937).
59. Craig D. P.: Proc. R. Soc. London, Ser. A *200*, 272, Ser. A 390, Ser. A 401 (1950).
60. Epiotis N. D.: *Unified Valence Bond Theory of Electronic Structure*. Springer, Berlin 1982.
61. Pauling L.: J. Chem. Phys. *4*, 673 (1936).
62. Lonsdale K.: Proc. R. Soc. London, Ser. A *159*, 149 (1937).
63. Schmidt O.: Z. Phys. Chem., B *47*, I (1940).
64. Zahradník R.: Adv. Heterocycl. Chem. *5*, 69 (1965).
65. Zahradník R., Koutecký J.: Adv. Heterocycl. Chem. *5*, 69 (1965).
66. Förster T.: Z. Elektrochem. *54*, 42 (1950); *54*, 531 (1950).
67. Sándorfy C.: C. R. Acad. Sci. *232*, 617 (1951).
68. Sándorfy C.: Can. J. Chem. *31*, 439 (1953).
69. Sándorfy C., Daudel R.: C. R. Acad. Sci. *238*, 93 (1954).
70. Sándorfy C.: Can. J. Chem. *33*, 1337 (1955).
71. Yoshizumi H.: Trans. Faraday Soc. *53*, 125 (1957).
72. Fukui K., Kato H., Yonezawa T.: Bull. Chem. Soc. Jpn. *33*, 1197, 1201 (1960).
73. Fukui K., Kato H., Yonezawa T.: Bull. Chem. Soc. Jpn. *34*, 442, 1111 (1960).
74. Koopmans T.: Physica *1*, 104 (1934).
75. Klopman G.: Helv. Chim. Acta *45*, 711 (1962); *46*, 1967 (1963).
76. Fukui K., in: *Modern Quantum Chemistry* (Sinanoglu O., ed.), Part I. Academic Press, New York 1965.
77. Fukui K., in: *Molecular Orbitals in Chemistry, Physics, and Biology* (Löwdin P. O., Pullman B., eds.). Academic Press, New York 1964.
78. Del Re G.: J. Chem. Soc. *1958*, 4031.
79. Del Re G., in: *Electronic Aspects of Biochemistry* (Pullman B., ed.). Academic Press, New York 1964.
80. Mulliken R. S.: J. Chim. Phys. *46*, 497, 675 (1949); *46*, 675 (1949).
81. Wolfsberg M., Helmholtz L.: J. Chim. Phys. *20*, 837 (1952).
82. Hoffmann R.: J. Chem. Phys. *39*, 1397 (1963).

83. Hoffmann R.: J. Chem. Phys. *40*, 2745, 2474, 2480 (1964).
84. Pople J. A., Santry D. P.: Mol. Phys. *7*, 269 (1963–64).
85. Brown R. D., Heffernan M. L.: Trans. Faraday Soc. *54*, 757 (1958).
86. Pople J. A., Santry D. P., Segal G. A.: J. Chem. Phys. *43*, S129 (1965).
87. Pople J. A., Beveridge D. L.: *Approximate Molecular Orbital Theory*. McGraw-Hill, New York 1970.
88. Sinanoglu O., Wiberg K. B.: *Sigma Molecular Orbital Theory.* Yale University Press, New Haven 1970.
89. Hylleraas E. A.: Z. Phys. *54*, 347 (1929).
90. Roothaan C. C. J., Weiss A. M.: Rev. Mod. Phys. *32*, 194 (1960).
91. Hylleraas E. A.: Z. Phys. *65*, 209 (1930); *66*, 453 (1930); *83*, 739 (1933).
92. James H. M., Coolidge A. S.: J. Chem. Phys. *1*, 825 (1933); *3*, 129 (1935).
93. James H. M., Coolidge A. S., Present R. D.: J. Chem. Phys. *4*, 193 (1936).
94. Kołos W., Roothaan C. L.: J. Rev. Mod. Phys. *32*, 205, 219 (1960).
95. Walsh A. D.: J. Chem. Soc. *1953*, 2260.
96. Hund F.: *Linienspectren und Periodisches System der Elemente*. Springer, Berlin 1927.
97. Eyring H., Walter J., Kimball G. E.: *Quantum Chemistry.* Wiley, New York 1944.
98. White H. E.: *Introduction to Atomic Spectra and Atomic Structure*. McGraw-Hill, New York 1934.
99. King G. W: *Spectroscopy and Molecular Structure.* Holt, Rinehart and Winston, New York 1964.
100. Herzberg G.: *The Spectra and Structures of Free Radicals*, 2nd edition. Dover, New York 1988.
101. Stoicheff B.: *Gerhard Herzberg*. McGill-Queen's University Press, Montréal-Kingston 2002.
102. Lombos B. A., Sauvageau P., Sándorfy C.: J. Mol. Spectrosc. *24*, 253 (1967).
103. Raymonda J. W., Simpson W. T.: J. Chem. Phys. *47*, 430 (1967).
104. Mulliken R. S.: J. Chem. Phys. *3*, 517 (1935).
105. Price W. C.: Adv. Spectrosc. *1*, 56 (1959).
106. Mulliken R. S.: J. Am. Chem. Soc. *86*, 3183 (1964); *88*, 1849 (1966); *91*, 4615 (1969).
107. Mulliken R. S.: Acc. Chem. Res. *9*, 7 (1976).
108. Schlag E. W., Levine R. D.: Commun. At. Mol. Phys. *33*, 159 (1997).
109. Dietrich H. J., Lindner R., Müller-Dethlefs K.: J. Chem. Phys. *101*, 3399 (1994).
110. Held A., Schlag E. W., in: *The Role of Rydberg States in Spectroscopy and Photochemistry* (Sándorfy C., ed.). Kluwer Academic Publisher, New York 1999.
111. Robin M. B.: *Higher Excited States of Polyatomic Molecules*, vols I–II, vol. III. Academie Press, New York 1974–1975, 1985.
112. Pauncz R.: *Alternant Molecular Orbital Method* (Saunders W. B., ed.). London 1967.
113. Peyerimhoff S. D.: Gazz. Chim. Ital. *108*, 411 (1978).
114. Sándorfy C. (ed.): *The Role of Rydberg States in Spectroscopy and Photochemistry.* Kluwer 1999.
115. Buenker R. J., Peyerimhoff S. D.: Theor. Chim. Acta *12*, 183 (1968); *35*, 33 (1974); *39*, 217 (1975).
116. Fischlbach V., Buenker R. J., Peyerimhoff S. D: Chem. Phys. *5*, 265 (1974).
117. Shih H., Buenker R. J., Peyerimhoff S. D., Wirsam B.: Theor. Chim. Acta *18*, 277 (1970).
118. Sándorfy C., Ausloos P., Robin M. B. (eds.): *Chemical Spectroscopy and Photochemistry in the Vacuum Ultraviolet*. Reidel, Dordrecht 1974.
119. Przibram K.: Z. Phys. *20*, 196 (1923).
120. Kondratjew V.: Z. Phys. *39*, 191 (1938).
121. Franck J., Kuhn H., Rollefson G.: Z. Phys. *43*, 155 (1927).
122. Hilsch R. Pohl R. W: Z. Phys. *57*, 145 (1929); *59*, 812 (1930).
123. Mulliken R. S.: J. Am. Chem. Soc. *74*, 811 (1952).
124. Mulliken R. S: J. Phys. Chem. *56*, 801 (1952).
125. Rabinowitch E.: Rev. Mod. Phys. *14*, 112 (1942).
126. Andrews L. J.: Chem. Rev. (Washington, D.C.) *54*, 713 (1954).
127. Orgel L. E.: Quant. Rev. *8*, 422 (1954).
128. McGlynn S. P.: Chem. Rev. (Washington, D.C.) *58*, 1113 (1958).
129. Murrell J. N: Quant. Rev. *15*, 191 (1961).
130. Mulliken R. S., Person W. B.: *Molecular Complexes* (A Lecture and Reprint Volume). Wiley, New York 1969.
131. Ilse F. E., Hartmann: Z. Phys. Chem. *197*, 239, 751 (1951), *197*, 751 (1951).
132. Latimer W. M., Rodebusch W. H.: J. Am. Chem. Soc. *42*, 1419 (1920).
133. Hadzí D.(ed.): *Hydrogen Bonding*. Symposium Publications Division of Pergamon Press, London 1959.
134. Bratos S., Hadzi D.: J. Chem. Phys. *21*, 991 (1957).
135. Maréchal Y., Witkowski A.: J. Chem. Phys. *48*, 3697 (1968).
136. Sokolov N. D, Savelev V. A.: Chem. Phys. *22*, 383 (1977).
137. Lippincott E. R., Schröder R: J. Chem. Phys. *23*, 1099 (1955).
138. Zundel G., Schuster P., Sándorfy C. (eds.): *The Hydrogen Bond*, vols. 1–3. North-Holland 1976.
139. Pullman B., Pullman A.: *Quantum Biochemistry*. Interscience, New York 1963.
140. Hobza P., Zahradník R.: *Weak Intermolecular Interactions in Chemistry and Biology*. Academia, Prague 1980.

C. Sándorfy *(Département de chimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada):* **Remembering the Old Times of Theoretical Chemistry**

After recalling the early stages of quantum chemistry, a more detailed and systematic description of the post-war period (approx. 1945–1960) follows. The essential features of both π-electron and σ-electron eras are described: the simplest versions as well as procedures including electron repulsion are considered. Then attention is paid to valence and Rydberg excited states. The review is closed by remarks on hydrogen bonds and other weak intermolecular interactions.

KATHEPSIN D A JEHO VZTAH K ONKOGENEZI

MARKÉTA KROULÍKOVÁ[a], MARTIN FUSEK[b] a TOMÁŠ RUML[a,*]

[a]Ústav biochemie a Centrum integrované genomiky, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, [b]Sigma-Aldrich s.r.o., Pobřežní 46, 186 21 Praha 8 e-mail: kroulikm@hotmail.com, tomas.ruml@vscht.cz, Mfusek@eurnotes.sial.com

Došlo 17.4.02, přepracováno 25.4.02, přijato 3.9.02.

Klíčová slova: kathepsin D, aspartátová proteasa, aktivační peptid, nádor prsu, marker rakoviny

Obsah

1. Fyziologická úloha kathepsinu D
   1.1. Kathepsin D
   1.2. Transport prokathepsinu D v nenádorových buňkách
   1.3. Dva typy receptorů mannosa-6-fosfátu
   1.4. Primární struktura, aktivace a specifita prokathepsinu D
   1.5. Fyziologické funkce kathepsinu D
2. Role prokathepsinu D v onkogenezi
   2.1. Objev zvýšené koncentrace pCD a CD v nádorových buňkách prsu
   2.2. pCD jako prognostický marker rakoviny prsu
   2.3. Role estrogenů při expresi a sekreci pCD v nádorových buňkách prsu
   2.4. Interakce pCD s receptorem mannosa-6-fosfátu a transport CD nezávislý na tomto receptoru
      2.4.1. Transport pCD v B lymfoblastech vykazujících „I-cell“ onemocnění
      2.4.2. Asociace pCD s prosaposinem
   2.5. Hypotézy o funkci pCD při metastáze
      2.5.1. Nepřímé působení pCD na nádorové buňky – proteolytická aktivita
      2.5.2. Autokrinní mitogenní aktivita pCD
3. Role aktivačního peptidu pCD v onkogenezi
   3.1. Vliv aktivačního peptidu na proliferaci nádorových buněk prsu
   3.2. Interakce konjugátu pCD-FITC s nádorovými buňkami prsu
   3.3. Lokalizace vazebného místa aktivačního peptidu pro povrchový receptor
4. Závěr

* Autor pro korespondenci

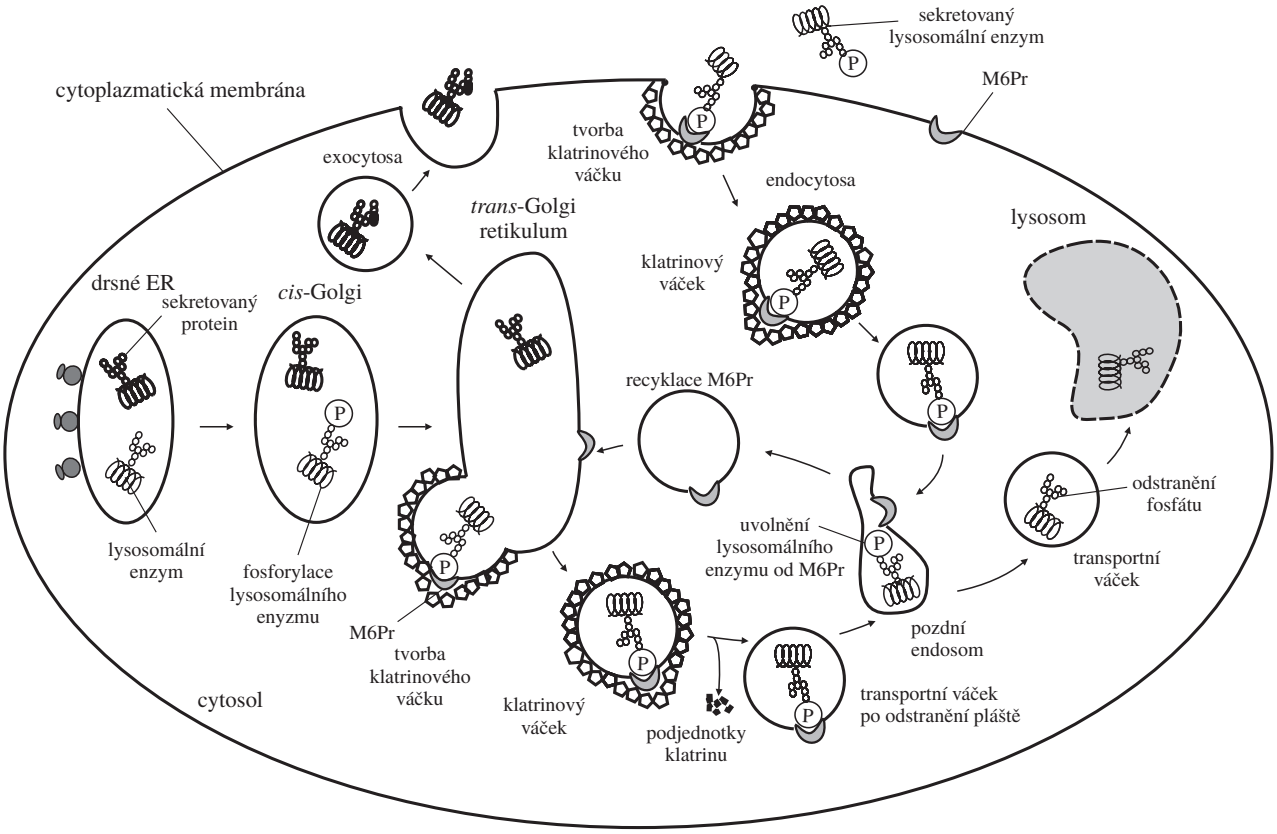
1. Fyziologická úloha kathepsinu D

1.1. Kathepsin D

Kathepsin D (CD, E.C. 3.4.23.5) je lysosomální aspartátová proteasa syntetizovaná téměř ve všech savčích buňkách. Jako kathepsiny poprvé označil R. Willstätter a E. Bamann kyselé proteasy, které byly nalezeny ve vodných extraktech různých tkání zvířat[1]. První studie o proteasové aktivitě v extraktech se objevily v roce 1941 (cit.[2]). Na základě jejich specifity k různým syntetickým substrátům jim byla přidělena jména kathepsin A, B, C, D a E. Dnes za kathepsiny považujeme intracelulární enzymy, které rozkládají bílkoviny v prostředí o nízkém pH (optimální pH ~ 3,5–5). Kathepsiny jsou z velké části umístěny v lysosomálních frakcích, čímž se liší od jiných proteas v buňce (např. trypsin, chymotrypsin). Podle mechanismu účinku patří většina kathepsinů mezi cysteinové (thiolové) peptidasy. Kathepsin D je však zástupcem aspartátových peptidas. V lidském genomu je gen pro prokathepsin D (proenzym kathepsinu D, pCD) lokalizován na patnáctém lokusu 11p chromosomu, obsahuje devět exonů a velikost jeho primárního transkriptu je 2,2 kb (cit.[4]).

1.2. Transport prokathepsinu D v nenádorových buňkách

V nenádorových liniích je pCD syntetizován na endoplazmatickém retikulu (ER) jako prekurzor o molekulové hmotnosti 52 kDa, který ještě v endoplazmatickém retikulu podléhá N-glykosylaci nejčastěji dvěma oligosacharidovými řetězci, jež obsahují mannosu, která je fosforylována na mannosa-6-fosfát (M6P). Jedna molekula pCD tedy nese dva signály pro vazbu receptorů mannosa-6-fosfátu (M6Pr). Interakce s těmito receptory analogicky jako u ostatních lysosomálních enzymů zajišťuje transport pCD do lysosomů[5,6]. Většina M6Pr je primárně lokalizována v *trans*-Golgiho retikulu (obr. 1), kde také dochází k jejich interakci s lysosomálními enzymy nesoucími M6P. Komplex těchto M6Pr s připojenými lysosomálními enzymy je soustřeďován na malém úseku membrány *trans*-Golgiho retikula[7,8], která je na straně cytosolu pokryta strukturní bílkovinou klatrinem. Působením klatrinu je tento úsek membrány oddělen a vytvářejí se speciální transportní váčky, z nichž je klatrin postupně odbouráván (obr. 1). Tyto holé transportní váčky fúzují s třídícími váčky, a tvoří tak organelu zvanou pozdní endosom, uvnitř které je pH okolo 5,5. Toto snížení pH způsobí uvolnění M6Pr z lysosomálních enzymů, protože vazba M6Pr s M6P je stabilní při pH 6,5–7. Z pozdních endosomů vznikají dva typy váčků. Jeden typ váčků obsahuje lysosomální enzymy (ve formě fosforylovaných glykoproteinů). V těchto váčcích, které fúzují s lysosomy, je od C6 mannosy fosfatasou odštěpen fosfát (obr. 1), což zabraňuje zpětnému navázání transportovaných proteinů na M6Pr. Druhý typ váčků obsahuje M6Pr, který se navrací zpět do *trans*-Golgiho retikula (obr. 1).



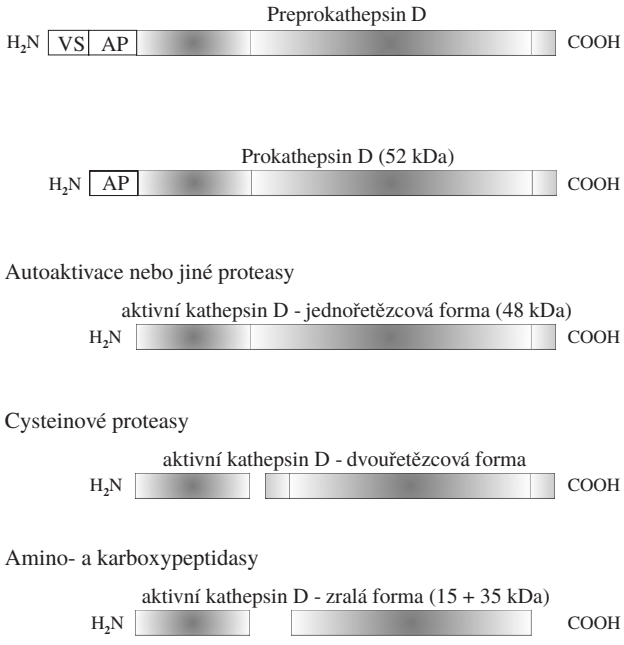
Obr. 1. **Transport prokathepsinu D v nenádorových buňkách**. Lysosomální enzymy migrují z drsného endoplazmatického retikula (ER – vlevo) do *cis*-Golgiho aparátu, kde dochází k fosforylaci M6P zbytků. V *trans*-Golgiho retikulu se lysosomální enzymy naváží na vysoce specifický membránový receptor M6Pr, který zajišťuje transport těchto enzymů do váčků pokrytých strukturní bílkovinou klatrinem. Klatrin depolymerizuje a vzniklé holé váčky fúzují s pozdními endosomy, v nichž se odděluje fosforylovaný enzym od M6Pr, což je způsobeno nízkým pH (5,5). M6Pr recykluje zpět do *trans*-Golgiho retikula a fosforylovaný enzym je inkorporován do odlišných transportních váčků, které pučí z pozdních endosomů. Zde probíhá defosforylace a váčky fúzují s lysosomy. M6Pr se také vyskytují na cytoplazmatické membráně (vpravo nahoře). Sekretované lysosomální enzymy tak mohou být transportovány do lysosomů po endocytose zprostředkované M6Pr

1.3. Dva typy receptorů mannosa-6-fosfátu

Jak bylo zmíněno výše, slouží interakce proteinů s M6Pr k transportu hydrolas z *trans*-Golgiho aparátu do lysosomů. Dosud jsou známy pouze dva druhy M6P receptorů interagujících s pCD. První z nich, M6P/IGF-II receptor, je transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti 275 kDa, který specificky váže také IGF-II (insulin-like growth factor II) a zprostředkovává endocytosu sekretovaných lysosomálních enzymů a IGF-II. Druhý typ receptoru o molekulové hmotnosti 46 kDa se neúčastní endocytosy, je závislý na přítomnosti kationtů. Experimenty s buňkami postrádajícími jeden či druhý typ těchto receptorů ukázaly, že pCD je přednostně sekretován fibroblasty, kterým chybí M6P/IGF-II receptor[9].

1.4. Primární struktura, aktivace a specifita prokathepsinu D

Primární strukturu prekurzoru pro lidský kathepsin D tvoří řetězec 412 aminokyselinových zbytků a nazývá se preprokathepsin D. Preprokathepsin D myší obsahuje 410 aminokyselinových zbytků, u krys je to 407 a u kuřat 398 se jedná o zbytků. Prekurzor vždy obsahuje N-vedoucí sekvenci (VS, obr. 1), která u lidí obsahuje 20 aminokyselinových zbytků a je odštěpena během translokace přes membránu endoplazmatického retikula. Vzniká tak inaktivní prokathepsin D (392 aminokyselinových zbytků u lidí, což odpovídá molekulové hmotnosti 52 kDa). Jak vyplývá z podobnosti aminokyselinové sekvence prokathepsinu D a pepsinogenu, prokathepsin D může podléhat autokatalytickému štěpení za vzniku aktivního kathepsinu D (CD) o molekulové hmotnosti 48 kDa (cit.[8]). Aktivace CD může být katalyzována také dalšími proteasami, které jsou přítomné v lysosomech[10]. Peptid o molekulové hmotnosti 4 kDa odštěpený během aktivace CD se nazývá aktivační peptid (AP, obr. 1). CD je dále štěpen na N-koncový lehký řetězec (15 kDa) a C-koncový těžký řetězec (30 kDa), které jsou spojeny nekovalentními interakcemi, a tvoří tak dvouřetězcovou formu CD. Většina lidského a prasečího CD existuje výhradně ve dvouřetězcové formě, zatímco výskyt CD skotu je téměř rovnoměrně rozdělen mezi jedno- a dvouřetězcové formy. Myší a krysí CD existuje prakticky pouze v jednořetězcové formě. Aktivní místo CD je tvořeno dvěma aspartáty, má tvar štěrbiny podobně jako u ostatních aspartá-



Obr. 2. **Maturace prokathepsinu D**; vedoucí sekvence (VS) pro interakci se signální rozpoznávací částicí, která se váže na membránový receptor endoplazmatického retikula, VS je následně odštěpena signální peptidasou

tových proteas a je podobné aktivnímu místu pepsinu. Štěpením B řetězce inzulínu jako substrátu bylo potvrzeno, že také specifita CD je pepsinu podobná a při štěpení jsou preferovány peptidové vazby za hydrofobními aminokyselinami[3]. Proteolytickou aktivitu lze podobně jako u ostatních aspartátových proteas inhibovat pepstatinem.

1.5. Fyziologické funkce kathepsinu D

CD je přítomen v lysosomech všech savčích buněk, kde přispívá hlavním podílem k degradaci proteinů ve spolupráci s ostatními proteasami[11]. Jeho zastoupení se liší u různých tkání a je rovněž přítomen v endosomech určitých typů buněk jako např. makrofágů a hepatocytů. Nejčastěji se vyskytuje jako rozpustný protein, ale v endosomech může být až z 20 % vázán na membrány.

CD hraje důležitou roli také při proteolytické úpravě prekurzorů hormonů nebo antigenů pro jejich prezentaci[12,13]. Glykoproteiny II. třídy MHC II (major histocompatibility complex) jsou za fyziologických podmínek přítomny jen na buňkách prezentujících antigen. V endoplazmatickém retikulu je vazebné místo na MHC II blokováno krátkým peptidem (tzv. invariantním řetězcem), takže se do něj nemohou navázat peptidové fragmenty vzniklé štěpením vlastních bílkovin. Komplex glykoproteinů MHC II s invariantním řetězcem je z endoplazmatického retikula transportován přes Golgiho aparát do sekrečních váčků, které po oddělení od Golgiho aparátu fúzují s endosomy. Po fúzi endosomu se sekrečním váčkem degradují kathepsiny v endosomech invariantní řetězce a do uvolněného vazebného místa glykoproteinů MHC II se pak mohou navázat peptidové fragmenty endocytovaných proteinů. Degradace pohlcených cizorodých proteinů v endosomech patří mezi další funkce kathepsinů. Byla publikována také data naznačující roli CD při obnově tkání[14].

CD se účastní pravděpodobně také některých patologických procesů, jako jsou proliferace rakovinných buněk, uvolňování β-amyloidu z prekurzoru při Alzheimerově chorobě.

2. Role prokathepsinu D v onkogenesi

2.1. Objev zvýšené koncentrace pCD a CD v nádorových buňkách prsu

Zvýšená exprese prokathepsinu D (pCD) v nádorových buňkách prsu (dále NBP) byla zjištěna náhodou Henrim Rochefortem[15–17] na počátku 80. let. H. Rochefort v té době zkoumal vliv estrogenů na NBP a snažil se izolovat proteiny, jejichž exprese byla estrogeny vyvolána. Domníval se, že by tyto proteiny mohly hrát důležitou roli při řízení růstu nádoru a jeho invaze a působit jako autokrinní či parakrinní faktory. Velkou pozornost vzbudil protein 52K, který byl ve velkém množství sekretován MCF7 buňkami (estrogen pozitivní NBP) a vykazoval mitogenní aktivitu[18]. Navíc byl indukován antiestrogenem tamoxifenem v několika antiestrogen-rezistentních buněčných liniích, zatímco tamoxifen inhiboval jeho produkci v divokém typu buněk MCF7 (cit.[19]). Kritickými kroky pro identifikaci 52K proteinu jako pCD bylo izolovat specifické monoklonální protilátky[20], vyčistit tento sekretovaný protein[21] a studovat jeho ko- a posttranslační modifikace. Interakce neznámého proteinu s receptory mannosa-6-fosfátu vedly k hypotéze, že se jedná o lysosomální hydrolasu[4]. Čistý 52K byl později identifikován jako prokathepsin D (pCD) na základě jeho proteolytické aktivity v kyselé oblasti pH, inhibice pepstatinem, jeho interakce s protilátkami proti pCD a sekvence prvních patnácti aminokyselin[22]. Pořadí ostatních aminokyselin pCD bylo určeno sekvenováním cDNA získaných z lidských jater a sleziny. Srovnáním aminokyselinové sekvence pCD z MCF7 a ze zdravých ledvinových buněk bylo zjištěno pět záměn, z nichž jedna byla v AP části (Ala→Val). V buněčných liniích ZR-75-1 (estrogen negativní NBP) a dalších liniích byly sice prokázány další záměny aminokyselin, celkově je však sekvence pCD v NBP konzervativní.

2.2. pCD jako prognostický marker rakoviny prsu

pCD je v NBP exprimován dva- až pětkrát více ve srovnání s jinými buňkami, jako jsou například fibroblasty nebo zdravé buňky prsních žláz[23]. Metodami imunohistochemie, imunoanalýzou cytosolické frakce, Northern a Western blot analýzami či *in situ* hybridizací bylo zjištěno, že se v NBP zvyšuje množství jak mRNA kódující pCD, tak koncentrace přepisovaného proteinu[23]. Ukazuje se, že nadprodukce pCD není způsobena amplifikací genu ani chromosomálním přeskupením[24]. Proto se pCD dnes již úspěšně využívá jako nezávislý prognostický marker při diagnostice klinické metastázy rakoviny prsu. pCD není jakožto marker rakoviny prsu závislý na jiných parametrech, jako je například inhibitor urokinasy. Otázkou zůstává, zdali může být pCD použit jako marker pro jiné typy rakoviny např. v hepatomech, melanomech a rakovinných buňkách prostaty. V klinických laboratořích jsou ke

stanovování koncentrací pCD a CD používány standardní imunochemické metody založené na použití dvou monoklonálních protilátek[25]. Podobné výsledky lze získat také stanovením proteolytické aktivity CD v cytosolu po jeho aktivaci snížením pH. Odlišné výsledky jsou často získávány různými imunochemickými metodami, což může být způsobeno použitím různých protilátek, různých metod fixace tkání či ztrátou sekretované formy pCD během fixace.

2.3. Role estrogenů při expresi a sekreci pCD v nádorových buňkách prsu

Ve zdravé savčí buňce, například v lidském fibroblastu, je většina syntetizovaného pCD cílena do lysosomů, kde rychle probíhá jeho štěpení na aktivní formu kathepsinu, a jen malé množství prokathepsinu je akumulováno v jiných částech buňky nebo sekretováno[26]. V několika liniích hormonálně závislých (MCF7, ZR-Z5-1) a nezávislých (MDA-MB-231, BT20) NBP byla zjištěna značně zvýšená sekrece pCD (nad 50 %) a akumulace 52 kDa a 48 kDa forem v buňkách. Změna transportu a sekrečního mechanismu pCD je pravděpodobně způsobena nadprodukcí pCD, který vysytí vazebná místa M6P receptorů. Nadprodukce pCD a dalších lysosomálních proteas je v hormonálně závislých NBP indukována estrogeny. Estrogeny v těchto buňkách navíc snižují expresi M6Pr. Bylo prokázáno, že snížení exprese může být regulováno na úrovni transkripce i translace[27]. Sekreci lysosomálních enzymů z NBP tedy usnadňují estrogeny dvěma způsoby, neboť velké množství exprimovaného pCD má k dispozici snížený počet M6Pr. Princip indukce exprese pCD v hormonálně nezávislých NBP nebyl dosud pozorován.

2.4. Interakce pCD s receptorem mannosa-6-fosfátu a transport CD nezávislý na tomto receptoru

S cílem vysvětlit sekreci a transport pCD v nádorových buňkách byly studovány jeho interakce s M6Pr. Ukázalo se, že *in vitro* interaguje pCD s M6P/IGFIIr a jejich vzájemná afinita je srovnatelná s afinitou pCD a M6Pr v normálních buňkách[28,29]. Při pokusech v NBP a sledování transportu pCD do lysosomů však bylo zjištěno, že M6P/IGFIIr vykazuje sníženou aktivitu. Gen pro M6P/IGFIIr je kódován na 6q chromosomu a patří mezi nádorově supresorové geny[30], které kódují proteiny, udržující normální somatické buňky v G0 fázi a potlačující proliferaci. K neregulované proliferaci buněk a vzniku nádoru dochází až v případě, že jsou tyto alely homozygotně mutovány. Takováto ztráta heterogenity na úseku 6q chromosomu kódujícím M6P/IGFIIr lokus byla popsána v hepatokarcinomech[30] a rovněž v NBP (cit.[31]).

Snížená afinita M6Pr k pCD (způsobená mutací genu pro M6Pr) či snížení koncentrace těchto receptorů působením estrogenů (viz předchozí kapitola) umožňuje vazbu pCD na jiné receptory než M6Pr. V NBP může být tedy pCD transportován nezávisle na M6Pr. Alternativní transport pCD se projevuje nízkou akumulací zralého enzymu v lysosomech a zvýšenou sekrecí proenzymu[26]. V některých antiestrogen-resistentních liniích NBP byl nově syntetizovaný pCD sekretován až z 90 % (cit.[19,32]). Transportu pCD pomocí M6Pr lze v různých buňkách zabránit jejich kultivací v přítomnosti NH_4Cl, neboť tato slabá báze zvýšením pH v „třídících“ endosomech zabraňuje rozpadu pCD-M6P/IGFIIr a následné recyklaci receptoru do Golgiho aparátu[33]. Po přidání NH_4Cl do růstových médií fibroblastů a zdravých buněk prsu se nově syntetizovaný pCD sekretuje ven z buněk namísto jeho transportu do lysosomů. Naopak v mnoha liniích NBP a nádorových buněk vaječníků dochází ke zvýšení intracelulární hladiny proenzymu po kultivaci s NH_4Cl. Zdá se, že tato rezistence k NH_4Cl je specifická pro pCD, protože komplexy M6Pr s jinými enzymy jako je β-hexosaminidasa, α-glukosidasa a arylsulfatasa se v prostředí NH_4Cl rozpadají[34].

2.4.1. Transport pCD v B lymfoblastech vykazujících „I-cell“ onemocnění

Transport lysosomálních enzymů nezávislý na M6P byl podrobně studován v B lymfoblastech vykazujících dědičné lidské onemocnění, při kterém neznámá mutace snižuje nebo eliminuje aktivitu *N*-acetylglukosamin-fosfotransferasy, tzv. I-cell onemocnění[35] (ICD). *N*-acetylglukosamin-fosfotransferasa katalyzuje první krok fosforylace mannosových zbytků obsažených v glykoproteinech lysosomálních enzymů (obr. 1), čímž napomáhá k interakci lysosomálních enzymů s M6Pr. V poškozených B-lymfoblastech tedy nedochází k tvorbě komplexu pCD-M6Pr. Normální hladina lysosomálních enzymů v B-lymfocytech těchto pacientů je pak důkazem, že jsou sledované enzymy transportovány jiným způsobem, než s využitím receptoru pro M6P (cit.[36]). Další pokusy s B-lymfoblasty s neaktivní *N*-acetylglukosamin-fosfotransferasou pomohly identifikovat aminokyselinovou doménu pCD, která je zodpovědná za M6P-nezávislý transport do lysosomů. Zjištění, že neglykosylovaný pCD je dopravován do lysosomů stejně účinně jako glykosylovaný, je důkazem toho, že aminokyselinová sekvence pCD musí obsahovat specifický třídicí signál[35]. Analýzou několika chimerních proteinů pCD/glykopepsinogen bylo zjištěno, že za transport pCD do lysosomů je zodpovědný úsek pCD od 188 do 265 aminokyseliny.

Cesta nezávislá na M6Pr je méně účinná než transport lysosomálních enzymů v normálních lymfoblastech, který je na M6Pr závislý. V poslední době se objevily údaje o tom, že tento M6P nezávislý transport je tkáňově specifický, neboť přestože byl zjištěn např. v hepatocytech a thymocytech, nedochází k němu ve fibroblastech[35]. Tyto alternativní receptory by se mohly uplatňovat nejen v transportu, ale i při indukci mitogenní aktivity prokathepsinu D.

2.4.2. Asociace pCD s prosaposinem

Saposiny A, B, C a D jsou malé termostabilní glykoproteiny, vznikající ze společného prekurzoru prosaposinu v lysosomech. Tyto proteiny aktivují různé lysosomální hydrolasy, které se účastní metabolismu sfingolipidů. Kromě své lysosomální funkce je prosaposin také přítomen jako integrální membránový protein a jako neštěpený hraje různé role v různých tělních tekutinách, např. v seminální plazmě, lidském mléce a cerebrospinálním moku. Bylo navrženo, že právě molekula prosaposinu by mohla být odpovědná za tento alternativní transport pCD (cit.[37]). Komplex pCD s prosaposinem se vytváří hned po syntéze pCD na endoplazmatickém retikulu. Vzniklý komplex asociuje s membránou až v Golgiho aparátu. Metodami buněčné frakcionace bylo prokázáno, že komplex

pCD s prosaposinem disociuje od membrány a rozpadá se až v kyselém prostředí lysosomů.

2.5. Hypotézy o funkci pCD při metastáze

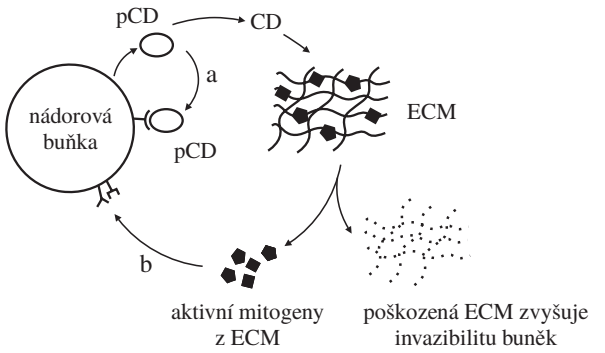
Výsledky několika nezávislých pokusů ukazují, že pCD je nejen dobrým markerem metastázy NBP, ale pravděpodobně se na proliferaci NBP také podílí. Na počátku 90. let byl získán přímý důkaz toho, že nadměrná exprese pCD může podporovat některé kroky metastázy[38]. Do krysích nádorových buněk linie 3Y1-Ad12 byl vnesen vektor pro expresi lidského pCD. Stabilní buněčné linie produkující a sekretující vysoké hladiny lidského pCD rostly mnohem rychleji v médiu s nízkým obsahem séra než kmeny s kontrolními vektory. Také jejich schopnost způsobovat metastázy po intravenózní injekci do athymických myší byla mnohem významnější ve srovnání s kontrolou.

Mechanismy působení pCD na proliferaci rakovinných buněk jsou nyní intenzivně zkoumány. Z dosavadních výsledků vyplývá, že pCD může při stimulaci růstu NBP uplatňovat dva na sobě nezávislé způsoby. Jak naznačuje uvedené schéma (obr. 3), pCD může na NBP působit přímo, to znamená, že uplatňuje nějaký vlastní strukturní motiv a interaguje například jako růstový faktor s povrchovým receptorem buňky či působí jako inhibitor kontrolních mechanismů při dělení buňky (obr. 3a). Při nepřímém mitogenním působení může pCD uplatnit svoji proteolytickou aktivitu. Z extracelulární matrix může například uvolňovat molekuly, které mohou podporovat růst nádorových buněk (obr. 3b). Struktura extracelulární matrix je tímto způsobem narušena, čímž je usnadněna invaze nádorových buněk. Jiným důsledkem proteolytické aktivity CD je specifická proteolytická inaktivace komplexu sekretovaného růstového inhibitoru IGF-I s vazebným proteinem 3 (IGF-I-VP 3) (obr. 4) (cit.[39]). Uvolněný IGF-I tak může stimulovat svůj receptor (IGF-Ir), a tím i růst rakovinných buněk. Zrání pCD a následné inaktivaci IGF-I – vazebného proteinu 3 kathepsinem lze zabránit neutralizací kyselých váčků chloridem amonným. Aktivní CD může napomáhat také degradaci bazální membrány, což je jeden z kroků vedoucích k metastáze rakovinných buněk.

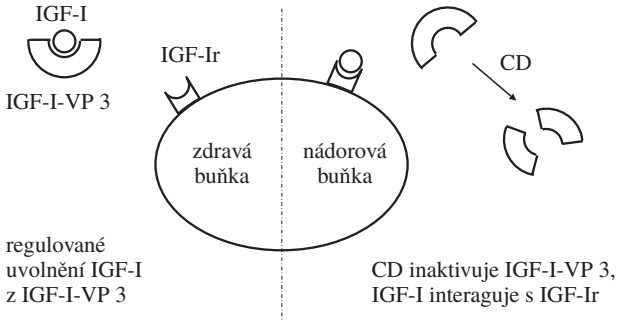
2.5.1. Nepřímé působení pCD na nádorové buňky – proteolytická aktivita

Jak již bylo řečeno, proteolytická aktivita CD se uplatňuje při degradaci extracelulární matrix a bazální membrány obklopující primární nádor. Na otázku, jakým způsobem mohou být kyselé proteasy v extracelulárním prostředí aktivovány, odpovídá skutečnost, že nádorové buňky si v organismu často vytvářejí mikroprostředí o nižším pH, než je pH fyziologické. Na rozdíl od zdravých tkání mohou NBP snižovat pH extracelulárního prostředí produkcí kyseliny mléčné a pomocí H^+/ATPasové pumpy, která zevnitř buňky transportuje protony přes cytoplazmatickou membránu. pH může být takto sníženo až na hodnotu 5,5, což je postačující pro aktivaci pCD. Jakým způsobem mohou být kathepsiny nádorovými buňkami sekretovány, není zatím zcela objasněno.

Fakt, že pCD může být zodpovědný za degradaci extracelulární matrix, potvrdily pokusy, při kterých se pCD obsažený v mediu po kultivaci MCF7 buněk s estrogeny ponechal *in*



Obr. 3. **Mechanismy působení pCD na nádorové buňky**; a: mitogenem je přímo molekula pCD, b: – nepřímo – prostřednictvím proteolytických produktů



Obr. 4. **Role CD při inaktivaci růstového inhibitoru – IGF-I – vazebného proteinu 3**; IGF-I – inzulínu podobný růstový faktor I (insuline-like growth factor I), IGF-I-VP 3 – vazebný protein pro IGF-I , IGF-Ir – receptor pro IGF-I na povrchu buňky

vitro působit na extracelulární matrix připravenou z hovězích rohovkových endotheliálních buněk. Rozklad extracelulární matrix proteasami, které byly přítomny v médiu NBP, byl způsoben především CD, což dokazuje kompletní inhibice tohoto procesu inhibitorem aspartátových proteas pepstatinem, ne však inhibitory dalších proteas. Nejvyšší stupeň degradace extracelulární matrix byl v obou případech naměřen při pH v kyselé oblasti (4–5) (cit.[40]).

Teoreticky může CD štěpit extracelulární matrix vně buněk, tedy po jeho sekreci a aktivaci. Nádorové buňky jsou schopné také endocytózy či fagocytózy extracelulární matrix. V NBP byly objeveny intracelulární objemné kyselé váčky (LAVs, large intracellular acidic vesicles) odlišné od lysosomů, o průměru větším než 5 μm. LAVs se vyskytují mnohem častěji u NBP než u zdravých buněk a obsahují jak fagocytovanou extracelulární matrix, tak velké množství CD, ale nikoliv pCD. K rychlému štěpení extracelulární matrix v LAVs je potřeba velké koncentrace kathepsinů, což by mohlo být jedním z vysvětlení, proč jsou rakovinné buňky produkující velká množství pCD úspěšnější v rozvíjející se metastáze[25].

Proteolytická aktivita CD může mít roli také při degradaci nebo aktivaci řady molekul, které mohou hrát důležitou roli při metastáze. Na extracelulární matrix je v inaktivní formě vázáno několik růstových faktorů a cytokinů. Příkladem jsou prekurzory TGFβ (tumor growth factor) nebo FGF (fibroblast

growth factor), které mohou po uvolnění z ECM spustit invazi tumoru. MCF7 buňky pěstované na extracelulární matrix obsahující prekurzor ^{125}I-bFGF (bovine fetal growth factor) štěpí extracelulární matrix a uvolňují z něj biologicky aktivní ^{125}I--bFGF, který následně stimuluje rozvoj MCF7 buněk. Uvolnění aktivního bFGF lze inhibovat pepstatinem A, což je opět důkazem, že aspartátové proteasy degradují extracelulární matrix.

2.5.2. Autokrinní mitogenní aktivita pCD

Jak již bylo uvedeno, existuje ještě další vysvětlení, proč po transientní expresi pCD v krysích nádorových buňkách dochází k pomnožení těchto buněk. pCD by při proliferaci nádorových buněk mohl uplatnit nějaký motiv své struktury a působit přímo jako růstový faktor či inhibitor kontrolních mechanismů pro dělení buňky. Tato aktivita pCD se nazývá autokrinní mitogenní a byla testována inkubací buněk s pCD a s IGF-II faktorem jako pozitivní kontrolou[41]. Proliferační aktivita pCD i IGF-II je závislá na jejich výsledné koncentraci v mediu, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentracích 20 ng.ml^{-1} pro pCD i IGF-II (cit.[42]). pCD byl pro tyto pokusy izolován z medií po inkubaci buněk linie ZR-75-1 s estrogeny a přečištěn pomocí imunoafinitní chromatografie[41]. Nádorové buňky rostly v přítomnosti pCD stejně dobře jako při inkubaci v přítomnosti IGF-II. Buňky, které nebyly od nádorových buněk odvozeny, rostly mnohem pomaleji v přítomnosti pCD než IGF-II. Tyto výsledky potvrdily již známý fakt, že pCD podporuje růst nádorových buněk jako autokrinní mitogen.

S cílem blíže objasnit mechanismus mitogenní aktivity pCD byly stejné pokusy provedeny v přítomnosti pepstatinu, mannosa-6-fosfátu a různých protilátek. Výsledky jsou shrnuty v tabulce (tab. I). Přidání pepstatinu A jakožto účinného inhibitoru proteolytické aktivity CD nemělo vliv na růst nádorových buněk, což naznačuje, že kromě proteolytické aktivity způsobuje proliferaci NBP i mitogenní funkce pCD.

Tabulka I
Vliv pCD, CD, aktivačního peptidu a IGF-II na růst buněk[41]: – během 7 denní kultivace nebyl zaznamenám významný nárůst buněk, + během 7 denní kultivace byl zaznamenám významný nárůst buněk, PL protilátka, IGF-II inzulínu podobný růstový faktor I (insuline-like growth factor II), AP aktivační peptid

Testovaná látka	Buňky	
	nenádorové	nádorové
pCD	–	+
IGF-II	+	+
pCD + pepstatin A	–	+
pCD + M6P	–	+
Deglykosylovaný pCD	–	+
pCD + PL proti CD	–	+
pCD + PL proti pCD	–	–
IGF-II + PL proti pCD	+	+
CD	–	–
AP	–	+
AP + PL proti CD	–	+
AP + PL proti pCD	–	–

2.5.2.1. Vyloučení teorie o vlivu mannosa-6-fosfátu

Možnost účasti M6Pr na mitogenní aktivitě pCD byla zkoumána testováním vlivu přídavku M6P, který ve vyšších koncentracích (10 mM) inhibuje interakci pCD s M6Pr na povrchu buněk a blokuje internalizaci pCD (cit.[43]). Kdyby byla mitogenní aktivita pCD zprostředkována pomocí interakce pCD s M6Pr, inhiboval by ji nadbytek volných M6P, neboť by M6Pr na povrchu byly vysyceny mannosa-6-fosfáty. Přidání M6P však nemělo žádný vliv na mitogenní aktivitu pCD. Odštěpením cukerné složky od pCD N-glykanasou se mitogenní aktivita pCD jen mírně snížila, což může být způsobeno tím, že při deglykosylaci enzymů dochází často k narušení původní struktury. Souhrnné výsledky však svědčí o tom, že samotný M6P není pro mitogenní aktivitu pCD rozhodující.

3. Role aktivačního peptidu pCD v onkogenezi

3.1. Vliv aktivačního peptidu na proliferaci nádorových buněk prsu

Zajímavé výsledky byly získány při kultivaci buněk s různými protilátkami[44]. Protilátky, které rozpoznávají epitop uvnitř aktivačního peptidu (dále AP) prokathepsinu D, silně inhibovaly mitogenní funkci pCD, zatímco protilátky proti kathepsinu, které neinteragují se samotným AP, neměly na růst buněk žádný vliv. AP by proto mohl hrát důležitou roli v mitogenní aktivitě pCD.

Pro další výzkum účasti AP v mitogenní funkci pCD byl AP připraven synteticky. Při kultivaci různých typů buněk s takto připraveným AP byly naměřeny podobné proliferační aktivity jako v případě pCD (viz tabulka I). Buněčné linie odvozené z rakovinných buněk odpovídaly na přítomnost AP v mediu jen o málo intenzivněji než na přídavek pCD a naopak u linií, které na pCD nereagovaly, nebyla naměřena žádná odpověď ani pro AP. Nepatrné snížení mitogenní aktivity AP oproti pCD lze vysvětlit větší konformační flexibilitou volného AP. AP jako součást molekuly mění hůře konformaci, která je vhodná pro mitogenní receptor. Pro srovnání byly měřeny také interakce s pepsinogenem. Zralý pepsin má s CD podobnou prostorovou strukturu, avšak primární struktury aktivačních peptidů se liší[43,3]. Rovněž přítomnost protilátek proti AP či proti samotnému CD měla srovnatelný vliv na růst buněk.

3.2. Interakce konjugátu pCD-FITC s nádorovými buňkami prsu

Za účelem potvrdit další hypotézu, že na povrchu nádorových buněk existuje receptor, na který se váže AP, byl připraven konjugát pCD-FITC (FITC – fluoresceinisothiokyanát) (cit.[41]). Po interakci konjugátu pCD-FITC s buněčným povrchem NBP byla průtokovou cytometrií měřena intenzita fluorescence jednotlivých buněk. Pokles fluorescence v důsledku preinkubace NBP s aktivačním peptidem naznačuje, že na povrchu buněk jsou receptory společné jak pro aktivační peptid, tak pro pCD. Obdobně bylo blokování povrchových re-

ceptorů pozorováno také u buněk, inkubovaných nejprve s neznačeným pCD. Interakcím konjugátu pCD-FITC s povrchem nádorových buněk lze zamezit přidáním protilátek proti pCD.

3.3. Lokalizace vazebného místa aktivačního peptidu pro povrchový receptor

Zatím zůstává nejasné, která část AP je za interakci s receptorem zodpovědná. Na základě znalostí prostorové struktury aktivního CD (cit.[3]) a modelu struktury pCD (cit.[45,46]) byly připraveny dva syntetické peptidy, které obsahovaly prvních 26 (1–26) a dalších 18 (27–44) aminokyselin aktivačního peptidu pCD. Srovnáním jejich mitogenních aktivit bylo zjištěno, že vazebné místo pro povrchový receptor na NBP je lokalizováno někde mezi aminokyselinami 27–44 (cit.[47]).

4. Závěr

Je zřejmé, že CD nebo jeho AP hrají roli v onkogenezi, a to zejména při vzniku rakoviny prsu. Podílí se jak na zvýšení buněčného růstu, tak na snížení inhibice růstu mezibuněčným kontaktem. Mechanismus působení CD v onkogenním procesu není zatím dostatečně objasněn. Je však známo, že v prsních nádorových buňkách dochází k jeho nadměrné sekreci a stává se hlavním sekretovaným proteinem. Z publikovaných dat vyplývá, že důvodem jeho onkogenního působení může být jak jeho proteolytická aktivita spojená s degradací určitého tumorového supresoru, tak aktivace receptorů, ať již přímou interakcí s nebo proteolytickým rozrušením komplexu IGF-I – vazebný protein. Uvolněný IGF-I se pak může vázat na vlastní receptor a aktivovat buněčnou proliferaci. Některá experimentální data ukazují, že za mitogenní aktivitu je zodpovědný AP, který je z prokathepsinu odštěpen při jeho aktivaci.

Existují však také výsledky naznačující, že CD sekretovaný nádorovými buňkami lidské prostaty ovlivňuje tvorbu angiostatinu, tj. inhibitoru vývoje krevních cév, čímž zabraňuje výživě rostoucího nádoru a rozvoji metastáz. Tato funkce CD je významně snížena v případě pCD sekretovaného nádorovými buňkami prsu, což je dáváno do souvislosti s rozdílnou glykosylací těchto forem CD.

LITERATURA

1. Willstätter R., Bamann E.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. *180*, 127 (1929).
2. Fruton J. S., Irwing J., Bergmann M.: J. Biol. Chem. *141*, 763 (1941).
3. Metcalf P., Fusek M.: EMBO J. *12*, 1293 (1993).
4. Redecker B., Heckendorf B., Grosch H. W.: DNA Cell Biol. *10*, 423 (1991).
5. Griffiths G.: Cell *52*, 329 (1988).
6. Kornfeld S.: Annu. Rev. Biochem. *61*, 307 (1992).
7. Griffiths G., Gruenberg J.: Trends Cell Biol. *1*, 5 (1991).
8. von Figura K., Hasilik A.: Annu. Rev. Biochem. *55*, 167 (1986).
9. Ludwig T., Munier-Lehmann H., Bauer U.: EMBO J. *13*, 3430 (1994).
10. Hasilik A.: Experientia *48*, 130 (1992).
11. Barrett A. J.: Biochem. J. *117*, 601 (1970).
12. Watts C.: Curr. Opin. Imunol. *13*, 26 (2001).
13. Riese J. R., Chapman H. A.: Curr. Opin. Imunol. *12*, 107 (2000).
14. Safting P., Hetman M., Schmahl W.: EMBO J. *14*, 3599 (1995).
15. Rochefort H., Coezy E., Joly E., Westley B., Vignon F.: Horm. Cancer *1980*.
16. Lippman M. E., Dickson R. B., Bates S., Knabbe C., Huff K., Swain S., McManaway M., Bronzert D., Kasid A., Gelmann E. P.: Breast Cancer Res. Treat. *7*, 59 (1986).
17. Westly B., Rochefort H.: Cell *20*, 352 (1980).
18. Vignon F., Capony F., Chambon M., Freiss G., Garcia M., Rochefort H.: Endocrinology *118*, 1537 (1986).
19. Westley B., May F. E. B., Brown A. M. C., Krust A., Chambon P., Lippman M. E., Rochefort H.: J. Biol. Chem. *259*, 10030 (1984).
20. Garcia M., Capony F., Derocq D., Simon D., Pau B., Rochefort H.: Cancer Res. *45*, 709 (1985).
21. Capony F., Garcia M., Capdevielle J., Rougeot C., Ferrara P., Rochefort H.: Eur. J. Biochem. *161*, 505 (1986).
22. Morisset M., Capony F., Rochefort H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *138*, 102 (1986).
23. Capony F., Rougeot C., Montcourrier P.: Cancer Res. *49*, 3904 (1989).
24. Roger P., Montcourrier P., Maudelonde T.: Hum. Pathol. *25*, 868 (1994).
25. Rochefort H.: Eur. J. Cancer *28A*, 1780 (1992).
26. Capony F., Rougeot C., Montcourrier P., Cavailles V., Salazar G., Rochefort H.: Cancer Res. *49*, 3904 (1989).
27. Geisinger S. R., Berens M. E., Duckett Y.: Cancer (Philadelphia) *65*, 1055 (1990).
28. Capony F., Morisset M., Berrett A. J., Capony J. P., Broquet P., Vignon F., Chambon M., Luisot P., Rochefort H.: J. Cell. Biol. *104*, 253 (1987).
29. Isidoro C., Baccino F. B., Hasilik A.: Int. J. Cancer *70*, 561 (1997).
30. De Souza A. T., Hankins G. R., Washington M. K., Orton T. C., Jirtle J. L.: Oncogene *10*, 1725 (1995).
31. Chappell S. A., Walsh T., Walker R. A., Shaw J. A.: Brit. J. Cancer *75*, 1324 (1997).
32. Coopman P., Garcia M., Brunner N.: Int. J. Cancer *56*, 265 (1994).
33. Diment S., Leech M. S., Stahl P. D.: J. Biol. Chem. *263*, 6901 (1988).
34. Capony F., Braukle T., Rougeot C., Roux S., Montcourrier P., Rochefort H.: Exp. Cell Res. *215*, 154 (1994).
35. Jonathan N. G., Stuart K.: J. Cell Biol. *123*, 99 (1993).
36. Hasilik A., Waheed A., Figura K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *98*, 761 (1981).
37. Yunxiang Z., Conner E. G.: J. Biol. Chem. *269*, 3846 (1994).
38. Garcia M., Derocq D., Pujol P., Rochefort H.: Oncogene *125*, 145 (1990).
39. Garcia M., Platet N., Liaudet E., Laurent V., Derocq D., Brouillet J. P., Rochefort H.: Stem Cells (Dayton) *14*, 642 (1996).
40. Nakopoulou L., Giannopolou I., Gakiopolou H., Liapis H., Tzonou A., Davaris P. S.: Hum. Pathol. *30*, 436 (1999).
41. Fusek M., Větvička V.: Biochem. J. *303*, 775 (1994).

42. Větvička V., Větvičková J., Fusek M.: Cancer Lett. *79*, 131 (1994).
43. Creek K. E., Sly W. E.: Lysosomes Biol. Pathol. *1984*, 63.
44. Větvička V., Wagner J., Baudys M., Tang J., Foundling I. S., Fusek M.: Biochem. Mol. Biol. Int. *30*, 921 (1993).
45. Větvička V., Větvičková J., Fusek M.: Arch. Biochem. Biophys. *322*, 295 (1995).
46. Metcalf P., Větvička V., Fusek M.: New York Plenum *1995*, 273.
47. Větvička V., Větvičková J., Hilgert I., Vobůrka Z., Fusek M.: Int. Cancer *73*, 403 (1997).

M. Kroulíková[a], M. Fusek[b], and T. Ruml[a] *([a]Department of Biochemistry and Microbiology and Center for Integrated Genomics, Faculty of Chemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, [b]Sigma-Aldrich Ltd., Prague):* **Cathepsin D and its Role in Oncogenesis**

Cathepsin D (CD) is involved in oncogenesis particularly in the formation of breast tumors. The mechanism of its contribution to the process remains to be elucidated. Expression of cathepsin D is stimulated by estrogen in mammary cancer cells. It is also known that CD is very actively secreted from the breast tumor cells. It has been suggested that its oncogenic role might be related to its proteolytic activity and degradation of a certain tumor suppressor or to proteolytic destruction of a complex of the growth factor with its binding protein. The released growth factor may subsequently interact with its own receptor and activate cell proliferation. Some experimental data show that the activation peptide, proteolytically released from procathepsin during its activation, may be responsible for the mitogenic activity of procathepsin D (pCD). On the contrary, some data suggest that CD secreted by prostate cancer cells stimulates the formation of angiostatine and thus prevents nutrition of the growing tumor. Such function of CD is severely decreased in the case of pCD that is secreted by breast cancer cells probably due to different glycosylation of the CD forms. This review evaluates the current opinion on the role of pCD and the activation peptide in the carcinogenesis.

Autorem obrázků v tomto čísle je Ing. Jan Budka, odborný asistent Ústavu organické chemie na VŠCHT Praha. Ing. Budka ilustroval již několik skript, naposledy Paleček, Hampl: Farmakochemie, VŠCHT Praha 2002, plakát k přednáškám Novartis Lecture a jeho kresby byly použity na několika konferencích, a v doktorských dizertačních pracích. V listopadu loňského roku uspořádal první výstavu svých kreseb v klubu Carbon na VŠCHT v Praze.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ CHLORIDŮ NA STŘÍBRNÝCH KOMPOZITNÍCH ELEKTRODÁCH

SVĚTLANA ŠEBKOVÁ

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
e-mail: sebkova@jh-inst.cas.cz

Došlo 8.7.02, přepracováno 28.10.02, přijato 7.11.02.

Klíčová slova: stříbrné kompozitní elektrody, voltametrie, chloridy

Úvod

Jedním z dlouhodobě rozvíjených směrů moderních elektroanalytických čidel je tematika senzorů na bázi pevných materiálů. Přísné ekologické a bezpečnostní předpisy zaváděné jak ve světě, tak i v České republice, ale i řada obecně oblíbených předsudků a omylů zakazují nebo podstatným způsobem komplikují používání rtuťových elektrod. Z tohoto důvodu je v posledních letech věnována velká pozornost vývoji pevných nertuťových elektrod. Do této skupiny elektrod patří i kompozitní kovové elektrody, tzn. elektrody vytvořené z materiálu představujícího směs minimálně jednoho izolátoru a jednoho vodiče[1].

Využití těchto elektrod je možno nalézt v oblasti teoretického výzkumu dějů odehrávajících se na povrchu elektrody, stejně tak jako v oblasti analytické chemie. Obě tyto sféry se vzájemně prolínají. Primárně našly kovové kompozitní elektrody uplatnění v anodické rozpouštěcí voltametrii, resp. při voltametrické analýze iontů kovů (Cd, Pb, Cu, Tl, As apod.). K jejich stanovení je často využíván tzv. efekt „underpotential deposition“ (efekt UPD) (cit.[2]), jehož aplikace byla již studována na kovových elektrodách, především stříbrné a zlaté[3–4]. Kompozitní kovové elektrody jsou v porovnání s klasickými kovovými poněkud méně rozšířeny a studovány, ale výsledky, kterých na nich bylo dosaženo, jsou co do analytických parametrů přibližně srovnatelné s použitím elektrod kovových[5–8]. Vedle již zmíněných analytických aplikací a výzkumu efektu UPD je pozornost věnována i vzájemným interakcím kovů na povrchu elektrod[9–10].

Polarografické, resp. voltametrické stanovení chloridových iontů bylo popsáno v literatuře již před desítkami let, např.[11] a jeho využití bylo převzato i do aplikačních listů některých firem[12]. Jiná možnost stanovení iontů Cl^- byla založena na jejich amperometrické titraci ve vodně-methanolickém roztoku dusičnanem olovnatým, avšak tyto postupy se ukázaly vhodné pro koncentrace vyšší než 0,05 % (cit.[13]). Přibližně o půl řádu nižší meze stanovitelnosti lze dosáhnout při titraci dusičnanem stříbrným či rtuťným. Ale i při užití katodické akumulace se ukázalo, že rtuťová kapková elektroda není pro tyto účely zcela ideální a výsledky nejsou vždy správné – zvláště v komplikovanějších matricích (např. výluhy z betonu a písku). To vedlo k hledání jiných voltametrických senzorů, ať již se rtutí (např. amalgamové, meniskové nebo pevné amalgamové elektrody[14]) nebo bez rtuti (stříbrné kovové elektrody[15]).

Obsah chloridů je důležitý hlavně z hlediska environmentálního; jejich nejvyšší přípustný obsah v pitných i v užitkových vodách je regulován řadou norem a vyhlášek (např. pitná a balená pitná voda[16] – mezní hodnota 100 $mg.l^{-1}$ a nejvyšší mezní hodnota 250 $mg.l^{-1}$; balená přírodní minerální voda[17] – mezní hodnota 500 $mg.l^{-1}$ a balená kojenecká voda[17] – mezní hodnota 100 $mg.l^{-1}$; umělá koupaliště[18] – mezní hodnota 200 $mg.l^{-1}$, plnící voda pro umělá koupaliště[18] – mezní hodnota 50 $mg.l^{-1}$). Jejich obsah je však důležité sledovat např. i ve stavebních materiálech, jako jsou písky pro výrobu betonu (jejich přítomnost může zvyšovat korozi kovových, zejména železných, armatur). V pitných či v užitkových vodách, jakož i ve výluzích mohou stanovení komplikovat přítomné povrchově aktivní látky. Proto je nutno jejich obsah kontrolovat[19–22].

Experimentální část

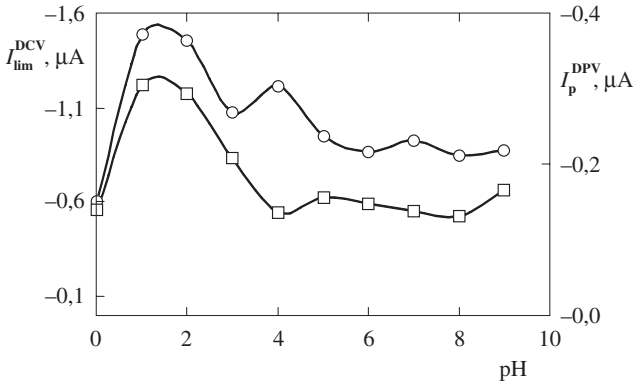
Přístroje

Pro voltametrická měření byl použit počítačem řízený Eco-Tribo Polarograf PC ETP s příslušenstvím (Polaro-Sensors, Praha)[24] s programem Polar Pro v. 4.0. pro Windows 95/98/ME. Jako referenční byla použita 1 M argentchloridová elektroda, oddělená od roztoku solným můstkem naplněným 1 M dusičnanem draselným, ke které jsou vztaženy hodnoty potenciálů udávané v této práci, a jako pomocná elektroda platinová (obojí Elektrochemické detektory, Turnov). Pomocí speciální procedury zahrnuté do programu Polar Pro byla sestavena z jednotlivých kroků metoda, která zahrnovala všechny operační kroky (čisticí cykly, akumulaci, měření atd.), takže celé měření probíhalo automatizovaně.

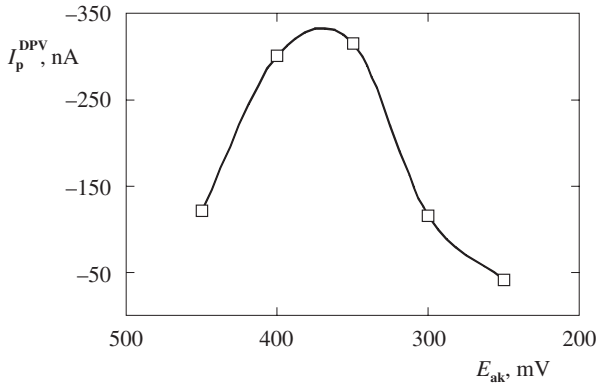
Záznamy byly prováděny metodou DCV a diferenční pulsní voltametrie (DPV). Měření probíhala při pokojové teplotě 293±2 K. Rychlost polarizace činila u DPV 20 $mV.s^{-1}$, u DCV 150 $mV.s^{-1}$. Výška DPV-pulsu byla nastavena na –95 mV a šířka 100 ms, při prodlevě mezi pulsy 200 ms. Pokud byl odstraňován vzdušný kyslík, byly analyzované roztoky vybublány dusíkem o čistotě 99,999 % (Linde, Praha).

Chemikálie

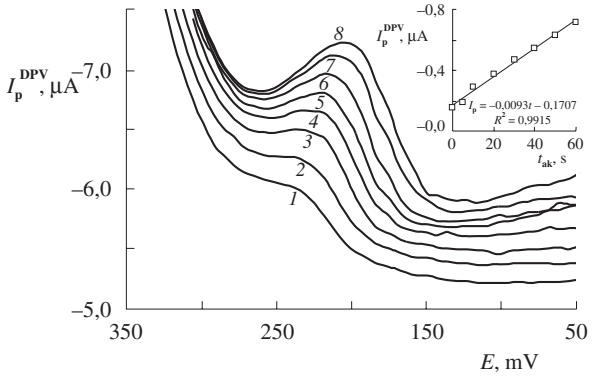
Stříbrný prášek pro konstrukci elektrod (čistota 99,9 %, J. Matthey, USA) měl zrnitost 5–10 μm. Jako pojivo byl používán Superakryl plus® (směs poly(methyl-methakrylátu), methyl-methakrylátu, glykol-dimethakrylátu, dibutyl-ftalátu) (Spofa, Praha). Grafitový prášek (Merck, Praha) měl zrnitost pod 50 μm. Standardní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků (Analytika, Praha) o koncentraci 1 $g.l^{-1}$ a o čistotě



Obr. 1. **Vliv pH na výšku DCV vlny (○) a DPV píku (□) chloridů** (c_{Cl^-} = 5 mg.l^{-1}); pH 1, $E_{in} = E_{ak}$ = 350 mV, doba čištění 5 s při potenciálu +350 mV, t_{ak} = 10 s



Obr. 2. **Vliv potenciálu akumulace na výšku píku chloridů** (c_{Cl^-} = 5 mg.l^{-1}); pH 1, metoda DPV, $E_{in} = E_{ak} = E_{cl}$, doba čištění 5 s při E_{cl}, t_{ak} = 10 s



Obr. 3. **Vliv doby akumulace na výšku píků chloridů** (c_{Cl^-} = 5 mg.l^{-1}); pH 1, metoda DPV, $E_{in} = E_{ak} = E_{cl}$ = 350 mV, doba čištění 5 s při E_{cl}, doby akumulace (s): *1* – 0, *2* – 5, *3* – 10, *4* – 20, *5* – 30, *6* – 40, *7* – 50, *8* – 60

p.a. redestilovanou vodou. Pro přípravu standardního roztoku chloridů byl použit chlorid draselný čistoty p. a. a redestilovaná voda. Jako modelová povrchově aktivní látka byl vybrán Triton X-100. Všechny ostatní použité chemikálie (kyseliny, základní elektrolyty) byly čistoty p. a. a k jejich případnému ředění byla opět použita redestilovaná voda.

Konstrukce kompozitní elektrody

K měření byla užita kompozitní elektroda (pracovní označení C). Jako pouzdro pro elektrody byl používán plexisklový váleček o délce 90 mm a vnějším průměru 12 mm; průměr aktivní plochy činil 1 mm. Elektrický kontakt vytvořil měděný drátek, který byl vsunut do vrstvy práškového grafitu nasypaného na horní povrch kompozitního materiálu[6].

Kompozitní elektroda byla vyrobena smísením 20 % stříbrného prášku s 20 % grafitového prášku a s 60 % (všechna procenta jsou hmotnostní) methakrylátové pryskyřice (stomatologický materiál Superakryl plus®). Směs stříbra a uhlíku byla homogenizována v misce, poté byla přidána polymerizační směs, čímž došlo k vytvoření plastické kompozitní hmoty. Ta byla ponechána 5 minut na vzduchu a pak byla vtlačena do elektrodového těla. Elektroda zůstala 6 hodin v klidu, aby mohl proběhnout polymerizační proces. Následně byla elektroda broušena na smirkovém papíru o různé zrnitosti a nakonec na alumimě o zrnitosti 0,3 μm.

Výsledky a diskuse

Volba vhodného prostředí a metody

V literatuře je možno nalézt postupy stanovení chloridových iontů při použití metod stejnosměrné (DCV) nebo diferenční pulzní voltametrie (DPV), ale vždy při aplikaci jejich katodické akumulace a za různých hodnot vhodného pH (od 0,1 M-HNO_3 po neutrální oblast). Úvodem byl proto ověřen vliv pH na DCV i DPV chloridů. Z výsledků znázorněných na obr. 1 byla pro DCV i DPV stanovení vybrána jako optimální hodnota pH 1, což odpovídá 0,1 M roztoku HNO_3.

Při porovnání DC a DP voltamogramů je patrno, že při stejné koncentraci a stejné době akumulace se výška proudového pozadí v případě DPV mění v rozmezí 3,7 až 5,3 μA, v případě DCV je výška proudového pozadí prakticky konstantní (asi 3 μA). Křivky obou voltamogramů se liší tvarem: zatímco u DP voltamogramů je průběh záznamu téměř rovnoběžný s potenciálovou osou, v případě DCV lineárně roste směrem k negativním hodnotám, takže záznam, který má tvar vlny, se poměrně komplikovaně vyhodnocuje. Nevýhodou DPV (rychlost polarizace 20 mV.s^{-1}, výška píku –95 mV, pauza mezi pulzy 200 ms) byl fakt, že výška píků byla přibližně pětinová v porovnání s výškou DC vln (rychlost polarizace 150 mV.s^{-1}). Píky jsou však dobře odděleny, jsou symetrické a jejich odečet není komplikován rostoucím pozadím. Jak bude ukázáno v následujících odstavcích, výsledek měření není v tomto případě závislý na použité metodě; přednost byla dána technice DPV.

Závislost na potenciálu a době akumulace

Je známo, že zvýšení citlivosti stanovení chloridových iontů lze docílit jejich akumulací na povrchu elektrody v oblasti kladných potenciálů. Optimální potenciál akumulace byl hledán mezi +450 a +250 mV, přičemž jako optimální byl

zvolen potenciál akumulace +350 mV u metody DPV (obr. 2) a +300 mV u metody DCV.

Dalším zkoumaným parametrem byla závislost na době akumulace. Při potenciálu akumulace E_{ak} = +350 mV a koncentraci chloridových iontů 5 mg.l^{-1} byly metodou DPV testovány doby akumulace v rozmezí 0–60 s (obr. 3). Závislost výšky katodického píku chloridů na době akumulace vykazuje lineární průběh v celém rozsahu se směrnicí –9,3 nA.s^{-1} a úsekem –0,1707 μA při korelačním koeficientu 0,9957.

Vliv kyslíku na stanovení chloridů

Při stanovení metodou DPV, potenciálu akumulace +350 mV a době akumulace 60 s (bez odstranění vzdušného kyslíku z analyzovaného roztoku) se jako nejvhodnější k vyhodnocování ukázaly prvé dva záznamy. Na dalších záznamech postupně narůstal předpík kyslíku zachyceného na povrchu elektrody, který nedokázala odstranit ani aplikace čisticí polarizace při potenciálu +350 mV po dobu 5 s. Takto zachycený kyslík, resp. produkty jeho redukce, deformovaly redukční pík chloridů do tvaru vlny, což komplikovalo vyhodnocení jejich koncentrace. Při vyhodnocení koncentračních závislostí Cl^- pouze z prvých dvou záznamů byla získána lineární kalibrační závislost (korelační koeficient r = 0,986) stejně jako při odstraňování kyslíku (korelační koeficient r = 0,989). V koncentračním rozsahu 1,5–3,0 mg.l^{-1} byla dokonce její směrnice v přítomnosti O_2 asi o 20 % větší než v jeho nepřítomnosti a zároveň byla docílena shoda (na hladině významnosti 0,95) mezi výsledky stanovení bez a při odstranění vzdušného kyslíku.

Interakce chloridových iontů na povrchu elektrod

Na povrchu rtuťové elektrody se přibližně při potenciálu +100 mV chloridy výrazně chemisorbují za tvorby produktů se rtutí. Obdobně je tomu na povrchu stříbrných elektrod (kompozitních i kovových)[2–3,24–25] za vzniku odpovídajících produktů Cl^- s Ag^+. Obecně se dospělo k závěrům, že vazba je příliš silná, než aby se jednalo o pouhou sorpci. Halogenidové (a tedy i chloridové) ionty se sorbují na povrchu kompozitní elektrody, jejich běžná povrchová koncentrace činí asi 1,2–1,5 nmol.m^{-2}. Pokud jsou na povrchu elektrody vylučovány ionty kovů (bez přítomnosti halogenidů), dosahuje za běžných analytických podmínek jejich monovrstevné pokrytí (definované jako poměr skutečně obsazených a obsaditelných míst na povrchu elektrody v okamžiku, kdy se začne vytvářet druhá vrstva) hodnoty θ cca 0,2. V případě, že se v roztoku nacházejí halogenidové (např. chloridové) ionty, působí jejich přítomnost „zhušťování“ této vrstvy, splývání naadsorbovaných povrchových ostrůvků[2,5] apod., takže povrchové pokrytí kovu dosahuje až $\theta \approx 0{,}5$. Uplatnění aktivačních a nukleačních mechanismů při růstu stupňovitých kovových filmů se na voltametrickém záznamu projevuje přítomností „monovrstevných“ píků nebo na kalibrační křivce prodlevami či nemonotónními úseky.

Pro popis závislosti výšky nebo plochy píku na koncentraci, resp. době akumulace (ovlivňující stupeň pokrytí elektrody) lze použít s poměrně malou nepřesností lineární kalibrační rozsah (statisticky testováno[26]), i když je zřejmé, že dokonalejší popis adsorpce by skýtala Langmuirova nebo Frumkinova isoterma nebo isoterma[27] ještě lépe vystihující často nelineární esovitý průběh závislostí.

Obnovení povrchu elektrody, reprodukovatelnost a opakovatelnost měření

Jako každá pevná elektroda má i kompozitní stříbrná elektroda ve srovnání se rtuťovou kapkovou elektrodou hůře reprodukovatelný a obnovovatelný povrch. Kromě snadného mechanického obnovení povrchu (vhodné provádět alespoň jednou za 1 až 2 týdny) jemným přeleštěním na alumině, po němž je nutno procyklovat elektrodu v základním elektrolytu (asi 100 až 200 DC cykly mezi +350 až –950 mV s rychlostí polarizace 500 mV.s^{-1}, což je vhodné učinit i na začátku každého měřicího dne), lze aplikovat ještě některé režimy elektrochemické předúpravy elektrodového povrchu jako vložení čisticích cyklů nebo čisticího potenciálu před vlastní měření. Jako optimální se ukázalo zařazení 50 a více čisticích cyklů (+350 mV na dobu 0,1 s a až –950 mV na dobu 0,1 s) před začátkem měření každého nového vzorku. Před každý registrovaný záznam byl navíc vložen jeden scan mezi počátečním a konečným potenciálem (E_{in} a E_{fin}) při rychlosti polarizace 500 mV.s^{-1}. Výsledný záznam (ať již DCV či DPV) se pak skládal z jednoho či více voltamogramů. Před akumulací při zvoleném potenciálu byl také vždy aplikován čisticí potenciál (rovný potenciálu akumulace, resp. počátečnímu potenciálu) na dobu 5 s.

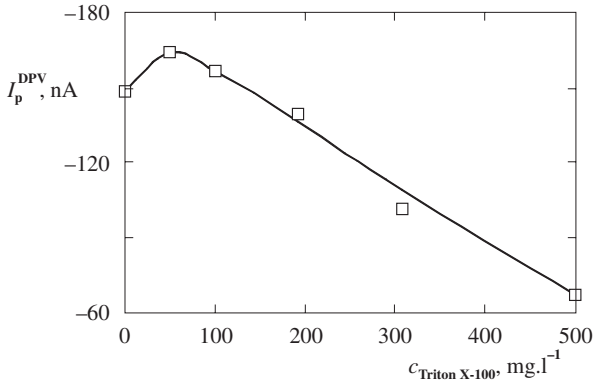
Statistické výsledky byly zpracovány ze 14 opakovaných měření v případě DPV a ze 13 v případě DCV. Pokud nejsou

Tabulka I
Test opakovatelnosti stanovení chloridových iontů (5 mg.l^{-1}) na kompozitní stříbrné elektrodě. Průměr disku 2,5 mm, základní elektrolyt 0,1 M-HNO_3 (pH 1)

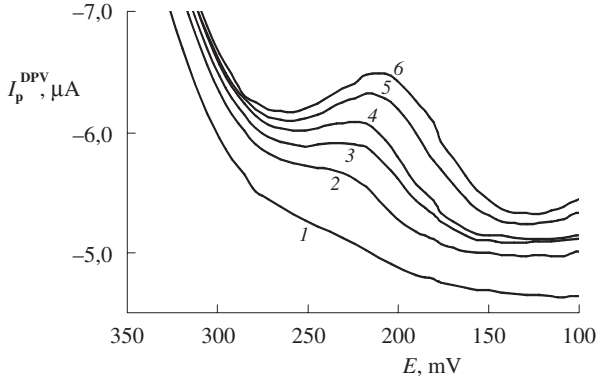
Podmínky	Metoda	
	DPV	DCV
Počet čisticích cyklů	50	50
Celkový počet měření	14	13
Čisticí potenciál E_{cl}, mV	350	300
Čistící čas t_{cl}, s	5	5

	Výška píku I [nA]					
Vypuštěné měření č.	–	1	1, 2	–	1[a]	1[a], 5[a]
Aritmetický průměr výběru, nA	83,2	85,8	87,9	383	389	383
$L_{1,2}$, (nA)$_{(0,95)}$	9,3	8,0	7,3	20	18	13
Medián, nA	86,2	86,5	87,6	381	387	381
Směrod. odchylka, nA	16,2	13,3	11,4	34	28	19
Relat. směrod. odchylka, %	19,4	15,5	13,0	8,8	7,1	5,0
Šikmost	–0,75	–0,58	–0,58	0,12	1,01	–0,02
Špičatost	2,70	2,52	2,99	3,64	3,75	1,46

[a] Body označené podle Deanova-Dixonova testu jako odlehlé na hladině významnosti 0,95



Obr. 4. **Vliv Tritonu X-100 na výšku píků chloridů** (c_{Cl^-} = 5 mg.l^{-1}); pH 1, metoda DPV, t_{ak} = 60 s, E_{in} = E_{ak} = E_{cl} = 350 mV, doba čištění 5 s při E_{cl}



Obr. 5. **DP voltamogramy chloridových iontů na stříbrné kompozitní elektrodě**: 0,1 M-HNO_3; rychlost polarizace 20 mV.s^{-1}, t_{ak} = 60 s, koncentrace Cl^- v mg.l^{-1}: *1* – 0, *2* – 1,48, *3* – 2,21, *4* – 2,92, *5* – 3,61, *6* – 4,29

vyloučeny (na hladině významnosti 0,95) při užití metody DPV první dva zaznamenávané výsledky a u DCV nejmenší a nejvyšší (statistické rozdělení výsledků nevykazuje charakter normálního rozdělení[26]), nelze použít u všech výsledků (při různých pH, různých koncentracích apod.) aritmetický průměr (podle odhadu šikmosti a špičatosti). Grubbsův ani Deanův-Dixonův test neoznačil žádný výsledek v metodě DPV za odlehlý, naproti tomu v DCV Deanův-Dixonův test označil nejnižší (první) a nejvyšší (pátý) bod za odlehlý (na hladině významnosti 0,95) a Grubbsův test neoznačil žádnou z hodnot jako odlehlou. Bez vylučování krajních odlehlých bodů lze považovat za velmi dobrý odhad střední hodnoty medián. Výsledky jsou shrnuty v tabulce I.

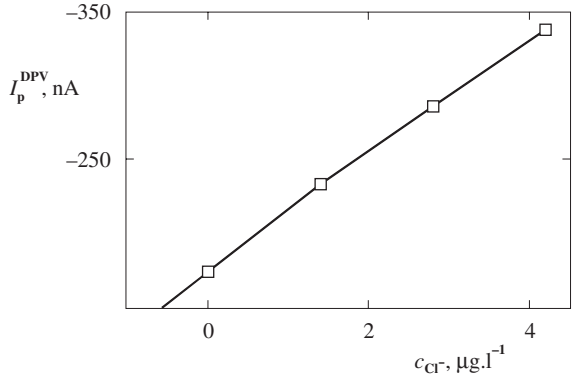
Ukázka průběhu DP voltamogramů různých koncentrací chloridů na stříbrné kompozitní elektrodě je znázorněna na obr. 5.

Na základě optimalizovaných podmínek měření byla zjištěna (při době akumulace 60 s a potenciálu akumulace +350 mV) kritická hodnota 0,76 mg.l^{-1}, mez detekce 2,10 mg.l^{-1} a limit stanovení 2,62 mg.l^{-1}.

Při stanovení nebylo zjištěno ovlivnění dusičnany, dusitany a chloristany (mohou být použity jako základní elektrolyty). Stanovení není rušeno ani vysokým nadbytkem jodidů (stonásobný přebytek). Mírné interference byly pozorovány v přítomnosti bromidů v deseti a vícenásobném přebytku.

Vliv povrchově aktivních látek

Povrchově aktivní látky se v pitných vodách za normálních podmínek nevyskytují, cílem této práce je však upravit podmínky i na stanovení halogenidů ve vodách znečištěných (např. odpadních). Na rozdíl od voltametrie na klasické HMDE přítomnost povrchově aktivních látek nepůsobí na kompozitních stříbrných elektrodách příliš rušivě. K základnímu elektrolytu 0,1 M-HNO_3 byly přidány chloridové ionty tak, aby jejich koncentrace činila 5 mg.l^{-1} (pH upraveno na hodnotu 1). Následně byl přidáván Triton X-100 až do výsledné koncentrace 5.10^{-2} %. Pokud koncentrace Tritonu X-100 byla menší než 10^{-2} %, výška píku vzrostla asi o 10 %, při jejím překročení začala výška píku Cl^- klesat (při koncentraci Tritonu 5.10^{-2} % již činil úbytek skoro 50 %) (obr. 4).



Obr. 6. **Vyhodnocení koncentrace chloridových iontů ve vzorku pitné vody metodou standardního přídavku na stříbrné kompozitní elektrodě**: 0,1 M-HNO_3; rychlost polarizace 20 mV.s^{-1}, t_{ak} = 60 s, zjištěná koncentrace Cl^- v mg.l^{-1}: 4,78±0,58

Analytické aplikace na reálných vzorcích

Analýzy reálných vzorků byly prováděny metodou DPV následujícím způsobem: k 9,0 ml vzorku byl přidán 1,0 ml 1 M-HNO_3 a dle potřeby bylo pH upraveno pomocí 1 M-KOH na hodnotu 1.

Metodou standardního přídavku byly analyzovány dva vzorky: *1*) vzorek pitné vody odebrané ze studny s pitnou vodou (Polabí), *2*) minerální voda s deklarovaným obsahem chloridů 4,5 mg.l^{-1}. Oba vzorky byly analyzovány přímo, bez předúpravy či jakékoli mineralizace; vzdušný kyslík (případně jiné rozpuštěné plyny, např. CO_2) byl odstraněn pětiminutovým probubláním proudem dusíku. Analýza byla prováděna s užitím výše popsané stříbrné kompozitní elektrody a výsledky byly porovnávány s výsledky získanými na HMDE (cit.[12]).

Pomocí kompozitní elektrody bylo zjištěno, že vzorek pitné vody obsahuje 4,78±0,58 mg.l^{-1} (na hladině významnosti 0,95) (obr. 6). Při analýze za použití klasické HMDE byla zjištěna koncentrace chloridů 4,10±0,51 mg.l^{-1} (na hladině významnosti 0,95). Lze konstatovat, že výsledky se dobře

shodují, intervaly spolehlivosti se překrývají a výsledek vyhovuje požadavkům kladeným na pitnou vodu[16].

Stejně byl analyzován vzorek minerální vody. V případě užití kompozitní elektrody bylo nalezeno 2,82±0,16 mg.l^{-1} (na hladině významnosti 0,95) a při analýze za použití HMDE 3,1±0,42 mg.l^{-1} (na hladině významnosti 0,95). I v tomto případě se výsledky dobře shodují, intervaly spolehlivosti se překrývají a výsledky vyhovují požadavkům kladeným na balené přírodní minerální vody[17]; a odpovídají výrobcem deklarovanému obsahu chloridů.

Závěr

Lze konstatovat, že použití kompozitních stříbrných elektrod představuje v oblasti stanovování chloridových iontů velmi dobrou alternativu ke rtuťovým elektrodám a zároveň i ke stříbrným kovovým elektrodám. Ačkoli jsou rtuťové elektrody jen velmi obtížně překonatelné v obnovovatelnosti a reprodukovatelnosti povrchu a poměrně širokém potenciálovém měřicím rozsahu, citlivost kompozitních stříbrných elektrod při stanovení chloridových iontů může dosáhnout srovnatelné citlivosti se rtuťovými elektrodami, přičemž lze dosáhnout běžně limit detekce v jednotkách mg.l^{-1}. Kalibrační křivky jsou lineární od desetin až do desítek mg.l^{-1}, limit detekce se pohybuje na úrovni 2 mg.l^{-1}.

Stanovení chloridů není ovlivněno přítomností většiny běžných aniontů (jodidy, dusičnany, chloristany, sírany). Slabé interference byly pozorovány pouze v případě bromidových iontů. Povrchově aktivní látky mírně snižují výšku píků. Příprava užívaných kompozitních elektrod je relativně snadná a jejich podstatnou předností je i možnost provádět analýzy bez odstraňování kyslíku.

Autoři děkují za finanční podporu grantu č. 101/02/U111/CZ.

LITERATURA

1. Tallman D. E., Petersen S. L.: Electroanalysis *2*, 499 (1990).
2. Kolb M., v knize: *Advances in Electrochemistry & Electrochemical Engineering* (Gerischer H., Tobias C. W., ed.), sv. 11, str. 125. Wiley, New York 1978.
3. Brand M., Eshkenazi I., Kirowa-Eisner E.: Anal. Chem. *69*, 4660 (1997).
4. Bonfil Y., Brand M., Kirowa-Eisner E.: *J. Heyrovský Memorial Symposium on Advances in Polarography and Related Methods*, *Prague, 30. srpna–1. září 2000*. Book of Abstracts (Pospíšil L., ed.), str. 25.
5. Navrátil T., Kopanica M.: Crit. Rev. Anal. Chem. *32*, 153 (2002).
6. Navrátil T., Kopanica M.: Chem. Listy *96*, 111 (2002).
7. Krista J., Kopanica M., Novotný L.: Electroanalysis *12*, 3 (2000).
8. Navrátil T., Kopanica M., Krista J.: Chem. Anal. (Warsaw), v tisku.
9. Kopanica M., Navrátil T.: *US-CZ Workshop on Electrochemical Sensors Prague 2001, 19.–22. června 2001*. Book of Abstracts (Barek J., Drašar P., ed.), str. 32. Česká společnost chemická, Praha 2001.
10. Navrátil T., Kopanica M.: Electroanalysis, zasláno k otištění.
11. Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarografie.* Nakladatelství ČSAV, Praha 1966.
12. Polaro-Sensors: *Metodiky k počítačovému Eco-Tribo Polarografu PC-ETP*; http://www.polarsen.cz, 2.6.2002.
13. Krjukowa T. A., Sinjakova S. I., Arefjewa T. W.: *Polarographische Analyse*, str. 561. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1964.
14. Yosypchuk B., Novotný L.: Crit. Rev. Anal. Chem. *32*, 141 (2002).
15. Krista J.: *Dizertační práce*. Univerzita Karlova, Praha 2001.
16. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví České republiky č. 376/2000 Sb., *kterou se stanoví požadavky na pitnou vodu a rozsah a četnost její kontroly*. Sbírka zákonů 2000, částka 103, str. 4879.
17. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví České republiky č. 292/1997, *kterou se stanoví požadavky na zdravotní nezávadnost balených vod a o způsobu jejich úpravy*. Sbírka zákonů 1997, částka 98, str. 5410.
18. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví České republiky č. 464/2000, *kterou se stanoví hygienické požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity venkovních hracích ploch*. Sbírka zákonů 2000, částka 132, str. 7214.
19. Navrátil T., Novotný L.: Chem. Listy *90*, 121 (1996).
20. Novotný L., Navrátil T., Battisti A.: Vod. Hospodar. *12*, 390 (1997).
21. Novotný L., Navrátil T.: Electroanalysis *10*, 8 (1998).
22. Navrátil T., Novotný L.: Fresenius' J. Anal. Chem. *366*, 249 (2000).
23. Polaro-Sensors: *Manuál k počítačovému Eco-Tribo Polarografu PC-ETP*; http://www.polarsen.cz, 12.5.2002
24. Schmidt E., Wuthrich G.: J. Electroanal. Chem. *28*, 349 (1970).
25. Bonfil Y., Kirowa-Eisner E.: Anal. Chim. Acta *457*, 285 (2002).
26. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat.* Edice Plus, Praha 1994.
27. Novotný L.: Electroanalysis *12*, 1211 (2000).

S. Šebková *(Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):* **Determination of Chlorides on Composite Silver Electrodes**

Silver composite electrodes prepared from a silver and graphite powders and a methacrylate resin are suitable sensors for voltammetric determination of chloride ions. Their application to the DC voltammetric and differential-pulse cathodic-stripping voltammetric determination of Cl^- in untreated tap or table water has been successfully tested.

INTERNATIONAL PROJECTS

ENZYMIC TRANSFORMATIONS OF BLACKCURRANT OIL: ENRICHMENT WITH γ-LINOLENIC ACID AND α-LINOLENIC ACID

MARIE ZAREVÚCKA[a], MIROSLAV VACEK[a], ZDENĚK WIMMER[a,*], KAREL STRÁNSKÝ[a], BOHUMÍR KOUTEK[a], and KATEŘINA DEMNEROVÁ[b]

[a]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6, [b]Institute of Chemical Technology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Technická 5, 160 28 Prague 6 e-mail: wimmer@uochb.cas.cz

Received 19.6.02, in revised form 10.2.03, accepted 20.2.03.

Keywords: *Candida cylindracea*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, lipase, blackcurrant oil, enzymic hydrolysis, enzymic esterification, γ-linolenic acid/α-linolenic acid ratio

Contents

1. Introduction
2. Technical evaluation of the processes
3. Results and discussion
   3.1. Enzymic hydrolysis
   3.2. Enzymic esterification
4. Conclusion

1. Introduction

The biological importance of γ-linolenic acid [(6*Z*,9*Z*,12*Z*)-Octadeca-6,9,12-trienoic acid, 18:3*n*-6] has been well documented[1–2]. γ-Linolenic acid is known to play a crucial role in the generation of prostaglandin derivatives[3–5]. In higher plants γ-linolenic acid is biosynthesized *in vivo* from linoleic acid [(9*Z*,12*Z*)-Octadeca-9,12-dienoic acid, 18:2*n*-6] under the action of δ6-desaturase[6] (Fig. 1). Under normal physiological conditions in humans, γ-linolenic acid results from the hepatic bioconversion of linoleic acid, the major essential fatty acid for humans. The transformation of linoleic acid to more unsaturated γ-linolenic acid also requires the activation of liver δ6-desaturase[7] (Fig. 1). As shown in Figure 1, higher polyunsaturated fatty acids are direct precursors of prostaglandins and leukotrienes[3–5], and they also have direct impact on the correct function of cell walls. Natural plant sources of γ-linolenic acid contain variable quantities of this acid[8]. Among those natural sources, a special attention should be paid to blackcurrant (*Ribes nigrum*). The oil, isolated from the plant seeds, contains also another important polyunsaturated fatty acid, α-linolenic acid [(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-Octadeca-9,12,15-trienoic acid, 18:3*n*-3], which is considered to be one of the most important polyunsaturated fatty acids[9–10]. Its biosynthesis *in vivo* from linoleic acid requires activation of δ15-desaturase[6]. Both linolenic acids are natural sources for their subsequent transformation into higher polyunsaturated fatty acids *in vivo* in humans and animals[6] (Fig. 1).

The dietary requirements for linoleic acid are estimated to be around 2.7 % of the total caloric intake equivalent in children and around 3–5 g per day in adults[11]. The required amount of essential fatty acids is usually supplied by a well-balanced diet. Biochemical or clinical symptoms of essential fatty acid deficiency are extremely rare, provided that the endogenous conversion of linoleic acid into γ-linolenic acid and subsequent compounds proceeds normally. On the other hand, it is known that fat-free parental diet very rapidly exhausts the endogenous essential fatty acid resources, leading to biochemical clinical abnormalities[12–13]. The dietary ratio of γ-linolenic acid to α-linolenic acid displays different physiological effects[14–15]. It has also been reported[14] that simultaneous supplementation of γ-linolenic acid and α-linolenic acid in animal diet could have an important icosanoid-mediated physiological effect.

A number of reports suggest that the normal transformation of linoleic acid into other essential fatty acids may be suppressed under several stressful conditions[16–19], most probably as a result of the δ6-desaturase deactivation. Critically ill patients thus become at risk of developing essential fatty acid deficient status, even in the case of appropriate linoleic acid delivery. Therefore, attention has been focused on an economically available lipid source, blackcurrant oil (BCO), which could be of clinical importance in situations caused by the enzyme deficiency.

Blackcurrant seeds are a waste product in the production of blackcurrant in the Czech Republic. This product is available in relatively large quantities as a residue from the production of jams, jellies, and juice drinks. BCO was obtained by an effective extraction of blackcurrant seeds (*Ribes nigrum*) in a supercritical carbon dioxide recycling reactor[20–21]. The average fatty acid composition of the extracted BCO is shown in Table I.

Many attempts have been made to produce concentrates of polyunsaturated fatty acids from naturally occurring triacylglycerols[6,8]. Various chemical and biochemical techniques have been developed including separation on zeolites and lipase-catalyzed reactions both in water and in organic solvents[22–24]. Employing lipases offers several advantages in comparison with chemical methods. (*a*) The catalytic efficiency of lipases is high, and it results in a low quantity of the

* Corresponding author

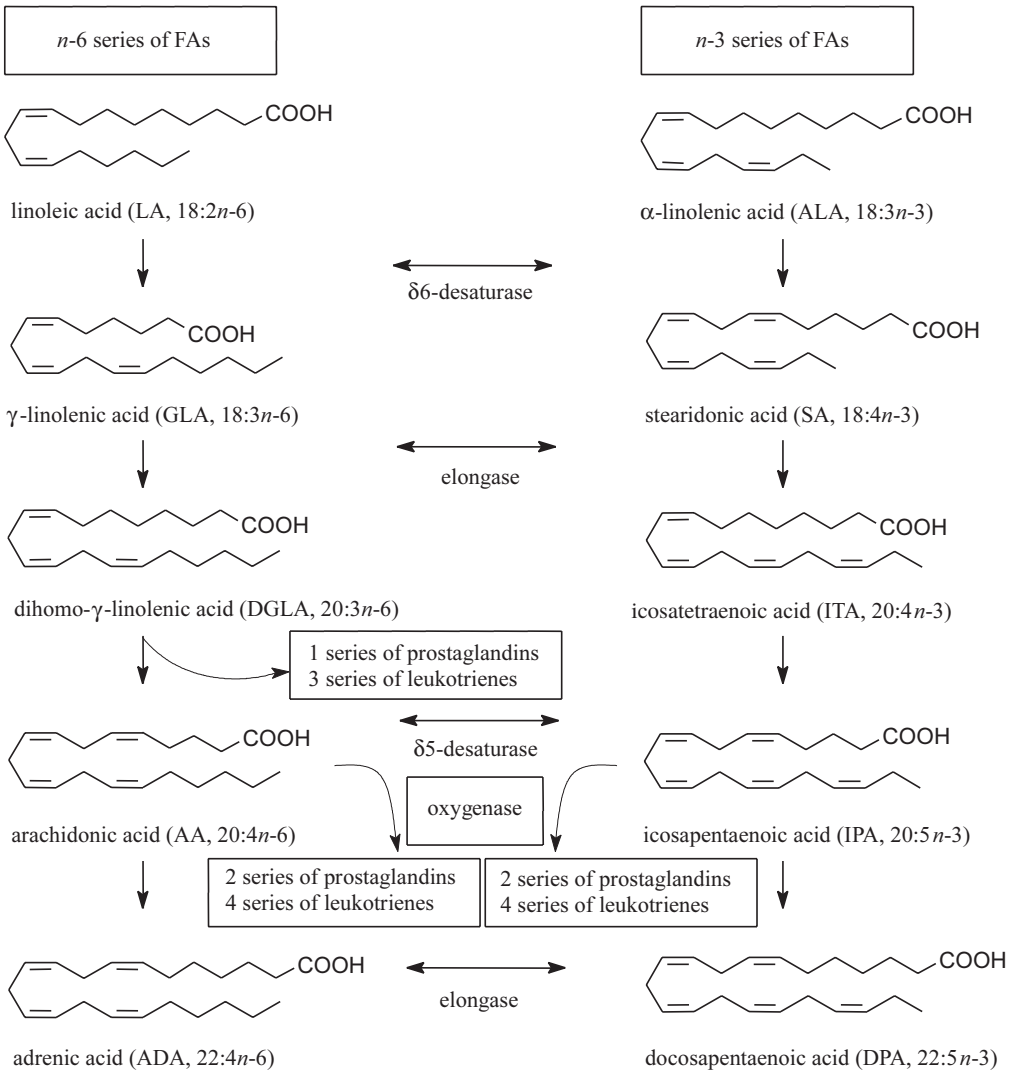


Fig. 1. **Metabolic pathways of transformations of linoleic acid into polyunsaturated fatty acids and icosanoids**

Table I
Fatty acid composition of blackcurrant oil from Chelčice, Czech Republic

Fatty Acid	IUPAC Name	Content [%]
Palmitic acid (16:0)	Hexadecanoic acid	6.3
Palmitoleic acid (16:1*n*-7)	(9*Z*)-Hexadec-9-enoic acid	0.1
Stearic acid (18:0)	Octadecanoic acid	1.9
Oleic acid (18:1*n*-9)	(9*Z*)-Octadec-9-enoic acid	13.7
cis-Vaccenic acid (18:1*n*-7)	(11*Z*)-Octadec-11-enoic acid	0.7
Linoleic acid (18:2*n*-6)	(9*Z*,12*Z*)-Octadeca-9,12-dienoic acid	47.4
γ-Linolenic acid (18:3*n*-6)[a]	(6*Z*,9*Z*,12*Z*)-Octadeca-6,9,12-trienoic acid	13.0
α-Linolenic acid (18:3*n*-3)[a]	(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-Octadeca-9,12,15-trienoic acid	11.9
Stearidonic acid (18:4*n*-3)	(6*Z*,9*Z*,12*Z*,15*Z*)-Octadeca-6,9,12,15-tetraenoic acid	2.0
Gondoic acid (20:1*n*-9)	(11*Z*)-Icos-11-enoic acid	0.9
(*Z*,*Z*)-11,14-Icosadienoic acid (20:2*n*-6)	(11*Z*,14*Z*)-Icosa-11,14-dienoic acid	0.2
Unidentified	–	1.9

[a] The ratio (18:3*n*-6)/(18:3*n*-3) = 1.10

enzyme required. (*b*) High fatty acid selectivity of lipases has been well known and it is of priority importance for the intended application. (*c*) Mild reaction conditions that lipases offer in terms of pH and temperature are also important in processes that involve highly labile polyunsaturated fatty acids. The all-*Z* structure of polyunsaturated fatty acids of the natural origin is prone to partial destruction by oxidation, *Z*/*E* isomerization, double bond migration and polymerization.

In this study, which appeared partly in the recently published original papers[20,25], several lipases (triacylglycerol alkylhydrolases, EC 3.1.1.3) have been subjected to the investigation. The immobilized lipases from *Candida cylindracea*, *Mucor miehei* and *Pseudomonas cepacia*, and Lipozyme® (also the lipase from *M. miehei*, immobilized in a different way), and the non-immobilized (free) lipases from *M. miehei* and *P. fluorescens* were used to mediate the hydrolysis of the blackcurrant oil aimed at designing enzymic processes of enrichment with γ-linolenic acid and α-linolenic acid. Attention was also focused on investigation of selective preferences of the hydrolytic enzymes towards those polyunsaturated fatty acids. The same immobilized lipases were employed in the process of enrichment with γ-linolenic acid and α-linolenic acid contents during the enzymic esterification of free fatty acids, obtained from BCO by chemical means, with butan-1-ol.

2. Technical evaluation of the processes

Blackcurrant oil (BCO) was obtained by effective extraction of blackcurrant seeds (*Ribes nigrum*) in a supercritical carbon dioxide recycling reactor[20–21]. The main area for the production of the blackcurrant seeds is located in Chelčice (South Bohemia, Czech Republic). The fatty acid composition of the BCO of the above-described origin is shown in Table I.

Non-immobilized (free) lipase from *M. miehei* (6440 U/mg) and from *P. fluorescens* (42.5 U/mg) were employed together with the lipase from *C. cylindracea* immobilized on macroporous acrylic beads (1020 U/g), the lipase from *M. miehei* immobilized on Sol-Gel-AK (8.9 U/g), the lipase from *P. cepacia* also immobilized on Sol-Gel-AK (63 U/g), and Lipozyme® (62 U/g), i.e. the lipase from *M. miehei* immobilized on macroporous ion-exchange resin.

Triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols, fatty acid butyl esters or free fatty acids were separated from the reaction mixtures by column chromatography techniques. These compounds were modified subsequently by chemical transesterification reactions according to the described method[26], and the obtained fatty acid methyl esters were dissolved in hexane. The GC analyses were performed with a HP 5890A gas chromatograph (Hewlett-Packard, USA), equipped with a flame ionization detector (FID) and split-splitless injector (split ratio 1:49). The injector and FID temperatures were 240 °C and 250 °C, respectively, oven temperature program was set as follows: 200 °C (20 min), 5 °C.min^{-1} to 230 °C (15 min). A DB-WAX column (30 m×0.25 mm×0.25 μm; J&W Scientific) and hydrogen as carrier gas (average linear velocity 40 cm.s^{-1}) were used. Data were collected with a HP 3393A integrator. The peaks of respective fatty acid methyl esters were identified using commercially available standards of fatty acid methyl esters.

TLC was performed on Silufol precoated silica gel plates (Kavalier, Czech Republic). A mixture of diethyl ether/light petroleum/acetic acid (40:80:1.6 v/v/v) was used as eluent. The products were detected by spraying the developed TLC plates with a solution of phosphomolybdic acid in methanol.

Column chromatography purifications were performed on a silica gel (Hermann, Köln-Ehrenfeld, Germany), particle size 0.04–0.063 mm. The size of the column was chosen to enable the sample/silica gel ratio 1:50–1:70 (w/w). The compounds were eluted with mixtures of diethyl ether with light petroleum, in which the ratio of both eluents was adjusted to the individual mixture of compounds to be separated.

Preparation of free fatty acids was performed by alkaline hydrolysis of a BCO sample (1 g) using a 1 M solution of potassium hydroxide in 90 % aqueous ethanol (6 ml) under heating to 80 °C and stirring under argon for 90 min at 500 min^{-1}. The mixture was cooled to the room temperature, and deionized water (6 ml) and 6 M solution of hydrochloric acid (2 ml) were added. The obtained mixture of free fatty acids was extracted with diethyl ether. The combined extracts were dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated under vacuum at 32 °C. The products (free fatty acids; 100 mg) were dissolved in isooctane (2,2,4-trimethylpentane; 3 ml) and stored at –18 °C. No other impurity in this product was detected by GC analysis, which was repeatedly performed before using.

The enzymic hydrolysis in aqueous media was performed at 40 °C in 2 ml vials under stirring. BCO (100 mg) and water (100 μl) were mixed and equilibrated at experimental temperature. The reaction was started by addition of lipase (18 U), allowed to proceed for 24 h, and then stopped by filtering off the enzymes. The products were extracted from the reaction mixture with diethyl ether and separated by column chromatography on silica gel.

When using a two-phase system for the enzymic hydrolysis, a solution of BCO (300 mg) in isooctane (2 ml) was added to a phosphate buffer (1 ml, 0.1 M, pH 7.0) containing an immobilized lipase (4.5 U). The suspension was incubated at 30 °C for 4 h, and then the process was stopped by filtering off the enzyme. The products were extracted from the reaction mixture with diethyl ether and dried over anhydrous sodium sulfate. The solvent was evaporated and the products were separated and purified by column chromatography on silica gel.

Enzymic esterification under conventional heating was performed using addition of lipase (1U) to a solution of free fatty acids (100 μl) and butan-1-ol (100 mg) in isooctane (3 ml). The mixture was heated to 30 °C and stirred at 500 min^{-1} for 2 h using a Unimax 1010 incubator (Heidolph, Germany), and then filtered to separate the enzyme, which was washed twice with diethyl ether. After evaporation of the solvents, the products were separated by column chromatography.

Application of microwave irradiation represented another modification of the enzymic esterification. The reaction mixture was prepared in the same way as described before. It was irradiated to 30 °C for 2 h using a Synthewave S 402 microwave reactor (Prolabo, France) in a monomode system. The reaction conditions were controlled by an algorithm, which allows a control the reaction temperature at the required value by varying power up to 20 W in operation under electromag-

netic field[27–28]. After 2-h reaction, the enzyme was separated from the reaction mixture by filtration, and washed twice with diethyl ether to collect the products. After evaporation of the solvents the products were purified by column chromatography.

3. Results and discussion

3.1. Enzymic hydrolysis

Screening of four selected lipases in their six forms for performing hydrolysis of BCO was studied[20]. The enzymes used were the immobilized lipases from *C. cylindracea* (immobilized on macroporous acrylic beads), *M. miehei* (immobilized on Sol-Gel-AK) and *P. cepacia* (immobilized on Sol--Gel-AK), and Lipozyme® (the lipase from *M. miehei* immobilized on macroporous ion exchange resin), and the non-immobilized (free) lipases from *M. miehei* and *P. fluorescens*. The experiments were performed using two modifications of the hydrolytic procedure. The hydrolysis of BCO mediated by selected lipases gave mixtures of diacylglycerols, monoacylglycerols, free fatty acids and unreacted triacylglycerols, which was in accordance with the expected reaction course. After isolation from the reaction mixture, the respective products were separated by column chromatography into several fractions. The isolated products were subjected to transesterification[26], and the resulting fatty acid methyl esters were analyzed by GC. In particular experiments, when the quantity of diacylglycerols and monoacylglycerols was low (those mediated by *C. cylindracea*), separation of fatty acids from the fraction of monoacylglycerols and diacylglycerols failed, and these groups of compounds had to be analyzed together as one individual fraction of the products. Monoacylglycerols and diacylglycerols, however, were also analyzed together. Work--up of the enzymic hydrolysis[20] using the Method I was performed during a 24-h period, and all selected lipases, i.e., the immobilized lipases from *C. cylindracea*, *M. miehei* (immobilized on Sol-Gel-AK) and *P. cepacia*, and Lipozyme® (the lipase from *M. miehei* immobilized on macroporous ion exchange resin), and the non-immobilized (free) lipases from *M. miehei* and *P. fluorescens*, were subjected to the screening procedure (Table II). In general, the rate of enzymic hydrolysis of triacylglycerols isolated from BCO beforehand corresponds generally to the quantity of the BCO hydrolyzed to diacylglycerols, monoacylglycerols and free fatty acids. Natural BCO contains ~95 % of triacylglycerols. The most satisfactory rates of hydrolysis of BCO by Method I were obtained with immobilized lipase from *P. cepacia* and Lipozyme® employed as biocatalysts. However, certain enrichment with γ-linolenic acid was observed in the collective fractions of diacylglycerols and monoacylglycerols in the transformations of BCO mediated by *M. miehei* immobilized on Sol-Gel-AK (Table II). Enrichment with both, γ-linolenic acid and α-linolenic acid, was observed in the transformations of BCO mediated by non-immobilized *P. fluorescens* (Table II). An effort was made to study the substrate regiospecificity of the lipases as regards the position of the acyl group in triacylglycerols. Two types of specific enzymes were employed: *sn*-1,3-regiospecific (*M. miehei*) and nonspecific enzymes (*C. cylindracea*, *P. cepacia* and *P. fluorescens*). The reason for using both types of lipases has reflected the fact that the most frequent positions of α-linolenic acid and γ-linolenic acid in triacylglycerols of BCO are not known yet. Selectivity of the lipases was observed only when the reaction was catalyzed by lipase from *M. miehei* and from *P. fluorescens* under the conditions of Method I. The content of γ-linolenic acid increased to 16.8 % in the collective fractions of monoacylglycerols and diacylglycerols (Table II). An increase in the ratio of γ-linolenic acid to α-linolenic acid in the same fractions of products was calculated for the products of hydrolysis of BCO mediated by *M. miehei* in all three forms subjected to the screening (Table II). Compared with the original ratio of these two polyunsaturated fatty acids (1.10; Table I), discrimination of α-linolenic acid was observed in the collective fractions of diacylglycerols and monoacylglycerols in the hydrolysis of BCO mediated by the lipase from *M. miehei* immobilized on Sol-Gel-AK (1.75), Lipozyme® (2.00), and in the fraction of free fatty acids obtained in the hydrolysis of BCO mediated by the non-immobilized lipase from *M. miehei* (2.11). Both types of the immobilized lipase from *M. miehei* discriminated γ-linolenic acid in the fractions of free fatty acids. Comparing the content of linoleic and oleic acids, the fractions of products after hydrolysis of BCO mediated by the lipases, an increase in the linoleic acid content was accompanied by a decrease in the oleic acid content in the same fraction (Table II). A decrease in the linoleic acid content was always observed, when the ratio of γ-linolenic acid/α-linolenic acid was lower than in the original BCO (i.e., when the ratio <1; cf. Table II).

The other modification of the lipase-mediated hydrolysis (Method II) (Ref.[20]) was performed by employing the immobilized lipases of the studied series of enzymes (Table III). The reaction was carried out in a two-phase system consisting of a buffer and isooctane. Free lipases (those from *M. miehei* and *P. fluorescens*) were found inconvenient for performing the enzymic hydrolysis in this particular two-phase system. The free lipase was always present in aqueous phase, and any stirring or shaking of the mixture in order to enhance a contact between the enzyme and the substrate was ineffective. The rate of such a hydrolysis of BCO was substantially nil. Further effort in this study was stopped, and attention was focused on screening of immobilized lipases from *C. cylindracea*, *M. miehei* (immobilized on Sol-Gel-AK), *P. cepacia*, and Lipozyme® (the lipase from *M. miehei* immobilized on macroporous ion exchange resin). These enzymic reactions were performed at 30 °C for 4 h. Increasing of the temperature up to 40 °C resulted in a decrease in chemical yield of the products of the enzymic transformations.

As shown in Table III, no considerable enrichment with either γ-linolenic acid or α-linolenic acid in any fraction of the evaluated experiments was observed. However, when comparing the ratio values calculated for the collective fractions of diacylglycerols and monoacylglycerols with those calculated for the fractions of free fatty acids in the reactions mediated by either immobilized form of the lipase from *M. miehei*, discrimination of either α-linolenic acid (ratio values 1.74 and 1.31) or γ-linolenic acid (ratio values 0.24 and 0.12) is obvious (Table III). The same principle as described above (Method I) was observed concerning the linoleic acid and oleic acid contents in the respective fractions, and concerning even a decrease in the linoleic acid content accompanying the discrimination of γ-linolenic acid (ratio value <1).

Table II
Fatty acid composition of glycerol esters and free fatty acids obtained by enzymic hydrolysis of blackcurrant with the tested lipases – Method I

Source of Lipase	Fraction[a]	18:1*n*-9 [%][b]	18:2*n*-6 [%][b]	18:3*n*-6 [%][b]	18:3*n*-3 [%][b]	18:3*n*-6/18:3*n*-3 ratio
Candida cylindracea	TG	14.2	45.4	12.3	10.7	1.15
	FFA+DG+MG	20.1	37.6	4.6	5.5	0.84
Mucor miehei	TG	13.7	46.0	12.5	11.2	1.12
(immobilized on Sol-Gel-AK)	FFA	22.5	32.5	1.2	3.2	0.37
	DG+MG	14.4	47.6	16.8	9.6	1.75
Lipozyme®	TG	13.4	45.0	13.3	11.2	1.19
	FFA	22.4	32.9	1.5	3.6	0.42
	DG+MG	25.3	14.3	1.8	0.9	2.00
Pseudomonas cepacia	TG	19.5	40.6	7.6	6.9	1.10
	FFA	14.5	39.4	5.5	6.1	0.90
	DG+MG	24.8	40.6	6.6	4.6	1.43
Mucor miehei	TG	36.0	13.3	0.0	0.0	0.00
(non-immobilized)	FFA	20.3	28.8	5.9	2.8	2.11
	DG+MG	16.1	10.7	0.8	0.8	1.00
Pseudomonas fluorescens	TG	14.8	46.1	6.8	6.6	1.03
	FFA	18.0	44.3	11.8	10.4	1.14
	DG+MG	14.5	44.1	15.7	13.4	1.17

[a] Triacylglycerols (TG), free fatty acids (FFA), diacylglycerols (DG), monoacylglycerols (MG), [b] mole percents

Table III
Fatty acid composition of glycerol esters and free fatty acids obtained by enzymic hydrolysis of blackcurrant with selected lipases – Method II

Source of Lipase	Fraction[a]	18:1*n*-9 [%][b]	18:2*n*-6 [%][b]	18:3*n*-6 [%][b]	18:3*n*-3 [%][b]	18:3*n*-6/18:3*n*-3 ratio
Candida cylindracea	TG	13.5	46.1	12.7	11.6	1.09
	FFA+DG+MG	not determined				–
Mucor miehei	TG	14.7	45.8	11.7	10.8	1.08
(immobilized on Sol-Gel-AK)	FFA	19.7	31.1	1.0	4.2	0.24
	DG+MG	18.0	45.7	11.8	6.8	1.74
Lipozyme®	TG	14.5	46.5	12.7	10.6	1.20
	FFA	17.0	44.3	1.0	8.0	0.12
	DG+MG	23.4	35.1	5.0	3.8	1.31
Pseudomonas cepacia	TG	17.8	44.8	9.5	9.1	1.04
	FFA	17.2	11.1	0.5	0.5	1.00
	DG+MG	28.5	1.4	0.0	0.0	0.00

[a] Triacylglycerols (TG), free fatty acids (FFA), diacylglycerols (DG), monoacylglycerols (MG), [b] mole percents

3.2. Enzymic esterification

The enzymic esterification (Method III) (Ref.[25]) of free fatty acids, obtained by chemical hydrolysis of BCO, was performed for 2 h because the selectivity of the lipases to fatty acids decreased with increasing time due to their deactivation (Table IV). It was observed that after 3 h of enzymic transformation, no residual free fatty acids were present and, therefore, the screened enzymes, immobilized lipases from *C. cylindracea*, *M. miehei* (immobilized on Sol-Gel-AK), *P. cepacia*, and Lipozyme® (the lipase from *M. miehei* immobilized on macroporous ion exchange resin) showed no fatty acid specificity. Using Lipozyme® as biocatalyst, a content of 2.3 % of butyl γ-linolenate was found in the fatty acid butyl ester fraction under conventional heating, while 16.9 % of γ-linolenic acid was identified in the residual fatty acids. When using the lipase from *P. cepacia* as biocatalyst under conventional heating, the quantity of butyl γ-linolenate rose to 20 % in the fatty acid butyl ester fraction, while 12.2 % of γ-linolenic acid remained in the residual free fatty acids. When evaluating

Table IV
Composition of fatty acid butyl esters and residual free fatty acids after enzymic esterification performed under conventional heating – Method III

Source of Lipase	Fraction[a]	18:1*n*-9 [%][b]	18:2*n*-6 [%][b]	18:3*n*-6 [%][b]	18:3*n*-3 [%][b]	18:3*n*-6/18:3*n*-3 ratio
Candida cylindracea	FABE		not detectable			–
	RFFA	13.7	46.1	12.3	11.4	1.08
Mucor miehei	FABE	16.0	54.5	2.2	15.2	0.14
(immobilized on Sol-Gel-AK)	RFFA	14.0	47.6	13.3	12.4	1.07
Lipozyme®	FABE	15.8	56.2	2.3	16.0	0.14
	RFFA	13.8	45.2	16.9	10.8	1.56
Pseudomonas cepacia	FABE	6.8	46.1	20.1	12.9	1.56
	RFFA	15.1	47.9	12.2	11.9	1.02

[a] Fatty acid butyl esters (FABE), residual free fatty acids (RFFA), [b] mole percents

Table V
Composition of fatty acid butyl esters and residual free fatty acids after enzymic esterification performed under microwave irradiation – Method IV

Source of Lipase	Fraction[a]	18:1*n*-9 [%][b]	18:2*n*-6 [%][b]	18:3*n*-6 [%][b]	18:3*n*-3 [%][b]	18:3*n*-6/18:3*n*-3 ratio
Candida cylindracea	FABE	11.0	7.0	8.0	8.7	0.92
	RFFA	14.4	41.4	9.6	8.9	1.08
Mucor miehei	FABE	13.3	44.3	5.9	13.9	0.42
(immobilized on Sol-Gel-AK)	RFFA	15.6	47.8	9.9	11.0	0.90
Lipozyme®	FABE	15.0	52.7	5.5	14.8	0.37
	RFFA	11.4	35.4	29.9	8.2	3.65
Pseudomonas cepacia	FABE	7.6	47.0	19.6	13.8	1.42
	RFFA	16.2	50.0	9.2	11.4	0.81

[a] Fatty acid butyl ester (FABE), residual free fatty acids (RFFA), [b] mole percents

the γ-linolenic acid/α-linolenic acid ratios in the individual fractions after the enzymic esterification, both forms of the immobilized lipase from *M. miehei* were found to display discrimination to this ratio given in the original BCO. A remarkable discrimination of γ-linolenic acid during this esterification is well documented by the ratio values (0.14; Table IV). The γ-linolenic acid/α-linolenic acid ratio in residual free fatty acid fractions (1.07 and 1.56) shows, in turn, enrichment with γ-linolenic acid in this fraction only when Lipozyme® was used as enzyme mediator of esterification. The linoleic acid and oleic acid contents seemed to be even in accordance with increasing or decreasing contents of α-linolenic acid in the product fractions.

Under microwave irradiation (Method IV) (Ref.[25]), 5.5 % of butyl γ-linolenate was found in the fatty acid butyl ester fraction, and 29.9 % of γ-linolenic acid in the residual free fatty acids as products of esterification mediated by Lipozyme® (Table V). Using the lipase from *P. cepacia* as biocatalyst under microwave irradiation, the ratio of butyl γ-linolenate and the residual γ-linolenic acid changed as well (19.6 % *versus* 9.2 %; Table V).

Comparing the ratio values (Table V), again both immobilized lipases from *M. miehei* showed discrimination of γ-linolenic acid in this esterification reaction. A remarkable result was achieved with Lipozyme® as biocatalyst. The fraction of residual free fatty acids (29.9 %) was enriched with γ-linolenic acid, and a high γ-linolenic acid/α-linolenic acid ratio was obtained (3.65). The action of other enzymes seemed to be different from that found in the esterification under conventional conditions. This finding may contribute to the general idea that microwave-irradiated reactions should be studied more intensively to understand the processes, which seem to be more often used as a "black box". The dependence of linoleic acid and oleic acid contents in the mixtures showed again accordance with the content of α-linolenic acid, but some differences were observed (Table V) compared to the alternative modification of this enzymic transformation of fatty acids (Table IV).

The results obtained indicate clearly that differences do exist if the effect of microwave irradiation is compared with that of conventional heating. This finding supports the original hypothesis, in which such results had been expected even if many differences in results obtained by conventional heating and microwave irradiation have still been considered with

certain skepticism. The methods of heating the reaction mixtures are different. The focused microwave irradiation supplies energy in a more concentrated and controlled way to the system than conventional heating is able to do[27–28]. This difference results in more effective and more rapid getting over the transition state energy barrier under microwave irradiation even if these energies are substantially decreased by the catalytic action of the enzyme.

4. Conclusion

Several important findings were found during this investigation:

(*a*) Enzymic hydrolysis, Method I: Highest enrichment with γ-linolenic acid was achieved in the fraction of mono- and diacylglycerols using the lipase from *M. miehei* immobilized on Sol-Gel-AK (16.8 %) and that from *P. fluorescens* (15.7 %). However, only the lipase from *M. miehei* immobilized on Sol-Gel-AK showed simultaneously discrimination of α-linolenic acid during this enzymic transformation (γ-linolenic acid/α-linolenic acid ratio = 1.75).

(*b*) Enzymic hydrolysis, Method II: Almost no enrichment with γ-linolenic acid was observed (12.7 %) in the triacylglycerol fractions resulting from the enzymic transformations performed by the lipase from *C. cylindracea* and by Lipozyme®. However, important discrimination of α-linolenic acid was found in experiments with *M. miehei* immobilized on Sol-Gel-AK (γ-linolenic acid/α-linolenic acid ratio = 1.74).

(*c*) Enzymic esterification, Method III: Enrichment with γ-linolenic acid was achieved either by the lipase from *P. cepacia* (20.1 %) in the fraction of butyl esters of fatty acids or by Lipozyme® in the fraction of residual free fatty acids (16.9 %). Maximum γ-linolenic acid/α-linolenic acid ratio was found identical together with the above-mentioned results (1.56).

(*d*) Enzymic esterification, Method IV: Enrichment with γ-linolenic acid was achieved either by the lipase from *P. cepacia* (19.6 %) in the fraction of butyl esters of fatty acids or by Lipozyme® in the fraction of residual free fatty acids (29.9 %), which was the best enrichment found in this series of experiments for γ-linolenic acid. The absolute maximum of the γ-linolenic acid/α-linolenic acid ratio was found with Lipozyme® (3.65).

(*e*) Enzymic esterification, in general: While Lipozyme® discriminates γ-linolenic acid (16.9 % and 29.9 % found in the fraction of residual free fatty acids), the lipase from *P. cepacia* works in the opposite way, because it causes enrichment with γ-linolenic acid in the fraction of fatty acids butyl esters (20.1 % and 19.6 %).

(*f*) Enzymic transformations, in general: The lipase from *M. miehei* (*sn*-1,3-regiospecific lipase) was the best lipase for performing the evaluated enzymic processes in the way they had been designed.

(*g*) Enzymic transformations, in general: Lipozyme® was the best biocatalyst among all three forms of the lipase from *M. miehei*, which were subjected to this screening. This form of immobilization of the lipase from *M. miehei* seems to meet all basic requirements of the immobilized lipase to be considered for potential industrial application in the enrichment with γ-linolenic acid and α-linolenic acid from natural plant oils as shown in this study with BCO.

Financial support of this research through the COST network project D13/0014/01 (D13.10; Ministry of Education of the Czech Republic) and through the internal grant No. 2/8 of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry is gratefully acknowledged. We thank the University of La Rochelle, France (Professor M.-D. Legoy), for enabling us to perform experiments with a Synthewave S 402 microwave reactor in the frame of the COST exchange program for scientists. The authors appreciate skilful technical assistance of Mrs. M. Wimmerová and Mrs. H. Ernyeiová.

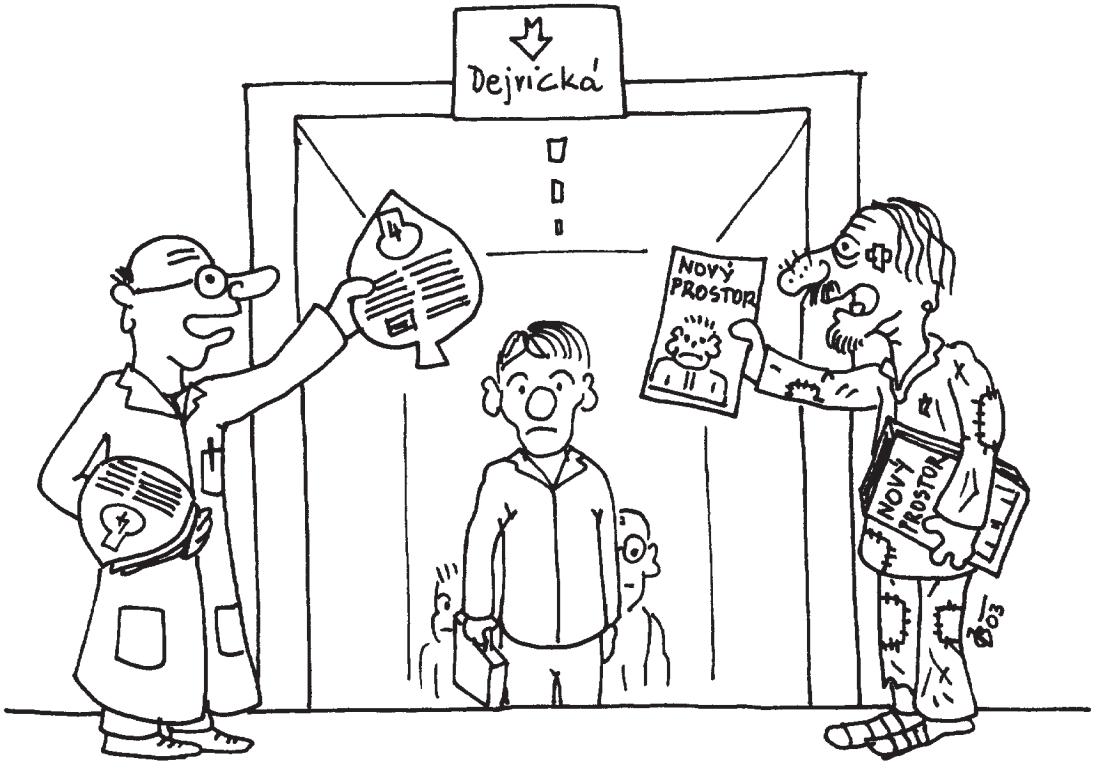
REFERENCES

1. Horrobin D. F.: Prog. Lipid Res. *31*, 163 (1992).
2. Youdim K. A., Martin A., Joseph J. A.: Int. J. Dev. Neurosci. *18*, 383 (2000).
3. Hadjiagapiou C., Kaduce T. L., Spector A. A.: Biochim. Biophys. Acta *875*, 369 (1986).
4. Yerram N. R., Moore S. A., Spector A. A.: J. Lipid Res. *30*, 1747 (1989).
5. Sprecher H., Luthria D. L., Mohammed B. S., Baykousheva S. P.: J. Lipid Res. *36*, 2471 (1995).
6. Phillips J. C., Huang Y.-S., in: γ-*Linolenic Acid, Metabolism and Its Roles in Nutrition and Medicine* (Huang Y.-S. and Mills D. E., eds.), Chapter 1, p. 1. AOCS Press, Champaign 1996.
7. Lindskov R., Holmer G.: Allergy (Copenhagen) *47*, 517 (1992).
8. Wille H.-J., Wang J., in: γ-*Linolenic Acid, Metabolism and Its Roles in Nutrition and Medicine* (Huang Y.-S. and Mills D. E., eds.), Chapter 4, p. 33. AOCS Press, Champaign 1996.
9. Makrides M., Gibson R. A., in: *Essential Fatty Acids and Eicosanoids* (Riemersma R. A., Armstrong R., Kelly R. W., and Wilson R., eds.), p. 136. AOCS Press, Champaign 1998.
10. Vajreswari A., Rupalatha M., Rao P. S.: J. Nutr. Sci. Vitaminol. *48*, 365 (2002).
11. Traitler H., Winter H., Richli U., Ingenbleek Y.: Lipids *19*, 923 (1984).
12. Panos T. C., Stinnet B., Cross E., Beard A. G.: Fed. Proc. *20*, 366 (1961).
13. Friedman Z., Danon A., Stahlman M. T., Oates J. A.: Pediatrics *58*, 640 (1976).
14. Christophe A., in: γ-*Linolenic Acid, Metabolism and Its Roles in Nutrition and Medicine* (Huang Y.-S. and Mills D. E., eds.), Chapter 13, p. 168. AOCS Press, Champaign 1996.
15. Okuyama H., Huang M.-Z., Miyazaki M., Watanabe S., Kobayashi T., Nagatsu A., Sakakibara J., in: *Essential Fatty Acids and Eicosanoids* (Riemersma R. A., Armstrong R., Kelly R. W., and Wilson R., eds.), p. 273. AOCS Press, Champaign 1998.
16. Friedman Z., Frölich J. C.: Pediatr. Res. *13*, 932 (1979).
17. Stein T. P., Marino P. L., Harner R. N., Schluter M. D., Leskiw M. J., Black S.: J. Am. Coll. Nutr. *2*, 241 (1983).
18. van Dam P. S.: Diabetes Metab. Res. Rev. *18*, 176 (2002).
19. Nishimura K., Tsumagari H., Morioka A., Yamauchi Y.,

Miyashita K., Lu S., Jisaka M., Nagaya T., Yokota K.: Appl. Biochem. Biotechnol. *102*, 239 (2002).
20. Vacek M., Zarevúcka M., Wimmer Z., Stránský K., Koutek B., Macková M., Demnerová K.: Enzyme Microb. Technol. *27*, 531 (2000).
21. Sovová H., Zarevúcka M., Vacek M., Stránský K.: J. Supercrit. Fluids *20*, 15 (2001).
22. Gandhi N. N.: J. Am. Oil Chem. Soc. *74*, 621 (1997).
23. Syed Rahmatullah M. S. K., Shukla V. K. S., Mukherjee K. D.: J. Am. Oil Chem. Soc. *71*, 569 (1994).
24. Huang F. C., Ju C. W.: J. Am. Oil Chem. Soc. *74*, 977 (1997).
25. Vacek M., Zarevúcka M., Wimmer Z., Stránský K., Demnerová K., Legoy M.-D.: Biotechnol. Lett. *22*, 1565 (2000).
26. Stránský K., Jursík T.: Fett/Lipid *98*, 65 (1996).
27. Jacquault P.: F 9,116,286 (1991).
28. Jacquault P.: EP 549,495 (1992).

M. Zarevúcka[a], M. Vacek[a], Z. Wimmer[a], K. Stránský[a], B. Koutek[a], and K. Demnerová[b] *([a]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, [b]Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague):* **Enzymic Transformations of Blackcurrant Oil: Enrichment with γ-Linolenic Acid and α-Linolenic Acid**

The ability of enzymes to mediate some transformations of blackcurrant oil was described and evaluated. Four commercially available lipases, both in their free and immobilized forms were selected for the investigation. The selected enzymes were the lipases from *Candida cylindracea*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas fluorescens*. Two target enzymic processes were investigated: (*a*) Enzymic hydrolysis of blackcurrant oil was studied and potential selectivity was evaluated of several commercially available lipases to discriminate polyunsaturated fatty acids, namely α-linolenic acid and γ-linolenic acid in products under mild conditions. Two modifications of the process were used, of which employing aqueous media gave a higher enrichment in γ-linolenic acid in the obtained mono- and diacylglycerols (up to 16.8 % of γ-linolenic acid). (*b*) Enzymic esterification of fatty acids obtained by chemical hydrolysis of blackcurrant oil was studied and evaluated to find commercially available enzyme(s) capable of mediating similar discrimination to that under (*a*). Two modifications of the process were again used: Enrichment with γ-linolenic acid up to 20 % was achieved under conventional heating, and up to 30 % under microwave irradiation. The methods employed were compared.



RECENZE

M. Schätz:
Historie výuky chemie. Osobnosti a události
Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha 2002. Stran 295, obrázků 193, náklad a cena neuvedeny.

U příležitosti půlstoletí své existence pod názvem Vysoká škola chemicko-technologická v Praze vydala tato škola ve svém vydavatelství publikaci v podstatě o historii výuky technické chemie v Praze. Hlavní titul knihy je nepřesný, v knize není pojednáno o výuce chemie na jiných vysokých školách a universitách v českých zemích. To je však detail.

Kniha podává výklad o více než dvoustoleté historii výuky technické chemie v Praze. Jména profesorů přednášejících chemii na pražské technice v 1. polovině 19. století (K. A. Neumann, J. J. Steinmann, F. X. M. Zippe, K. N. Balling) jsou známa jen odborníkům z historie české chemie, dnešnímu čtenáři už nic neřeknou. Málo se ví, ale v recenzované knize je to zaznamenáno, že studium na pražské polytechnice v té době bylo rozděleno na chemické a matematické (v něm bylo studium mechaniky a stavebnictví), přičemž postupem doby byla chemie zatlačována do pozadí. V polovině 19. století se však poměry změnily a chemie se stala rovnocenným partnerem. Vedle přednášek ze všeobecné chemie a chemické technologie se objevily i přednášky z analytické chemie.

V kapitole O český charakter pražské polytechniky je uvedeno schéma výuky chemie, které uplatňoval prof. Balling, jenž ji přednášel v 50. a 60. letech ve třech blocích: jako všeobecnou chemii, analytickou chemii a zkoušení dmuchavkou a konečně technickou chemii. I když byla pražská technika Královským českým polytechnickým zemským ústavem, němčina zůstávala vyučovacím jazykem. Polytechnika měla tehdy 4 samostatné odbory, mezi nimi technické lučby – proně byl stanoven pevný studijní plán na 4 roky, který je v knize popsán. Výuka chemie na samostatné české polytechnice je spojena už se známějšími jmény (F. Štolba, V. Šafařík, K. Preis, B. Raýman, A. Bělohoubek).

Další část knihy je členěna podle chemických oborů přednášených na pražské technice ve 20. století. Mezi profesory anorganiky, organiky a analytiky je pojednáno o E. Votočkovi, R. Lukešovi, F. Petrů, J. Hanušovi, V. Hovorkovi, R. Hecovi a F. Čůtovi, z oboru fyzikální chemie pouze o F. Waldovi, u metalurgické chemie jsou uvedeni J. Dušánek, O. Quadrát a J. Koritta, z barvářů J. Schneider a V. Křepelka, z technologů potravin J. Šatava, K. Anderlík, V. Konn, J. Bulíř a J. Lukas, z anorganických technologů J. Milbauer a A. Regner, dále tři silikátníci (J. Burian, R. Bárta a J. Staněk), tři organičtí technologové (C. Krauz, F. Šorm a V. Ettel), řada technologů paliv, vody a energetiky (F. Schulz, S. Landa, J. Mostecký, J. Hamáčková, M. Kohout, V. Maděra, F. Karas a R. Riedl), dva technologové polymerů (O. Wichterle a I. Franta), celá plejáda technologů potravin a konečně i přednášející matematiky, fyziky a chemického inženýrství (J. Bílek, E. Slavíček, H. Steidl a G. L. Standart). Čtenáři ať sami posoudí, zda výběr profesorů v knize uvedených, o nichž je pojednáno, je správný či tendenční. Škoda, že v knize nejsou hodnoceni docenti a asistenti, kteří mnohdy nesou tíži výuky. Např. pouze v jediné větě jsou zmíněni docenti Hála, Erdös a Reiser, jejichž zásluhy o kvalitní výuku fyzikální chemie jsou nepopíratelné. Příkladů podobného typu bych mohl uvést povícero.

V textové příloze recenzované knihy jsou studijní rozvrhy pro školní roky 1913/1914 a 1926/1927. Škoda, že podobný rozvrh není z novější doby, zejména z období existence VŠCHT. Podobně postrádám přehled posluchačů, absolventů a aspirantů za léta 1974 až 2000. V letech do sametové revoluce byla výuka ovlivněna politickými poměry: ze školy museli odejít výborní odborníci a pedagogové, příkladem budiž namátkou prof. Wichterle či docenti Hála, Erdös a další jiní. O této záležitosti je v knize téměř pomlčeno. Úroveň znalostí absolventů VŠCHT od 70. let kolísala, spíše se snižovala, což bylo dáno pokynem stranických orgánů snížit požadavky na studenty u zkoušek. Tomuto pokynu bohužel vedoucí kateder povětšinou podlehli.

Více než pětinu knihy tvoří obrazová příloha, jíž je galerie osobností, žánrové snímky, budovy a laboratoře, historické dokumenty aj. Podává pestrý obraz o historii školy.

Souhrnně konstatuji, že výpravná a po grafické stránce výborně udělaná kniha je pro VŠCHT především reprezentativním dílem. Dobře je zpracována stará historie. Pojmouti historii výuky chemie přes oslavné medailonky profesorů, které tvoří jádro knihy, je jistě možné, dovedu si však představit i jiný způsob podání.

I přes kritické výhrady doporučuji knihu čtenářům, hlavně žijícím absolventům VŠCHT. Vrátí se s ní do let mladosti, na kterou skoro každý rád vzpomíná.

J. Jindra

Wolfgang A. Herrmann (Ed.):
Synthetic Methods of Organometallic and Inorganic Chemistry. Volume 10 Catalysis
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2002. Stran 237, cena neuvedena, ISBN 3-13-115161-7.

Recenzovaný desátý díl známé série je zaměřen na využití komplexů přechodných kovů v organické katalýze. Navazuje tak svou problematikou na předchozí 3 svazky (vols. 7–9) které byly věnovány syntéze řady koordinačních sloučenin a nových ligandů, z nichž některé měly vztah k homogenní katalýze. Podnětem k rozšíření uvedené série byla podle redaktora (W. A. Herrmanna) nejen velmi příznivá odezva na předchozí svazky, ale i snaha v ní zachytit nedávný vývoj v oblasti koordinační katalýzy.

10. díl obsahuje 20 kapitol. Kromě úvodní kapitoly, pojednávající o amidových ligandech v koordinační chemii a kapitoly 20 věnované přípravě mono- a bimetalických koloidních katalyzátorů a jejich využití v oblasti kvalifikované chemie a palivových článků, jsou v dalších kapitolách shrnuty typické postupy přípravy řady katalyzátorů a využití ve vybraných, aplikačně perspektivních, resp. již průmyslově zavedených procesech. Jako příklad lze uvést hydroformylaci a hydroxykarbonylaci alkenů (kap. 2), hydroformylaci dienů a hydrosi-

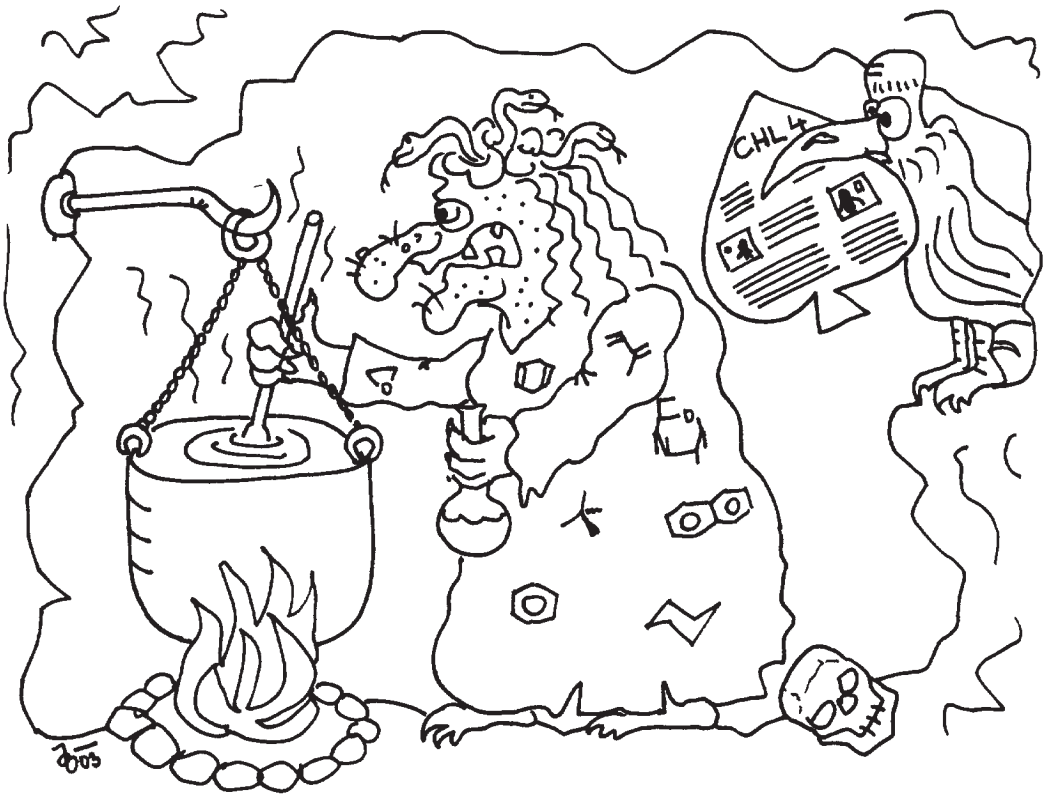
lylaci aromatických nitrilů (kap. 3), enantioselektivní hydrogenaci (kap. 5 a 6), oligomeraci ethylenu (kap. 16), polymeraci alkenů (kap. 14, 15 a 17) či kopolymeraci alkenů s oxidem uhelnatým a telomeraci butadienu s amoniakem (kap. 18 a 19). Z hlediska organické syntézy jsou cenné kapitoly věnované enantioselektivním syntézám (kap. 4), katalýze reakcí arylhalogenidů (kap. 8), Knoevenagelově kondenzaci (kap. 9) a Suzukiho reakci (kap. 7). V jedné z kapitol je pak souhrnně zpracována příprava oxorheniových komplexů a jejich využití při oxidaci alkenů a aromatických sloučenin a oxomolybdenových komplexů jako katalyzátorů epoxidace alkenů. Jak zdůraznil editor svazku, detailní pozornost této problematice byla věnována proto, že dosud nebyla v literatuře přehledně zpracována.

Přestože po formální stránce autoři zřejmě nemuseli striktně dodržovat již tradiční členění kapitol, výjimek lze nalézt jen několik. Každá z kapitol je doplněna velmi podrobným popisem syntézy uvedených sloučenin, důkladnou charakterizací jejich struktury a popisem jejich vlastností. Citace literatury zahrnující i práce publikované v r. 2001 potvrzují snahu autorů kapitol o maximální aktualizaci. Díl je opatřen přehledným věcným rejstříkem.

Je téměř zbytečné na tomto místě zdůrazňovat pro vydavatele již typickou vzornou grafickou úpravu jeho publikací.

Na závěr mohu vyslovit přesvědčení, že recenzovaný díl si nalezne cestu nejen do odborných knihoven vlastnících tuto sérii, ale i k odborníkům a výzkumným týmům zabývajícím se organickou syntézou, koordinační chemií či katalýzou.

J. Hetflejš



JARMARK CHEMIE, FYZIKY A MATEMATIKY

Již třetí ročník se uskuteční v pavilónu „A“ výstaviště Flora v Olomouci ve dnech 23.– 24.5.2003

Akce pořádaná pro děti a jejich rodiče k popularizaci mezi lidmi tolik nepopulárních oborů. Z připravovaného programu vybíráme:

- ✓ měření tvrdosti přinesené vody
- ✓ určení obsahu methanolu v tatínkově slivovici
- ✓ kontrola UV filtru v maminčiných slunečních brýlích
- ✓ chemie a fyzika v kuchyni
- ✓ matematické kvízy, hlavolamy a soutěže pro děti

Kontakt: Juraj Ševčík, Katedra ACH, Univerzita Palackého, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc
e-mail: sevcik@risc.upol.cz, web: http://www.upol.cz/ach/jarmark

Všichni, kteří by chtěli přispět nebo zúčastnit se pořádání, jsou srdečně vítáni.

Odborná skupina analytické toxikologie České společnosti chemické

a Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně

s Českou společností pro experimentální a klinickou farmakologii a toxikologii, toxikologická sekce

pořádají ve dnech **3.–5. září 2003** (5. září bude případně kurz)

8. mezioborovou česko-slovenskou toxikologickou konferenci

Témata: toxikologická analýza a metodické přístupy v toxikologii, průmyslová toxikologie, klinická toxikologie, aditiva v potravinách a nápojích – účinky a analýza, oxidativní stres, radikály a antioxidanty, toxicita léčiv, varia

Jednací jazyky: čeština, slovenština, angličtina (bez simultánního překladu). Příspěvky budou publikovány v Central European Journal of Public Health v plném znění (náklady pro účastníky zahrnuje vložné)

Vložné: úhrada do 30. května 2003 na účet OS analytická toxikologie ČSCH č.ú. 050016-1922952379/0800, Česká spořitelna, a.s. pobočka Praha 1, Václavské nám. 16

pro členy pořádajících organizací	400 Kč	ostatní	450 Kč
studenti a důchodci z pořádajících organizací . . .	300 Kč	po termínu (všichni) . . .	500 Kč

Informace: Miloň Tichý, SZÚ, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, fax: 267 312 236, e-mail: mtichy@szu.cz a sekretariát ČSCH fax: 222 220 184, e-mail: mblahova@csvts.cz