

Amorfizace a fragmentace času – a naše práce

(Post)moderní doba přinesla duševním pracovníkům mimo jiné i jeden zvláštní fenomén, ale tak pomalu a nenápadně, že si toho všimáme až s odstupem. Jde o změnu ve struktuře času. Zdá se mi, že rytmus dne, týdne i roku se od zhruba poloviny dvacátého století zcela proměnil, zejména v oblasti vědecké práce, a nejvíce v posledních deseti letech. Do značné míry za to může internet.

Velmi výstižným způsobem na to upozornil geolog Václav Cílek ve svém esejí Zabíli čas, parchanti, což je součástí jeho knihy Makom, kniha míst¹, kterou velmi doporučuji, je inspirativní. Ocituji z něj část:

„Drobení času je velké současné téma. Když jsem začínal pracovat ve stejném ústavu, kde pracuji dnes, mívával jsem ne-li celé dny, tak alespoň půldny na nějakou jednu činnost. Teď mám hodiny a někdy čas měřím na pracovní jednotky, které odpovídají zhruba dvaceti minutám. Přeskakuji z tématu na téma a stíhám čas. Nejblíže je tomuto vnucenému pojetí času videoklip – rychlé střihy, přeskok z diskursu do diskursu, nedostatek soustředění na jedno téma, na jednu prožitou věc.

O tom, jak se proměňuje čas, svědčí záměna psaní dopisů za psaní e-mailů. Od té doby, co mám elektronickou poštu, úraďuji déle. Dostávám víc dotazů a pozvánek. Mísí se mi svět soukromých vztahů a úředních přípisů..... Hranice soukromé a veřejné sféry jsou čím dál propustnější. Pracuji nepřetržitě a mezitím občas žiju. Stírá se mi pak hranice mezi kolegy a přáteli – na přátele mám méně času, ale část toho kamarádského pocitu dávám do pracovních vztahů.... neděle podobá se úterý.....“

Kdysi dávno byla struktura času posvátná, což do dnešního dne přežívá snad jen v klášterech, tedy rovněž centrech duševní (a duchovní) práce, jejichž čas byl a je během dne pevně určen sekvencí modliteb (od mattutiny po kompletář) a programem mezi nimi, během týdne pak známým sedmidenním rytmem s pevnými dny bohoslužeb, a během církevního roku pravidelnými svátky. I někteří duchovní však mají dnes problém s organizací času – nedivím se Tomáši Halíkovi, že se těšívá na svůj každoroční pobyt v poustevně na Rýně, kde může v klidu meditovat a psát.

Samozřejmě, v některých oborech je i v naší době pracovní den časově rozvržen velmi striktně, např. v montážních halách, ale jak je to s vědci v ústavech akademie a na vysokých školách? Musím souhlasit s Václavem Cílkem: Téměř veškerý rytmus, veškerá pravidelnost zmizela, setřely se časové hranice mezi soukromým a pracovním, a také se práce rozdrobila do menších časových fragmentů, což ztěžuje soustředění.

Když ráno přijdu do práce a zapnu počítač, podívám se samozřejmě do své mailové schránky. Objevím-li zprávu od kamaráda-kolegy, která obsahuje odpověď na můj odborný dotaz a zároveň povzdech, že jeho manželka onemocněla – je to mail služební nebo soukromý? Mám snad nejprve z práce okomentovat chemickou část a tu osobní až z domova? Mnoho lidí ani svou soukromou e-mailovou adresu nemá a na ústavním serveru se jim mísí zprávy soukromé, odborné i administrativní (administrativních mailů neuvěřitelně přibývá). Jestliže jsem nucen přes den vyřídit něco soukromého, často zůstávám v práci déle do večera. Spustím-li v laboratoři nějaký přístroj s nepřetržitým provozem, musím občas do práce i o víkendu kvůli kontrole. Jestliže někdy jdeme s kolegy-redaktory po zasedání na pivo, kde probíráme mj. i záležitosti redakční, je to práce nebo odpočinek? Vyprovázím-li zahraničního hosta našeho ústavu večer na koncert, přijde řeč na hudbu i na vědu, takže relaxuji i pracuji zároveň. Pamatují si, že v době, kdy jediným vnějším rušivým prvkem byl telefon, mohl jsem se, podobně jako V. Cílek, určitému problému soustředěně věnovat i řadu hodin v kuse – pokud je dnes taková práce, nesnášející vyrušení po několik hodin, nevyhnutelná, je nutno ji dlouho dopředu složitě zorganizovat.

Asi ten nedávný posun ve struktuře času známe všichni. Je to dobré nebo špatné? Spíše asi to druhé, vždyť má-li člověk obsáhnout určitý obor alespoň v přijatelné komplexnosti a koncepčnosti, měl by mít klid na soustředění. Prolínání pracovního a soukromého by jistě odsoudil také každý psycholog – je to proti pravidlům hygieny práce. (Ale k té fragmentaci času nutno dodat, že častější přesun od laboratorního stolu do pracovní k počítači přináší i jistou úlevu – přinejmenším pro ustáté nohy a pachem laboratoře nasycené plíce. A přesun zpět zase uleví páteři, bolavé od sezení ☺.)

Současná situace ve vědě není žádný izolovaný jev – je to součást celkového životního stylu společnosti. Je filozofickou otázkou, kde to neustálé zrychlování může skončit – zřejmě nějakou kvalitativní změnou. Přejme si, aby to nebyla změna příliš nepříznivá.

Jiří Podešva

LITERATURA

1. Cílek V.: *Makom, kniha míst*, str. 157. Dokořán, s.r.o., Praha 2004.

KATIONICKÉ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY

TEREZA NEUBAUEROVÁ^{a,b}, MARTINA
MACKOVÁ^{a,b}, TOMÁŠ MACEK^{a,b}
a BOHUMÍR KOUTEK^b

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

tereza.neubauerova@vscht.cz;

martina.mackova@vscht.cz; tom.macek@uochb.cas.cz;

bohimir.koutek@uochb.cas.cz

Došlo 3.7.08, přijato 16.1.09.

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, kationické peptidy, imunitní odezva, buněčná membrána, rezistence k antibiotikům

Obsah

1. Význam a historické aspekty antibiotik
2. Imunitní systém
 - 2.1. Imunitní systém hmyzu
 - 2.2. Signální kaskády – nástroje ovládající expresi indukovatelných antimikrobiálních peptidů
 - 2.3. Imunitní systém obratlovců
 - 2.4. Imunitní systém rostlin
3. Antimikrobiální peptidy
 - 3.1. Obecná kritéria pro působení antimikrobiálních peptidů
 - 3.2. Specifita a selektivní toxicita antimikrobiálních peptidů
 - 3.3. Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů
 - 3.4. Typy kationických antimikrobiálních peptidů
 - 3.4.1. Antimikrobiální proteiny
 - 3.4.2. Lineární peptidy
 - 3.4.3. Peptidy bohaté na cystein tvořící disulfidové můstky
 - 3.4.4. Posttranslační modifikace antimikrobiálních peptidů
 - 3.5. Použití antimikrobiálních peptidů

1. Význam a historické aspekty antibiotik

Objev penicilinu sirem Alexandrem Flemingem v roce 1929 znamenal velký průlom v boji proti infekcím. Od roku 1943 byl penicilin zařazen do klinické praxe a byla objevena řada antibiotik bakteriálního původu: baci-

tracin (*Bacillus subtilis*), streptomycin (*Streptomyces griseus*), chloramfenikol (*Streptomyces venezulae*), oxytetracyklin (*Streptomyces rimosus*), erythromycin (*Streptomyces erythreum*) a další¹. Jejich aktivita směřovaná proti patogenním mikroorganismům a jejich cílené využití v lékařství, zejména v chirurgii či chemoterapiích, prodloužilo průměrnou délku života o 8 let (cit.²).

Přes prvotní úspěchy antibiotik mělo jejich užití i negativní dopad. Díky adaptabilitě mikrobiálního a především bakteriálního genomu – vznik mutací a výměna plasmidů kódující rezistenci – reagovaly bakteriální kmeny tvorbou různých mechanismů, díky kterým se staly rezistentní na dostupná antibiotika^{2,3}. Nedůsledné až zbytečné používání antibiotik včetně jejich přidávání do krmiv hospodářských zvířat nežádoucí rozvoj mikrobiální rezistence urychlilo. Objev několika nových rodin antibiotik v posledních třiceti letech nedostatečně reagoval na nárůst rezistentních bakteriálních kmenů a infekční onemocnění začala opět představovat hrozbu⁴.

V roce 1940, ještě před uvedením penicilinu do klinické praxe, se objevily první rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* na penicilin. Byla připravena další beta-laktamová antibiotika, která byla zpočátku dobře účinná, avšak začátkem 60. let se objevily kmeny, které byly rezistentní i k těmto beta-laktamovým antibiotikům včetně methicilinu. V 70. letech se kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentní k methicilinu (MRSA) staly po celém světě hlavní příčinou nosokomiálních infekcí. Zastoupení rezistentních kmenů MRSA v ČR vzrostl mezi roky 2000 až 2005 ze 4,3 % na 12,9 % (cit.⁵). Na tyto kmeny dosud účinně působí pouze vankomycin, ale v roce 1997 byly izolovány i první kmeny vykazující rezistenci vůči vankomycinu⁶. Podobně krizová situace je např. i u bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, která způsobuje tuberkulózu. Následkem její multirezistence vůči antibiotikům a chemoterapeutikům se odhaduje, že každý desátý případ plicní tuberkulózy je smrtelný. Častá tvorba multirezistentní je spojena s nosokomiálními infekcemi, které postihují zejména pacienty s oslabenou imunitou.

V současné době výroba antibiotik představuje jedno z největších odvětví farmaceutického průmyslu, ale mnoho nových typů antibiotik nepřibývá⁷. Hledání látek s novým mechanismem účinku obrátilo pozornost k nejstarším obranným mechanismům – kationickým peptidům.

2. Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismů. Jeho funkcí je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává potenciální patogeny od hostitelských buněk. Imunitní systém se obecně skládá z odvětvých nespecifických kaskád a reakcí a evolučně

mladších, specifických mechanismů (T- a B- lymfocyty – tzv. buňky s pamětí). Pouze u obratlovců byly pozorovány oba typy imunity, přesto miliony let staré mechanismy nespecifické imunity časem vytvořily efektivní formu obrany imunitního systému a daly možnost rostlinám a bezobratlým, v čele s nejpocetnější a nejrozšířenější třídou zahrnující hmyz, stát se evolučně nejúspěšnějšími skupinami na Zemi (třída – hmyz: 1 milion druhů a 10^{18} jedinců). Důraz je při nespecifických imunitních reakcích věnován hbité a dlouhotrvající odpovědi. Neadaptivní imunitní systémy rostlin a bezobratlých jsou v určitých základních rysech shodné s neadaptivní částí imunity u obratlovců⁸.

2.1. Imunitní systém hmyzu

Nejvíce prostudovaný obranný mechanismus přirozené imunity hmyzu byl popsán u octomilky *Drosophila melanogaster*. Prvotní bariérou tvořenou vnější kutikulou a epitelem trávicí soustavy je náročné proniknout, některé mikroorganismy narušují kutikulu tvorbou a působením enzymu chitinasy. Poranění kutikuly aktivuje iniciační enzym proteolytické kaskády, jež katalyzuje přeměnu profenoloxidasu na fenoloxidasu. Dále tento enzym katalyzuje oxidaci fenolických sloučenin s následnou polymerací a tvorbou černého pigmentu melaninu⁹.

Po proniknutí do těla hmyzu jsou mikroorganismy vystaveny působení imunitní odpovědi na humorální a buněčné úrovni. Humorální odpověď způsobuje rychlou produkci antimikrobiálních peptidů, přičemž některé jsou přítomny i konstitutivně, a reaktivních sloučenin kyslíku. Tyto peptidy jsou produkovány převážně tukovým tělískem, funkčním ekvivalentem savčích jater, a jsou sekretovány do hemolymfy, kde jejich koncentrace může dosáhnout až $100 \mu\text{mol l}^{-1}$.

Genom octomilky kóduje minimálně 34 antimikrobiálních peptidů, mezi které patří peptidy se širokým spektrem účinku, například cecropiny (gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, houby), nebo úzkospektré: na glycin bohaté attaciny (gram-negativní bakterie), drosomycin (houby). Tvorba těchto peptidů reaguje na typ patogenu (gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, houby) v těle hmyzu¹⁰.

Imunitní odpověď na buněčné úrovni je zprostředkována také hemocyty – krevními buňkami, které cirkulují v hemolymfě. Hemocyty dělíme podle morfologie na plasmatocyty (fagocytující), lamellocyty (tvorba větších kapsulí), a krystalové buňky (obsahující fenoloxidasu a podílející se na proteolytické kaskádě)¹⁰.

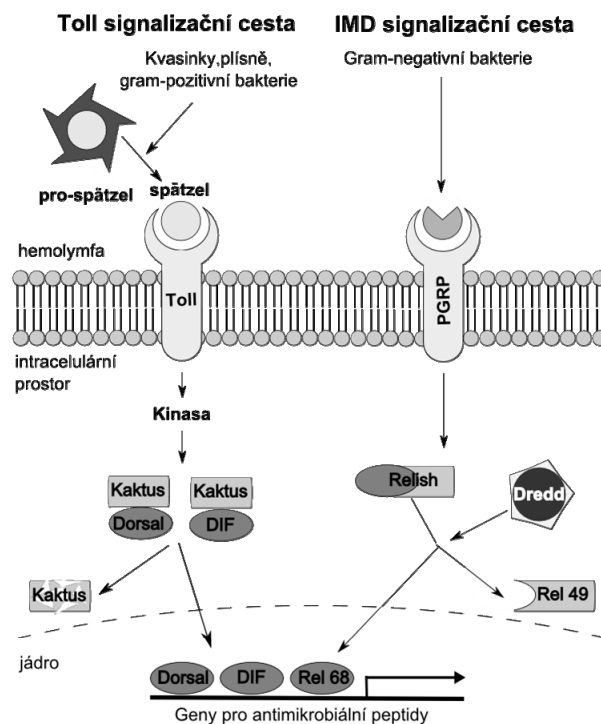
Vymezit hranice mezi humorální a buněčnou imunitou není snadné. Některé humorální faktory ovlivňují funkci hemocytů, které jsou zároveň zdrojem antimikrobiálních peptidů.

2.2. Signalizační kaskády – nástroje ovládající expresi indukovatelných antimikrobiálních peptidů

Po aseptickém poranění kutikuly jsou v hemolymfě přítomny vedle konstitutivních antimikrobiálních peptidů i indukované antimikrobiální peptidy s různým účinkem. Tvorbu těchto indukčních antimikrobiálních peptidů aktivují dvě signalizační cesty Toll a IMD (obr. 1)¹¹.

Toll signalizační dráha byla paralelně identifikována u savců i u octomilky *Drosophila melanogaster*¹², dále také u rostlin a ostatních živočichů (homologie se savčími „Toll-like-receptory“)¹³. Toll signalizační kaskáda je aktivována gram-pozitivními bakteriemi a houbami. Ligand „spätzle“, který je štěpený serinovými proteasami, se naváže na Toll membránový receptor a aktivuje tak signalizační kaskádu. Výsledkem kaskády je fosforylace a následná degradace „Kaktusu“ a uvolnění transkripčního faktoru „DIF/Dorsal“ a jeho translokace do jádra, kde se spustí transkripce genu specifického antimikrobiálního peptidu. U drosofilů tato cesta reguluje geny odpovědné za expresi antimikrobiálních peptidů účinným proti houbám a gram-pozitivním bakteriím¹². Hlavními zástupci peptidových rodin vznikajících touto kaskádou jsou defensin účinný proti gram-pozitivním bakteriím, drosomycin a metchnikowin, které jsou účinné proti houbám¹¹.

Odpověď na infekci způsobenou gram-negativními bakteriemi je kontrolována odlišnou cestou. IMD cesta se



Obr. 1. Schéma signalizačních drah Toll a Imd u octomilky; převzato a upraveno z cit.⁴³

podobá savčí TNF- α dráze a je zakončena expresí peptidů antimikrobiálních peptidových rodin jako je attacin, cecropin, drosocin a diptericin, které prokazují značnou účinnost proti gram-negativním bakteriím. IMD cesta je zahájena aktivací peptidoglykanového rozpoznávacího proteinu (PGRP), který reaguje na složku obsaženou v bakteriální stěně gram-negativních bakterií a aktivuje tak signalizační kaskádu. Výsledkem kaskády je štěpení pretranskripčního faktoru označovaného „Relish“ kaspasou pojmenovanou „Dredd“ za uvolnění transkripčního faktoru „Rel-68“. Tento faktor je translokován do jádra, kde aktivuje transkripci výše uvedených peptidů¹⁴.

2.3. Imunitní systém obratlovců

Expresí antimikrobiálních peptidů β -defensinů v epitelových buňkách dýchacího ústrojí u skotu je stimulována lipopolysacharidy (LPS), interleukinem-1 β (IL-1 β) a tumor nekrotizujícím faktorem (TNF). Další analýzy 5'-koncových regionů indukovatelných epitelových antimikrobiálních peptidů ze savců a žab odhalily vazebné místo NK κ B, analog transkripčních faktorů u hmyzu (DIF, Dorsal a Rel). Jako odpověď na infekci klesá intracelulární úroveň NK κ B, který je translokován do jádra a dochází k aktivaci genu pro příslušný antimikrobiální peptid. Receptor pro IL-1 β (IL-1R) je strukturně blízký příbuzný receptoru Toll a spolu se signalizační kaskádou a transkripčním faktorem NK κ B tvoří signalizační dráhu podobnou Toll signalizační dráze u hmyzu. U savců jsou IL-1 vylučovány monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami a poraněnými epitelovými buňkami. Objevení funkce Toll a Toll-podobných receptorů (TLRs) při expresi genů pro antimikrobiální peptidy u hmyzu a savců vedlo ke snaze hledat další homologní struktury u člověka. Pozdější studie prokázaly, že u člověka se vyskytuje nejméně deset těchto genů (TLRs). Současné experimenty prokázaly vazbu LPS přímo na TLRs (cit.¹³).

2.4. Imunitní systém rostlin

Rostliny, stejně jako živočichové, exprimují antimikrobiální peptidy jako defensiny a thioniny konstitutivně a jako odpověď na mikrobiální útok. Prvotní vazby jsou zprostředkovány specifickými receptory podobné Toll a Toll-podobných receptorům (TIR-ND-LRR). Ty aktivují specifickou odpověď proti specifickému organismu, tento systém obrany u rostlin byl nazván „gene for gene“ strategií^{12,15,16}.

3. Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiálních peptidů existuje několik druhů – kationické, anionické (enkelytin, dermcidin), aromatické dipeptidy (*N*- β -alanyl-5-*S*-glutathionyl-3,4-dihydroxy-fenylalanin) a deriváty proteinů vážící kyslík (deriváty hemokyaninu a hemoglobinu, laktoferrin). Nejpočetnější

skupinou z nich jsou kationické peptidy, jež zároveň vykazují mnohonásobně vyšší aktivitu než ostatní druhy. Dosud jich bylo charakterizováno přes 700 a více než polovina jich byla izolována z hmyzu¹⁷.

3.1. Obecná kritéria pro působení antimikrobiálních peptidů

Nezbytnými parametry antimikrobiálních peptidů pro jejich působení jsou konformace, náboj, hydrofobicita, hydrofobní moment, amfipaticita a polární úhel. Je důležité zdůraznit, že tato kritéria jsou v rovnováze a navzájem na sobě závislá, změna jednoho je obvykle kompenzována změnou ostatních. Extrémní odchylky v těchto vlastnostech mohou vést ke snížení antimikrobiální aktivity a selektivní toxicity¹⁴. Prakticky všechny antibakteriální peptidy tvoří při vazbě na membránu amfipatické struktury, nejčastější strukturou je α -helix¹⁸.

Kationické antimikrobiální peptidy obsahují méně než 50 aminokyselin. Díky přítomnosti aminokyselin lysinu a nebo argininu je jejich celkový náboj od +2 do +10 (cit.¹⁹). Minimální množství kladného náboje pro interakci peptidu s membránou patogenu, která je nabitá záporně, je právě +2. Nižší hodnoty již nejsou dostatečné pro signifikantní selektivitu k mikroorganismům. Zvyšování kladného náboje antimikrobiálních peptidů záměnou aminokyselin může v určitém rozsahu zvýšit jejich antimikrobiální účinky²⁰. Někdy však může zvýšení kladného náboje naopak plně potlačit antibakteriální aktivitu a zvýšit např. hemolytické účinky namířené proti hostitelským buňkám²⁰.

Hydrofobicita, která je dána procentem hydrofobních aminokyselin v peptidovém řetězci, se většinou pohybuje kolem 50 %. Přestože je nezbytná pro efektivní membránovou permeabilizaci, zvyšování hydrofobicity silně koreluje s toxicitou vůči savčím buňkám a ztrátou specifity vůči buňkám mikrobiálním²¹.

Polární úhel vyjadřuje prostorové uspořádání hydrofobních a hydrofilních aminokyselin, které tvoří domény kooperujících na permeabilizaci membrány. Polární úhel se také ukázal být v úzkém vztahu s celkovou stabilitou a poločasem rozpadu membránových pórů indukovaného přítomností peptidů^{20,22}.

3.2. Specifita a selektivní toxicita antimikrobiálních peptidů

Působení peptidu proti bakteriálním infekcím chrání hostitele, a proto je kladen důraz na selektivní působení antimikrobiálních peptidů pouze proti patogenům, především bakteriím. Toto rozpoznání umožňují rozdíly ve struktuře, složení a transmembránovém potenciálu mezi bakteriální a eukaryotní membránou.

Všechny biologické membrány jsou tvořeny fluidní mozaikou tvořenou fosfolipidy. Fosfolipidy jsou amfipatické povahy, to znamená že v rámci molekuly obsahují současně hydrofobní i hydrofilní část. Bakterie jsou navíc obaleny buněčnou stěnou, jejíž složení se liší u gram-

Tabulka I
Vybrané kationické peptidy a proteiny¹⁷

Struktura a zástupci peptidů	Výskyt	Antimikrobiální aktivita
<i>Antimikrobiální proteiny</i>		
BPI protein	člověk	bakterie
Kathepsin G	člověk	bakterie
<i>Lineární peptidy tvořící α-helix</i>		
Cekropin	hmyz, prase	bakterie, mikroskopické vláknité houby, viry, protozoa, metazoa
Klavanin, styelin	pláštěnci	bakterie
Magainin, dermaseptin	obojživelníci	bakterie, protozoa
Buforiny	obojživelníci	bakterie, mikroskopické vláknité houby
<i>Lineární peptidy obohacené určité aminokyselinou</i>		
Bohaté na prolin:		
Drosocin, metchnikowiny	octomilka	bakterie
Pyrrhocoricin, metalnikowin	blanokřídli	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Bohaté na glycin:		
Diptericiny, attaciny	dvojkřídli	bakterie
Bohaté na histidin:		
Histatin	člověk	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Bohaté na tryptofan:		
Indolicin	kráva	bakterie
<i>Peptidy s jednou disulfidovou vazbou</i>		
Thanatin	blanokřídli	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Brevininy	žába	bakterie
<i>Peptidy se dvěma disulfidovými vazbami</i>		
Tachyplesin II	krab trnitý	bakterie, mikroskopické vláknité houby, viry
Androctonin	škorpión	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Protegrin I	prase	bakterie, mikroskopické vláknité houby, viry
<i>Peptidy se třemi disulfidovými vazbami</i>		
α -Defensiny	savci	bakterie, mikroskopické vláknité houby
β -Defensiny	savci	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Defensiny	hmyz	bakterie, mikroskopické vláknité houby, protozoa
<i>Peptidy s více disulfidovými vazbami</i>		
Tachycitin	krab trnitý	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Drosomycin	octomilka	mikroskopické vláknité houby
Helioomicin	blanokřídli	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Defensiny	rostliny	mikroskopické vláknité houby

pozitivních, gram-negativních bakterií a hub.

Membrány bakterií jsou bohaté na fosfolipidy (fosfatidylglycerol, fosfatidylserin a kardiolipin) a spolu s dalšími složkami bakteriální stěny (glykolipidy, lipoproteiny a u gram-negativních jsou to navíc lipopolysacharidy) vytvářejí negativní náboj. Naproti tomu fosfolipidová dvojrůstava vyšších živočichů obsahuje ve velké míře obo-

jetné ionty fosfatidylethanolaminu, fosfatidylcholinu, sfingomyelinu a molekuly cholesterolu, které udávají membráně náboj neutrální. Rozdílná distribuce jednotlivých molekul ve vnitřní a vnější straně membrány vytváří nábojovou asymetrii, vedoucí k tvorbě transmembránového potenciálu ($\Delta\Psi$). Například normální savčí buňka vykazu-

je $\Delta\psi$ -90 až -110 mV. U bakteriálních patogenů v logaritmické fázi růstu je $\Delta\psi$ -130 až -150 mV. Hodnota transmembránového potenciálu je důležitým faktorem pro elektrostatické přiblížení kationického peptidu k membráně²⁰.

3.3. Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů

Prvním krokem při působení antimikrobiálních peptidů je přiblížení a interakce s membránou. Důvodem migrace k bakteriální membráně jsou elektrostatické interakce a membránový potenciál. Následuje několik možností narušení buněčné membrány – fatální depolarizace membrány, vytváření selektivních kanálů nebo „děr“ a ztráta buněčného obsahu, aktivace destruktivních procesů, jež zahrnuje aktivaci hydrolas buněčné stěny, narušení funkce membrány translokací lipidů – a nakonec průnik některých peptidů až k intramolekulárnímu cíli¹³.

Peptidy, které narušují celistvost biomembrán, jsou převážně ze skupiny α -helikálních peptidů²³. Tvorba iontově selektivních kanálů může vést ke ztrátě transmembránového potenciálu, a tedy ztrátě energetické funkce bio-

membrány. Větší „díry“ mohou vést ke ztrátě životně důležitých látek a způsobují smrt. Včlenění antimikrobiálních peptidů paralelně s dvojvrstvou, mezi hydrofobní a hydrofilní část, vytváří místo, kde se následně agregují další molekuly peptidu. Po dosažení kritické koncentrace se peptidy reorientují za tvorby vodivých kanálů, které umožňují únik protonů a jiných iontů, popřípadě větších molekul (princip mechanismů vzniku sudové skruže, např. magainin²⁰). Poněkud odlišný je tzv. kobercový mechanismus, kdy dochází k agregaci peptidů vně membrány a po dosažení kritické koncentrace dochází ke vzniku toroidního póru nebo micelizaci a prolomení membrány, tento mechanismus vykazují např. sapeciny²⁴ (obr. 2).

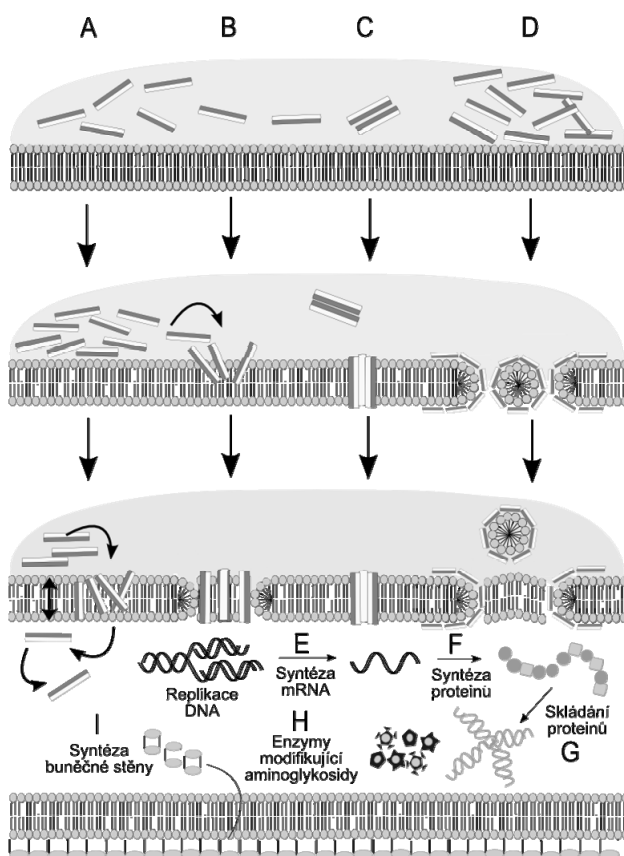
Některé antimikrobiální peptidy jsou však translokovány membránou bez jejího zřetelného narušení. Uvnitř buňky způsobují např. inhibici cytoplasmatického „heat-shock“ chaperonu DnaK (pyrrhocoricin, apidaecin a drosocin)²⁵. Některé peptidy silně narušují syntézu DNA a inhibují syntézu RNA a proteinů nebo způsobují jejich nesprávnou translaci (indolicin)¹⁹.

3.4. Typy kationických antimikrobiálních peptidů

Kationické peptidy rozdělujeme na základě struktur a převažujících motivů do čtyř základních tříd: *i*) antimikrobiální proteiny (mají přes 100 aminokyselin), *ii*) lineární peptidy s α -helikálními doménami (asi 290 aminokyselin), *iii*) lineární peptidy se zvýšeným obsahem dané aminokyseliny (asi 44 aminokyselin), *iv*) cyklické peptidy obsahující disulfidové vazby (asi 380 aminokyselin). Pro klasifikaci antimikrobiálních peptidů bakteriálního původu a nedávno nalezených peptidů u rostlin a živočichů byly navíc vyčleněny tyto třídy: *v*) peptidy bez disulfidických můstků, *vi*) peptidy s cyklickou strukturou, *vii*) kovalentně vázané dimery^{26,27}.

3.4.1. Antimikrobiální proteiny

Tyto proteiny jsou produkovány různorodými organismy v různém kontextu. Savčí krevní buňky jsou bohaté na tyto proteiny. Vedle lysozimu jsou zde obsaženy serprocidiny, kathepsin G, laktoferrin a protein BPI. BPI je vysoce kationický protein (55 kDa) s aktivitou zaměřenou proti gram-negativním bakteriím, váže se na lipopolysacharidy buněčné stěny a způsobuje poškození buněčné membrány. Z hmyzu bylo izolováno několik polypeptidů (20–30 kDa) aktivitou zaměřených proti gram-negativním bakteriím – attaciny a sarkotoxiny II. Attaciny se váží k lipopolysacharidům v buněčné stěně gram-negativních bakterií a inhibují syntézu membránových proteinů. Pro strukturu attacinů a sarkotoxinů II je typický vysoký obsah glycinu. Různé druhy plžů produkují antimikrobiální glykoproteiny achacinové rodiny, které jsou aktivní proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím. Z rostlin byly izolovány puroindoliny a thaumatinu podobné proteiny (např. zeamatin, 20 kDa). Bakterie produkují antimikrobiální proteiny pro potlačení růstu jiných bakteriálních kmenů, působí na membránovou permeabilitu a interferují se syntézou proteinů nebo nukleových kyselin. Gram-



Obr. 2. Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů; A – agregační model, B – model toroidního póru, C – model sudové skruže, D – kobercový model, E–H mechanismy působení antimikrobiálních peptidů, převzato a upraveno z cit.⁴⁴

Tabulka II
Vybrané nekationické peptidy¹⁷

Struktura a zástupci peptidů	Výskyt	Antimikrobiální aktivita
<i>Anionické peptidy</i>		
Deriváty neuropeptidu:		
Enkelytin	kráva, člověk	bakterie
Peptid B	kráva, člověk, pijavice, mušle	bakterie
Bohaté na kyselinu asparagovou:		
H-GDDDDDD-OH	ovce	bakterie
Dermicin	člověk	bakterie
<i>Aromatické dipeptidy</i>		
<i>N</i> -β-Alanyl-5- <i>S</i> -glutathionyl-3,4-dihydroxyfenylalanin	masařka	bakterie, mikroskopické vláknité houby
<i>p</i> -Hydroxycinnamaldehyd	blanokřídli-širopasí	bakterie, mikroskopické vláknité houby
<i>Peptidy odvozené od proteinů vážící kyslík</i>		
Deriváty hemokyaninu	kreveta	bakterie
Deriváty hemoglobinu	klíště	bakterie
Lactoferin	člověk	bakterie, mikroskopické vláknité houby, viry

negativní kmeny produkují koliciny s molekulovou hmotností 30–90 kDa a gram-pozitivní kmeny produkují druhy bakteriocinů (přes 20 aminokyselin)²⁶.

3.4.2. Lineární peptidy

Tato třída zahrnuje antimikrobiální peptidy s méně než 100 aminokyselinami. V databázích těchto peptidů zabírají asi polovinu. Nejpočetnější skupinu tvoří peptidy s amfipatickou, α-helikální strukturou (asi 300 peptidů).

Lineární amfipatické peptidy tvořící α-helixy

Délka řetězce těchto peptidů se pohybuje mezi 16 a 40 aminokyselinami. α-Helikální domény se vyskytují většinou na N-konci a u některých peptidů jsou i amidované. Vedle těchto struktur jsou přítomny i sekundární α-helikální domény, smyčky nebo malé cyklické motivy. Přítomnost α-helikálních domén je nezbytná pro antimikrobiální účinek, kterým je permeabilizace buněčné membrány za pomoci nespécifických interakcí s membránovými fosfolipidy. Některé z těchto peptidů jsou specifické proti bakteriím, ale některé se vyznačují i hemolytickým působením na erytrocyty²⁶.

Zástupcem této třídy jsou cekropiny – skupina lineárních peptidů o molekulové hmotnosti 3–4 kDa, tvořících dva α-helikální segmenty (silně bazická N-terminální doména a dlouhý hydrofóbní C-terminální helix), které jsou spojeny krátkou „stopkou“. První cekropin byl charakterizován v 80. letech 20. století u motýla *Hyalophora cecropia*.

Další molekulou patřící mezi tyto peptidy je magainin izolovaný z kůže žáby *Xenopus laevis*. Relativně novou skupinou těchto kationických peptidů jsou buforiny (2 až 4 kDa) izolované z rybího epitelu, strukturně jsou podobné

cekropinům. Cekropiny, magaininy a buforiny působí na širokou škálu bakterií, houby a parazity¹⁷. U savců včetně člověka byly izolovány α-helikální antimikrobiální peptidy patřící do rodiny katelicidinů, jsou produkovány hlavně fagocyty. Spektrum jejich účinku je stejné jako u cekropinů^{28,29}.

Krátké lineární peptidy

Žáby rodu *Rana* produkují lineární antimikrobiální peptidy, které patří mezi nejmenší v přírodě. Jedná se o temporiny s 13 aminokyselinami, amidovaným C-koncem, vykazující aktivitu proti některým gram-pozitivním bakteriím a kvasinkám. Jiný rod žab *Bombina* produkuje peptidy bombininy čítající 20 aminokyselin s širokým spektrem účinku. Obě tyto peptidové rodiny vykazují hemolytickou aktivitu²⁸.

Peptidy bohaté na prolin

Tyto peptidy byly nalezeny jak u savců, tak u hmyzu. Vedle aminokyseliny prolin je také hodně zastoupen arginin jako bazická aminokyselina. Antimikrobiální aktivita je zaměřena proti gram-negativním bakteriím a není doprovázena hemolytickým působením. Vedle rozrušení bakteriálních membrán působí i na intracelulární cíle. Savčí peptidy patří do rodiny katelicidinů (bakteneccin, porcín PR-39 a profeniny) a mají 40 až 80 zbytků. Téměř všechny jsou amidovány na C-konci.

Několik těchto peptidů bylo izolováno z hmyzu a můžeme je rozdělit podle délky řetězce na krátké a dlouhé. Krátké mají 15 až 20 zbytků a zahrnují apidaeciny, formaeciny, drosocin, pyrrokoricin a metalnikowniny. Apidaeciny a metalnikowniny působí proti gram-

negativním bakteriím, avšak mechanismus účinku je pomalejší než u α -helikálních peptidů a defensinů. Antimikrobiální aktivitu ovlivňují optické vlastnosti aminokyselin. Průnik do buňky je totiž uskutečňován specifickými transportními mechanismy a ne vznikem nesespecifických pórů. Hlavními intracelulárními cíly jsou například „heat-shock“ proteiny. Dlouhé hmyzí peptidy bohaté na prolin zahrnují abaeciny, lebeciny a metchnikowin. Drosocin, pyrrhokoricin, formaeciny a lebeciny jsou *O*-glykosylované a byl prokázán vliv glykosylace na antimikrobiální aktivitu^{26,30}.

Peptidy bohaté na glycin

Tyto peptidy jsou produkovány pouze hmyzem a můžeme je rozdělit do tří skupin: peptidy s doménou podobnou attacinu, peptidy bohaté na Pro/Gly a peptidy bohaté na His/Gly. Do první skupiny patří hymenoptaeciny, holotricin 2, koleoptericy, hemiptericin, gloverininy a akaloleptiny a jejich aktivita je zaměřena proti gram-negativním bakteriím. U gloverinu byla objevena interakce s membránovými lipopolysacharidy a následná inhibice syntézy membránových proteinů. Diptericy je zástupcem druhé skupiny, jeho N-doména je bohatá na aminokyselinu prolin a C-doména na aminokyselinu glycin. U diptericy A bylo prokázáno, že glykosylace nemá vliv na aktivitu. Do třetí skupiny řadíme tři antifungální peptidy: holotricin 3, tenecin 3 a antifungální protein z masařky (*Sarcophaga peregrina*). Obsahují 67 až 84 aminokyselinových zbytků. Antifungální protein z masařky vykazuje synergismus se sarkotoxinem I izolovaným z téhož organismu²⁶.

Peptidy bohaté na histidin

Tyto peptidy s velkým zastoupením aminokyseliny histidin byly izolovány ze slin lidí a primátů a nazývají se histatiny¹⁷. Jejich aktivita je namířena proti kvasinkám a plísním. Tyto peptidy po průniku do buňky napadají mitochondrie. Působí i na azol-rezistentní kvasinky a plísně a vykazují nízkou toxicitu, což z nich dělá skvělé kandidáty na chemoterapeutika²⁶.

Peptidy bohaté na tryptofan

Dosud jsou známy pouze dva takové peptidy a to indolicin a tritrypticin. Mají široké spektrum účinku: gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, plísně, kvasinky a dokonce i obalený virus HIV. Nevýhodou z hlediska potenciálního využití jsou hemolytické a cytotoxické působení proti T-lymfocytům.

3.4.3. Peptidy bohaté na cystein tvořící disulfidové můstky

Téměř polovina všech antimikrobiálních peptidů v databázích obsahuje dva nebo více cysteinových aminokyselin, které často tvoří disulfidové můstky. Jsou produkovány různými druhy bakterií, plísní, rostlin, obratlovců i bezobratlými živočichy.

Peptidy se dvěma nebo čtyřmi cysteiny

Tyto peptidy tvoří vláseňkové struktury nebo tzv. „ranaboxy“. Disulfidové můstky stabilizují strukturu. Tyto peptidy jsou produkovány savci, bezobratlými, rostlinami,

a i gram-pozitivními mléčnými bakteriemi²⁶.

Žába rodu *Rana* produkuje tyto peptidy: brevininy, eskuletiny a tigerinin. Brevininy a eskuletiny obsahují amfipatické α -helikální struktury končící motivem „ranaboxy“. Podobný cyklický motiv byl objeven i u hmyzího thanatinu. Tyto peptidy působí proti bakteriím i kvasinkám a plísním membranolýtickým mechanismem a vykazují i hemolytickou aktivitu.

Savčí peptid protegrin obsahuje čtyři cysteinové zbytky. Působí jako dimer na širokou škálu i běžně rezistentních patogenů.

V rostlinách nebyly nalezeny peptidy s jednou disulfidovou vazbou, ale jen se dvěma.

Peptidy se šesti a více cysteiny

Tyto peptidy jsou rozšířeny zejména u eukaryotních organismů. Struktura je stabilizována vznikem β -struktur, ale není vyloučena i přítomnost α -helixu. Tyto peptidy jsou souhrně nazývány defensiny. Tři druhy defensinů (α -, β - a θ -) se vyskytují u obratlovců včetně člověka, čtvrtý druh u rostlin a pátý u hmyzu. α -Defensiny mají 29 až 35 aminokyselin se třemi disulfidovými můstky. Lidské α -defensiny mají pozice disulfidových můstků konzervované, doposud jich u člověka bylo identifikováno šest druhů³¹. Jsou produkovány neutrofily. Jejich struktura se skládá z C-koncové vláseňky spojené smyčkou ke třetímu N-koncovému β -listu. β -Defensiny mají podobnou strukturu jako α -defensiny, jen se liší v aminokyselinovém složení. Jsou to širokospektrální antimikrobiální peptidy vyznačující se expresí v různých tkáních (epitely dutiny ústní, horních cest dýchacích, ledviny, slinivka břišní, močové cesty a ženské pohlavní orgány), kde potlačují spolu s přirozenou mikroflórou různé infekce. Již u čtyř lidských β -defensinů (hBD-1 až 4) byly exprese a funkce již dobře popsány, avšak studium genomu předpokládá existenci dalších 28 nových lidských β -defensinů³². Dalším peptidem, jež obsahuje vysoký obsah cysteinů, je hepcidin, který obsahuje 24 aminokyselin, z nich osm cysteinů, které tvoří disulfidové můstky. Lidská játra produkuje tento antimikrobiální peptid do moči. Analoga byla nalezena u všech živočichů, u bezobratlých jsou tyto na cystein bohaté peptidy produkovány tukovým tělískem³³.

Velký počet defensinů byl objeven u hmyzu, a jejich homology byly nalezeny u jiných bezobratlých (škorpión). Tyto peptidy jsou dlouhé 33–51 aminokyselin a působí na cytoplasmu gram-pozitivních bakterií. Tím doplňují roli α -helikálních hmyzích peptidů, které působí proti gram-negativním bakteriím. U defensinů blanokřídých (včela medonosná) byl C-koncový α -helix amidovaný. Další peptid podobný hmyzím defensinům produkuje octomilka *Drosophila melanogaster* a nazývá se drosomycin. Vedle β -struktur a α -helixu jsou C- a N-konce spojeny čtyřmi disulfidovými můstky, antimikrobiální aktivita byla zaznamenána pouze proti mikroskopickým vláknitým houbám.

Dále k antimikrobiálním peptidům s vysokým počtem cysteinových zbytků řadíme mytiliny a myticiny z mušle, illuciny produkované plísní *Rhizomucor pusillus* či anti-

fungální protein plísně *Aspergillus giganteus* nebo tachypleusiny a tachypleusiny klepítkatce *Tachypleus tridentatus*³⁶.

V roce 1999 byla definována nová skupina cyklických peptidů se třemi disulfidovými můstky a β -listy označená cyklotidy. Poprvé byly izolované z rostlin, dále i z bakterií a živočichů. Mají široké spektrum biologických aktivit: hemolytické, antimikrobiální, antivirové, insekticidní, jsou také inhibitory neurotensinu a trypsinů³⁴.

Z rostlin byl dále izolován peptid snak-in-1, který obsahuje 63 aminokyselin, z toho 12 cysteinů, jež mohou tvořit až 6 disulfidových můstků a stabilizovat tak strukturu. Již v koncentraci pod 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ je aktivní proti bakteriálnímu a fungálnímu infekcím³⁵.

Peptidy s kovalentně vázanými dimery

Některé antimikrobiální peptidy bakteriálního původu obsahují i jiné kovalentní vazby než disulfidovou. Například lantibiotika, patří mezi bakteriociny, tvoří můstky díky přítomnosti aminokyseliny lanthioninu (je tvořena dvěma zbytky alaninu propojenými přes β -uhlík thioetherovou vazbou). Lantibiotika působí na membránu gram-pozitivních bakterií, jejich zástupci jsou nisin a mersacidin^{26,36}.

3.4.4. Posttranslační modifikace antimikrobiálních peptidů

Nejběžnější formou posttranslační modifikace u antimikrobiálních peptidů a proteinů je tvorba disulfidových můstků. Ty jsou nezbytné pro správné uspořádání popřípadě dimerizaci peptidů, což má ve většině případů, ale ne ve všech, vliv na biologickou aktivitu. Dalším druhem modifikací jsou glykosylace. Asi třetina peptidů v databázích je glykosylována. Přítomnost cukru není nezbytná pro antimikrobiální aktivitu, avšak v mnoha případech glykosylace tuto aktivitu zvyšuje. Experimenty s glykosylovanými a neglykosylovanými peptidy a různými bakteriálními kmeny však prokázaly, že není souvislost mezi vlivem glykosylace a mechanismem účinku^{26,37}. Studie drosocinu pomocí NMR spektroskopie prokazuje, že disacharid otevírá těsné seřízení centrálního ohybu peptidové páteře, díky níž dochází ke stabilizaci C-koncového ohybu a lepší vazbě na cílovou molekulu³⁸.

Také amidace C-konce, která se často vyskytuje u antimikrobiálních peptidů, zvyšuje antimikrobiální potenciál díky zvýšení kationicity.

3.5. Použití antimikrobiálních peptidů

Spektrum působení antimikrobiálních peptidů je velice široké a zahrnuje i řadu mikroorganismů rezistentních proti dostupným antibiotikům. Navrhované aplikace těchto antimikrobiálních peptidů zahrnují léčbu, popřípadě prevenci, systémických bakteriálních, kvasinkových a virových infekcí, ale i onemocnění způsobených parazity. Bylo prokázáno i působení na rakovinné buňky. Využití je dále zaměřeno proti patogenům ohrožující pacienty s cystickou fibrózou (kathelicidin), žaludečními vředy, kožními nádory, onemocněním dutiny ústní, očními choro-

bami, sexuálně přenosnými nemocemi a sepsí. Také se uvažuje o použití těchto peptidů v oblasti genových terapií, pro sterilizaci nemocničního a chirurgického materiálu, produkci sterilních obzavových materiálů, pro použití v kosmetice a potravinářství^{26,39}.

Na trh se zatím dostalo jen pár antimikrobiálních peptidů bakteriálního původu: kationické peptidy polymyxin B a gramicidin S, které jsou používány v klinické praxi již dlouho, a kationické lantibiotikum nisin používaný jako konzervační prostředek do potravin^{26,40}.

Přes možnosti, které dnes nabízí navrhování nových peptidů nebo proteinů, je jejich úspěšnost limitována klinickými testy. Dodnes se pouze čtyřem peptidům nebo proteinům podařilo dospět do 3. fáze klinických testů – testů účinnosti. Byly navrženy k léčbě nebo prevenci impetiga a diabetických vředů na nohách (derivát žabího magaininu MSI-78, Pexiganan, firma Genaera), mukózy dutiny ústní (derivát prasečího protegrinu IB-367, Isegan, firma Intrabiotics), sepse (derivát lidského BPI proteinu rBPI₂₃, Neuprex, firma Xoma) a s katetrizací spojených infekcí (varianta kravího indolocinu CP-226, Omiganan, firma Migenix). Pouze dva peptidy prokázaly dostatečnou účinnost. Pexiganan při orálním užití spolu s ofloxacinem vedl k vyléčení nebo zlepšení u 90 % pacientů. Avšak Americký úřad pro potraviny a léky (FDA) neschválil tento lék pro klinické využití. Omiganan v 3a fázi klinických testů dosáhl statisticky významného úspěchu při redukcí infekcí vedoucích z katetrů a jejich kolonizaci na katetrech. Přesto, že toto nebyl původně navržený cíl tohoto peptidu, postoupil do další fáze testování 3b (cit.^{41,42}).

Zájmu o antimikrobiální peptidy napomáhá i fakt, že by mohly být produkovány endogenně pomocí geneticky modifikovaných organismů. Jedny z navržených peptidů jsou defensiny. Působí širokospektrálně a jejich hladina v krvi při infekci vzrůstá – byla indikována např. u pacientů s cystickou fibrózou. Jejich produkce ve větším měřítku však není zcela vyřešena, přestože produkce defensinů produkovaných neutrofilů a jejich analog byla již popsána. Produkce defensinů rekombinantní technologií se již také objevuje, ale popisuje pouze produkci v menším měřítku. Také byly prováděny pokusy, při kterých byla úspěšně provedena transformace rostlin s následnou expresí defensinů jako součást obrany proti infekcím. Takto ošetřené rostliny projevily zvýšenou odolnost vůči infekcím ve srovnání s konvenčním ošetřením²⁶.

Antimikrobiální peptidy izolované z obojživelníků (hlavně žab) nabízejí také rozmanité využití v terapeutických a biotechnologických aplikacích, ale vyžadují další studie.

Tato studie byla podpořena granty GA ČR 522/09/1693 a 305/09/H008, FRVŠ 942/2009/G4, MSM 6046137305 a výzkumnými záměry Ministerstva školství Z 40550506.

Seznam zkratk

BPI baktericidní, protein zvyšující permeabilitu mem-

	brán (Bactericidal/Permeability-Increasing protein)
DIF	imunitní faktor příbuzný s Dorsalem (Dorsal-related Immunity Factor)
FDA	Americký úřad pro potraviny a léky (US Food and Drug Administration)
IMD	imunitní nedostatečnost (Immune Deficiency)
LPS	lipopolysacharidy
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
NK	nukleární faktor (Nuclear Factor)
PGRP	peptidoglykany rozpoznávající protein (Peptidoglycan Recognition Protein)
TNF	tumor nekrotizující faktor (Tumor Necrosis Faktor)

LITERATURA

- Spížek J.: Vesmír 1999 78, 27 (1999).
- Palumbi S. R.: Science 293, 1786 (2001).
- Hancock R. E.: Lancet Infect. Dis. 1, 156 (2001).
- Davies J.: Science 264, 375 (1994).
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System: <http://www.rivm.nl/earss/database>, staženo 23. května 2008.
- Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2001; 10(5):180.
- Breithaupt H.: Nat. Biotechnol. 17, 1165 (1999).
- Vilmos P., Kurucz E.: Immunol Lett. 62, 59 (1998).
- Royet J.: Mol. Immunol. 41, 1063 (2004).
- Hultmark D.: Curr. Opin. Immunol. 15, 12 (2003).
- Hoffmann J. A., Reichhart J. M.: Nature Immunology 3, 121 (2002).
- Leclerc V., Reichhart J. M.: Immunol. Rev. 198, 59 (2004).
- Zasloff M.: Nature 415, 389 (2002).
- Kim T., Kim Y. J.: J. Biochem. Mol. Biol. 38, 121 (2005).
- Jones J. D. G., Dangi J. L.: Nature 444, 323 (2006).
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 100, 495 (2006).
- Vizioli J., Salzet M.: Trends Pharmacol. Sci. 23, 494 (2002).
- Bulet P., Stocklin R., Menin L.: Immunol. Rev. 198, 169 (2004).
- McPhee J. B., Hancock R. E. W.: J. Pept. Sci. 11, 677 (2005).
- Yeaman M. R., Yount N. Y.: Pharmacol. Rev. 55, 27 (2003).
- Saido-Sakanaka H., Ishibashi J., Momotani E., Amano F., Yamakawa M.: Peptides 25, 19 (2004).
- Lee M. T., Chen F. Y., Huang H. W.: Biochemistry 43, 3590 (2004).
- Powers J. P. S., Hancock R. E. W.: Peptides 24, 1681 (2003).
- Shai Y.: Biochim. Biophys. Acta 1462, 55 (1999).
- Otvos L., Rogers M. E., Consolvo P. J., Condie B. A., Lovas S., Bulet P., Blaszczyk-Thurin M.: Biochemistry 39, 14150 (2000).
- Tossi A., Sandri L.: Curr. Pharm. Des. 8, 743 (2002).
- Brogden K. A.: Nat. Rev. Microbiol. 3, 238 (2003).
- Tossi A., Sandri L., Giangaspero A.: Biopolymers 55, 4 (2000).
- Zanetti M., Gennaro R., Romeo D.: FEBS Lett. 374, 1 (1995).
- Otvos L.: Cell. Mol. Life Sci. 59, 1138 (2002).
- Yamasaki K., Gallo R. L.: Eur. J. Dermatol. 18, 11 (2008).
- Schutte B. C., Mitros J. P., Bartlett J. A., Walters J. D., Jia H. P., Welsh M. J., Casavant T. L., McCray P. B., Jr.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 2129 (2002).
- Park C. H., Valore E. V., Waring A. J., Ganz T.: J. Biol. Chem. 276, 7806 (2001).
- Craik D. J., Daly N. L., Mulvenna J., Plan M. R., Trabi M.: Curr. Protein Pept. Sci. 5, 297 (2004).
- Segura A., Moreno M., Madueno F., Molina A., Garcia-Olmedo F.: Mol. Plant. Microb. Interact. 12, 16 (1999).
- Altena K., Guder A., Cramer C., Bierbaum G.: Appl. Environ. Microbiol. 66, 2565 (2000).
- Hoffman R., Bulet P., Lazslo U., Lazslo O. Jr.: Biochim. Biophys. Acta 1426, 459 (1999).
- McManus A. M., Otvos L. Jr., Hoffmann R., Craik D. J.: Biochemistry 38, 705 (1999).
- Papo N., Shai Y.: Cell. Mol. Life Sci. 62, 784 (2005).
- Rollema H. S., Kuipers O. P., Both P., Vos W. M., Siezen R. J.: Appl. Environ. Microbiol. 61, 2873 (1995).
- Hancock R. E. W., Sahl H. S.: Nat. Biotechnol. 24, 1551 (2006).
- Giuliani A., Pirri G., Nicoletto S. F.: Cent. Eur. J. Biol. 2, 1 (2007).
- Beinke S., Ley S. C.: Biochem. J. 382, 393 (2004).
- Jensen H., Hamill P., Hancock R. E. W.: Clin. Microbiol. Rev. 19, 491 (2006).

T. Neubauerová^{a,b}, M. Macková^{a,b}, T. Macek^{a,b}, and B. Koutek^b (^a Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Antimicrobial Cationic Peptides**

The resistance of microorganisms to antibiotics is an increasing public health problem. Hence, substances with new mechanisms of antimicrobial action, such as cationic peptides, are of interest. Cationic peptides play an important role in the innate immunity of all living organisms. Over 700 of the peptides have been isolated. Half of them were isolated from insects; their biosynthesis was described. They show a broad antimicrobial activity and act against tumor cells and viruses.

POUŽITÍ DIAMANTOVÝCH FILMOVÝCH ELEKTROD DOPOVANÝCH BOREM PRO STANOVENÍ ORGANICKÝCH LÁTEK

JANA MUSILOVÁ, JIŘÍ BAREK a KAROLINA PECKOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 8, 128 43 Praha 2
Jana.Musilova@seznam.cz

Došlo 4.8.08, přijato 20.10.08.

Klíčová slova: diamantová filmová elektroda, diamant dopovaný borem, voltametrie, ampérometrie

Obsah

1. Úvod
2. Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem
3. Příprava diamantových filmových elektrod dopovaných borem
4. Konstrukce diamantových filmových elektrod dopovaných borem
 - 4.1. Mikroelektrody
 - 4.2. Elektrody s modifikovaným povrchem
5. Analytické aplikace
6. Závěr

1. Úvod

V posledních dvou desetiletích je věnována pozornost novému elektrodovému materiálu, diamantovému filmu dopovanému borem (BDD). Mezi jeho výhodné vlastnosti patří mechanická i chemická stabilita, nízký zbytkový proud a biokompatibilita^{1–4}. Další důležitou vlastností BDD filmu je široké potenciálové okno, závislé na kvalitě filmu a dosahující nejčastěji hodnot kolem 3,5 V. Borem dopované diamantové filmové elektrody (BDDFE) proto umožňují provádět elektrochemické reakce při potenciálech, kterých není možné dosáhnout jiným způsobem^{3,5}. Při elektrochemickém stanovení organických látek na pevných elektrodách dochází velmi často k ireverzibilní adsorpci reakčních produktů či některých složek vzorku na povrchu elektrody, což má za následek její pasivaci. Na adsorpci polárních látek jsou citlivé téměř všechny sp^2 uhlíkové elektrody (tj. elektrody v nichž převažují uhlíkové atomy s sp^2 hybridizací, např. grafitové). Je to způsobeno hlavně přítomností polárních skupin na jejich povrchu⁶. BDD je díky svému sp^3 charakteru (tj. skutečností, že uhlíkové atomy jsou zde v sp^3 hybridizaci) vůči adsorpci polárních látek na jeho povrchu značně rezistentní, což je

dáno v podstatě parafinickým charakterem jeho povrchu v případě převládající terminace povrchových vazeb vodíkem. Díky malé náchylnosti k pasivaci jsou BDD filmy v mnoha případech ideálním elektrodovým materiálem, který je možné použít k vysoce citlivému stanovení velkého množství organických i anorganických látek bez předchozí úpravy povrchu elektrody¹. Příprava vodivých diamantových filmů i jejich analytické aplikace byly v minulých letech popsány v přehledných referátech^{1,7–10} a v knize¹¹.

2. Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem

Použití vodivých diamantových filmů jako elektrodových materiálů v elektrochemii bylo rozsáhle popsáno Fujishimou¹¹. Pro použití BDDFE v elektrochemii organických látek existují dva hlavní směry: elektrochemická oxidace organických látek obsažených v odpadních vodách na BDD anodě založená na jejich úplné konverzi nebo destrukci a užití BDDFE jako elektrochemických senzorů ve voltametrii nebo při ampérometrické detekci v průtokových metodách (HPLC, průtoková injekční analýza, kapilární elektroforéza).

Cílem čištění odpadních vod je úplná oxidace organických polutantů na CO_2 nebo jejich konverze na biologicky odbouratelné sloučeniny. K tomuto účelu je výhodné použití BDDFE, neboť při oxidaci vody, která je umožněna vysokým přepětím tvorby kyslíku na povrchu BDDFE, vzniká velké množství hydroxylových radikálů. Tyto silné oxidanty zajišťují přímou oxidaci organických látek na povrchu BDD anody, čímž je zabráněno pasivaci povrchu. Toto téma bylo popsáno v přehledných referátech^{7,12,13}.

3. Příprava diamantových filmových elektrod dopovaných borem

BDD filmy se obvykle připravují metodou chemické depozice par. K depozici diamantového filmu je nejčastěji používána směs methanu a vodíku, dopování borem je dosaženo přidáváním diboranu do směsi plynů. Koncentrace atomů boru v diamantovém filmu je obvykle 10^{20} cm^{-3} , což odpovídá 1 atomu boru na 1000 atomů uhlíku^{9,14}. Přípravou BDD filmu se podrobně zabývá článek Cvačky a spol.⁵ Ačkoliv byly studovány i jiné typy dopantů (vodík, dusík, fosfor, síra)^{1,8}, většina prací v elektroanalýze využívá jako dopant bor. Téměř všechny publikované elektroanalytické aplikace byly provedeny na BDD filmech nanesených na křemíku (BDD/Si), třebaže jejich průmyslová výroba je problematická kvůli křehkosti a relativně nízké vodivosti křemíkového substrátu. V dnešní době je snaha

nalézt nový substrát pro BDD film, byl testován niob, tantal, wolfram, molybden nebo podstatně levnější titan^{15–19}. Tyto substráty jsou vhodné pro i pro velkoplošné elektrody používané pro úplnou elektrochemickou oxidaci organických polutantů při jejich odstraňování z odpadních vod, v elektroanalytické chemii se zatím příliš neuplatnily. Pro výrobu mikroelektrod lze jako substrát použít platinový drátek³. Jako substrát pro BDD film byl testován také grafit, uhlík a uhlíková vlákna⁸; jejich analytické aplikace jsou však zatím omezené.

4. Konstrukce diamantových filmových elektrod dopovaných borem

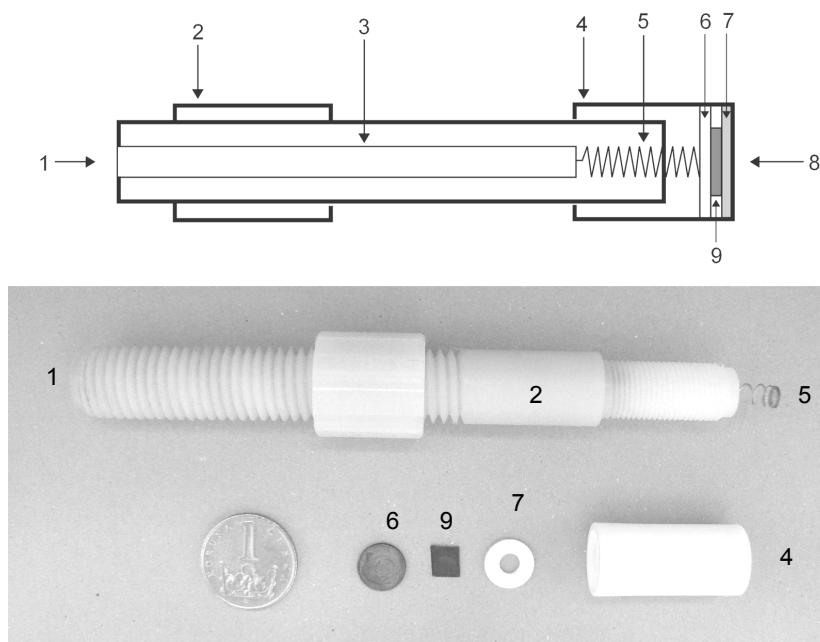
Při vsádkovém uspořádání je BDDFE pro voltametrická měření vložena do těla elektrody z teflonu nebo polyetheretherketonu (PEEK) (obr. 1) nebo tvoří dno pracovní nádoby^{20,89}. Pro elektrochemickou detekci v průtokovém uspořádání lze použít tenkovrstvou detekční celou, která byla poprvé popsána v práci²¹. Lze však použít i většinu komerčně dostupných tenkovrstvých cel. Pro práci s kapilárními technikami (HPLC, kapilární elektroforéza) je vhodná celá pro detekci za kolonou s pracovní BDD mikroelektrodou^{3,22}.

V dnešní době již existuje několik dodavatelů komerčních elektrod^{20,23,24}: Windsor Scientific (Velká Britá-

nie)²⁵, Adamant Technologies (Švýcarsko)²⁶, Element Six (Velká Británie)²⁷, Condias (Německo)²⁸, Sumitomo (Japonsko)²⁹ a sp3 Technologies (USA)³⁰.

4.1. Mikroelektrody

Významným trendem v konstrukci ampérometrických detekčních systémů je jejich miniaturizace, řada prací se tedy zabývá přípravou BDD mikroelektrod. Cvačka a spol. studoval použití BDD mikroelektrod jako elektrochemického detektoru pro kapilární elektroforézu (CE)³. Mikroelektrody byly připraveny nanesením tenkého BDD filmu na platinové drátky o průměru 75, 25 či 10 μm vyleptané do tvaru kužele. Kvalita mikroelektrod závisí na úplném pokrytí platiny BDD filmem a na tvaru elektrody, jehož reprodukovatelnost je třeba zajistit. Toho se dosáhlo oddělením kuželové části elektrody zatavením její zbylé části do polypropylenu nebo jejím pokrytím lakem na nehty nebo polyimidem. Výhodnější je použít zatavení do polypropylenu, neboť lak na nehty a polyimid mají omezenou chemickou stabilitu, omezující jejich použití ve vzorcích životního prostředí, a omezenou elektrochemickou stabilitu, zužující použitelný rozsah potenciálů. Další typy BDD mikroelektrod byly použity jako ampérometrický detektor při CE na mikročipu pro analýzu purinů a jejich derivátů³¹, 2,4-dinitrotoluenu a 1,3-dinitrobenzenu³² nebo 4-aminofenolu a 2-aminonafalenu³³.



Obr. 1. Schéma BDDFE v diskovém uspořádání; kontakt pro připojení k potenciostatu (1), teflonové tělo elektrody (2), elektrický kontakt (3), šroubovací nástavec (4), pružina (5), kovová destička z obou stran pokrytá grafitem (6), těsnění (7), kontakt s roztokem (8), BDDFE na křemíkové podložce (9)

4.2. Elektrody s modifikovaným povrchem

Poslední dobou roste využití modifikovaných diamantových povrchů. Techniky modifikace jsou chemické, elektrochemické nebo fotochemické¹¹. Chemická modifikace BDD povrchu může zajistit zvýšenou citlivost a selektivitu při detekci různých látek¹. Nejčastěji se používá povrchová oxidace, navázání organických funkčních skupin nebo biomolekul a elektrochemická depozice kovů nebo jejich oxidů. Modifikace povrchu anodickou oxidací vede k výraznému zvýšení selektivity k některým analytům, např. k dopaminu nebo kyselině močové, které je pak možné stanovit i v přítomnosti nadbytku kyseliny askorbové^{34–37}. Vzhledem k biokompatibilitě diamantu je výhodné jeho využití pro senzory *in vivo*. Diamantové elektrody s deponovaným kovem lze použít v případě katalýzy více-*stepňových* elektrochemických reakcí (oxidace alkoholů a uhlovodíků), které mohou být na nemodifikované BDDFE poměrně pomalé. Elektrody s deponovaným niklem nebo mědi vykazují výbornou elektrochemickou stabilitu a dobrou adhezi částic kovu k povrchu elektrody¹. Použití enzymaticky modifikovaných BDD filmů je perspektivní i pro přípravu senzorů se specifickou citlivostí¹. BDDFE modifikovaná tyrosinase byla použita jako elektrochemický detektor při stanovení estrogenních derivátů fenolu průtokovou injekční analýzou (FIA)³⁸. Mikrosenzor z mikrovláknových BDD elektrod modifikovaných oxidovaným polypyrrolem byl použit jako ampérometrický detektor pro stanovení dopaminu v přítomnosti kyseliny askorbové³⁷. Pro stanovení glukosy byl zkonstruován BDDFE biosenzor s imobilizovanou glukosooxidase³⁹.

5. Analytické aplikace

Analytické aplikace BDDFE byly v posledních pěti letech popsány v referátech^{1,8–10,20,23}. V oblasti organické analýzy nalezla BDDFE uplatnění při stanovení pesticidů, léčiv, environmentálních polutantů (fenoly a jejich chlorované deriváty, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a jejich deriváty) a dalších biologicky aktivních dusíkatých a sírných látek. Většina prací porovnává stanovení s použitím BDDFE s elektrodou ze skelného uhlíku či doplňuje elektroanalytické metody aplikací BDDFE v ampérometrických detektorech pro FIA, HPLC nebo CE. Přehled aplikací BDDFE při stanovení organických látek je uveden v tabulce I. V následujícím textu jsou uvedeny příklady stanovení, ve kterých je třeba vyřešit řadu problémů, např. odstraňování polymerního filmu na povrchu elektrody nebo detekci analytů v přítomnosti rušících látek.

Dopamin je jeden z nejdůležitějších neurotransmiterů a proto je zřejmá snaha nalézt vhodný voltametrický senzor k jeho stanovení v nitrobněných tekutinách centrálního nervového systému³⁶. Jedním z největších problémů detekce dopaminu, jehož koncentrace se zde pohybuje v rozmezí 10^{-9} – 10^{-5} mol L⁻¹, je přítomnost velkého množství (10^{-4} mol L⁻¹) kyseliny askorbové, která se na standardních elektrodách oxiduje při téměř stejném potenciálu

jako dopamin. Stanovení dopaminu na BDDFE modifikované částicemi zlata (Au/BDDFE) bylo provedeno v práci³⁶. Částičky zlata o velikosti 20–400 nm byly deponovány na povrch BDDFE cyklickou voltametrií při potenciálu od -0,7 do 0 V proti SCE v 0,05 mM-KAuCl₄ a 1 M-KCl. Na Au/BDDFE se dopamin oxiduje při potenciálu 0,11 V a kyselina askorbová při 0,26 V. Dopamin lze tedy stanovit selektivně v přítomnosti kyseliny askorbové s mezí detekce $1 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, dochází však k pasivaci elektrodového povrchu. Au/BDDFE potažená samoskladnou vrstvou kyseliny merkaptooctové (sulfanyloctové), (SAM/Au/BDDFE) poskytuje vyšší odezvu a k její pasivaci nedochází. Kalibrační závislost pro stanovení dopaminu na SAM/Au/BDDFE je lineární v koncentračním rozsahu $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ s detekčním limitem $1 \cdot 10^{-9}$ mol L⁻¹.

Fenoly a chlorované fenoly (CP) se do životního prostředí dostávají při výrobě antioxidantů, barviv a léků, při chlorování pitné vody nebo při bělení papíru²⁰. Jejich elektroanalýza je komplikovaná, protože se na povrchu elektrody tvoří polymerní film. Bylo publikováno několik studií, které se zabývaly stanovením a odbouráváním chlorovaných fenolů s různými přístupy k problematice pasivace elektrodového povrchu a odstraňováním vzniklého filmu laserem, ultrazvukem nebo vložením vysokého kladného potenciálu během měření. K detekci CP byla použita průtoková cela⁴⁰ a dále laserová ablační voltametrie s Nd:YAG laserem, při níž je adsorpce oxidačních produktů zanedbatelná. Stanovení CP pomocí HPLC a FIA s elektrochemickou detekcí na anodicky oxidované BDDFE prováděl Terashima a spol⁴¹. Naadsorbovaný polymerní film byl odstraňován přímo v měřeném roztoku vložením potenciálu 2,64 V proti SCE po dobu 4 min. Při takto vysokém potenciálu vznikají hydroxylové radikály, které způsobí oxidaci pasivační vrstvy. Stanovení 4-chlorfenolu, jednoho z nejvýznamnějších polutantů, bylo provedeno voltametrií s lineárně rostoucím potenciálem (LSV) s použitím ultrazvuku⁴². Působením ultrazvuku se zvýší transport elektroaktivních látek k povrchu elektrody a zároveň se naruší polymerní film a tím omezí pasivace elektrody. Výhoda této metody spočívá v její použitelnosti pro analýzu vzorků životního prostředí.

Senzory pro stanovení glukosy pracují na principu její elektrochemické oxidace. Existují dva hlavní typy senzorů: enzymatické, používající enzym glukosooxidase (GOx)^{39,43}, a neenzymatické. Největší uplatnění nacházejí biosenzory pro stanovení glukosy v krvi, kde se její koncentrace pohybuje mezi $3 \cdot 10^{-3}$ – $8 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹. V práci⁴³ byl popsán biosenzor pro stanovení glukosy zlatou elektrodou modifikovanou nedopovaným nanokrystalickým diamantovým filmem (N-NCD) s kovalentně imobilizovanou GOx na jeho povrchu. Na povrch zlaté elektrody byla deponována vrstva poly(allylamin-hydrochloridu) (PAA) s koncovými skupinami -NH₂ a sloužící jako podklad N-NCD filmu se skupinami -COOH, které interagují s aminoskupinami z vrstvy PAA. Vodivost N-NCD je $1,3 \cdot 10^{-8}$ Ω⁻¹ cm⁻¹. Na N-NCD film byla imobilizována vrstva GOx. Elektroda byla před měřením anodicky oxidována při 0,7 V proti SCE po dobu 5 min, aby se zvýšil

Tabulka I
Analytické aplikace BDDFE pro stanovení organických látek

Analyt	Metoda	Mez detekce [mol L ⁻¹]	Lit.
1,3-Dinitrobenzen	CE-ED, mikročip	4·10 ⁻⁷	32
1-Aminonaftalen	HPLC-ED	1·10 ⁻⁷	5
2,4-Dinitrotoluen	CE-ED, mikročip	7·10 ⁻⁷	32
2-Aminobifenyl	HPLC-ED	1·10 ⁻⁷	5
2-Aminonaftalen	CE-ED, mikročip	1·10 ⁻⁶	33
2-Chlorfenol	FIA-ED	5·10 ⁻⁸	45
	HPLC-ED	1·10 ⁻⁷	45
	LAV	1·10 ⁻⁵	40
3-Aminofluoranthén	DPV	2·10 ⁻⁷	46
3-Chlorfenol	FIA-ED, HPLC-ED	1·10 ⁻⁷	45
3-Nitrofluoranthén	DPV	3·10 ⁻⁸	46
4-Aminofenol	CE-ED, mikročip	2·10 ⁻⁶	33
4-Chlorfenol	FIA-ED	5·10 ⁻⁷	45
	HPLC-ED	1·10 ⁻⁷	45
	LAV	1·10 ⁻⁸	40
	LSV – ultrazvuk	1·10 ⁻⁶	42
4-Chlor-3-methylfenol	CHA	1·10 ⁻⁸	40
4-Methylpyrokatechol	FIA-ED	2·10 ⁻⁹	47
4-Nitrofenol	LSV, BDD-MEA	2·10 ⁻⁶	48
	SWV – oxidace	6·10 ⁻⁸	49
	SWV – redukce	9·10 ⁻⁸	49
Paracetamol (acetaminophen)	CV	1·10 ⁻⁵	50
	FIA-ED	1·10 ⁻⁸	
Adenosin	FIA-ED	2·10 ⁻⁹	51
Captopril	CV	3·10 ⁻⁵	52
	FIA-ED	1·10 ⁻¹⁰	
Clenbuterol	CV, pyrrol-DNA/BDDFE	9·10 ⁻⁷	53
Cystein	HPLC-ED	1·10 ⁻⁹	54
	CHA	6·10 ⁻⁶	55
	CV	9·10 ⁻⁷	56
	FIA-ED	2·10 ⁻⁸	56
Cystin	HPLC-ED	1·10 ⁻⁹	54
Cytochrom c	CV	3·10 ^{-5 a}	57
Dichlorfenoly (2,6-DCP; 2,3-DCP; 2,5-DCP; 2,4-DCP; 3,4-DCP; 3,5-DCP)	FIA-ED	2·10 ⁻⁸	41
	HPLC-ED	2·10 ⁻¹⁰	
Dopamin, dopamin vedle kyseliny askorbové	CHA	5·10 ⁻⁸	34,
	FIA-ED	3·10 ⁻⁹	58
	SWV, Au/BDDE	1·10 ⁻⁷	47
	SWV, SAM/Au/BDDFE	1·10 ⁻⁹	36
	CE-ED	4·10 ⁻⁸	36
	CE-ED	8·10 ⁻⁸	59
	Amp--ED, BDDMFibE-OPP _y	1·10 ⁻⁸	3
			37
D-penicillamin	CV	3·10 ⁻⁵	60
	FIA-ED	1·10 ⁻⁸	

Tabulka I
Pokračování

Analyt	Metoda	Mez detekce [mol L ⁻¹]	Lit.
Estrogenní deriváty fenolu (bisfenol A; 17β-estradiol)	FIA-ED, tyr/BDDE	1·10 ⁻⁶	38
Ethylamin, ethylendiamin	FIA-ED	1·10 ⁻⁵	21
Fenol	FIA-ED	3·10 ⁻⁷	45
	HPLC-ED	1·10 ⁻⁷	45
	LAV	1·10 ⁻⁵	40
Glukosa	CHA, GOx/BDDE	2·10 ⁻⁵	39
	SWV	5·10 ^{-4 a}	44
	LSV, GOx/Au-N-NCD	5·10 ⁻⁶	43
Glutathion	HPLC-ED – redukce	1·10 ⁻⁶	54
	HPLC-ED – oxidace	2·10 ⁻⁶	54
	CHA	6·10 ⁻⁶	55
	LC-ED	1·10 ⁻⁹	61
Glutathiondisulfid	LC-ED	2·10 ⁻⁹	61
Histamin	FIA-ED	5·10 ⁻⁷	62
Homocystein	HPLC-ED	1·10 ⁻⁹	54
	FIA-ED	1·10 ⁻⁶	54
	CHA	4·10 ⁻⁶	55
Homocystin	HPLC-ED	2·10 ⁻⁹	54
Hydrazin	LSV, Pd/BDDFE	7·10 ⁻⁶	63
	LSV, Pd/BDDEA	2·10 ⁻⁶	
Chlorpromazin	FIA-ED	4·10 ⁻⁹	47
Pyrokatechol	CE-ED	1·10 ⁻⁷	3
Katecholaminy	CE-ED, mikroelektrody		59
		NE	5·10 ⁻⁸
		NM	4·10 ⁻⁸
		DOPEG	3·10 ⁻⁷
		VMA	2·10 ⁻⁷
Kyselina askorbová	FIA-ED	1·10 ⁻⁸	47
Kyselina močová vedle kyseliny askorbové	CHA	2·10 ⁻⁸	35
Kyselina šťavelová	FIA-ED	5·10 ⁻¹⁰	64
Leucin-enkefalinamid a jeho metabolity	LC-ED		65
		tyrosin	3·10 ⁻⁹
		tyrosyl-alanin	2·10 ⁻⁹
		tyrosyl-alanyl-glycin	3·10 ⁻⁹
		leucin-enkefalinamid	1·10 ⁻⁸
		leucin-enkefalin	2·10 ⁻⁸
Linkomycin	FIA-ED	2·10 ⁻⁸	66
Malachitová zeleň, leukomalachitová zeleň	FIA-ED	5·10 ⁻⁸	67
Methionin	HPLC-ED	1·10 ⁻⁹	54
NADH vedle kyseliny askorbové	CHA	1·10 ⁻⁸	58, 68
Naproxen	DPV	3·10 ⁻⁸	69
Nikotin	SWV	3·10 ⁻⁶	70

Tabulka I
Pokračování

Analyt	Metoda	Mez detekce [mol L ⁻¹]	Lit.
<i>N</i> -Methylkarbamátové pesticidy	LC-ED		71
Carbofuran		5·10 ⁻⁹	
Carbaryl		3·10 ⁻⁹	
Bendiocarb		1·10 ⁻⁸	
Nukleové báze			
Cytosin	HPLC-ED	2·10 ⁻⁷	72
5-Methylcytosin	HPLC-ED	8·10 ⁻⁸	72
Guanin	HPLC-ED	4·10 ⁻⁸	72
	SWV	7·10 ⁻⁸	73
Thymin	HPLC-ED	1·10 ⁻⁷	72
Adenin	HPLC-ED	2·10 ⁻⁸	72
	SWV	3·10 ⁻⁸	73
Polycyklické aromatické uhlovodíky	HPLC-ED		74
naftalen		3·10 ⁻⁸	
acenaftylen		3·10 ⁻⁸	
acenaften		2·10 ⁻⁸	
fluoren		2·10 ⁻⁸	
fenanthren		2·10 ⁻⁸	
anthracen		4·10 ⁻⁸	
fluoranthren		1·10 ⁻⁸	
pyren		1·10 ⁻⁸	
benzo[<i>a</i>]anthracen		2·10 ⁻⁸	
chrysen		2·10 ⁻⁸	
benzo[<i>b</i>]fluoranthren		2·10 ⁻⁸	
benzo[<i>k</i>]fluoranthren		2·10 ⁻⁸	
benzo[<i>a</i>]pyren		2·10 ⁻⁸	
dibenzo[<i>a,h</i>]anthracen		1·10 ⁻⁸	
benzo[<i>g,h,i</i>]perylene		3·10 ⁻⁸	
indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyren		4·10 ⁻⁸	
		2·10 ⁻⁸	
Pentachlorfenol	FIA-ED	6·10 ⁻⁷	45
	HPLC-ED	1·10 ⁻⁷	45
	SWV	2·10 ⁻⁸	75
Polyaminy (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin)	FIA-ED	1·10 ⁻⁶	76, 77
Puriny (guanin, hypoxanthin, guanosin, xanthin, kyselina močová)	CE-ED, mikročip	2·10 ⁻⁶	31
Serotonin	FIA-ED	1·10 ⁻⁸	62, 78
Sulfonamidy	FIA-ED	1·10 ⁻⁷	79
	HPLC-ED		80
Sulfadiazin		4·10 ⁻⁸	
Sulfamonomethoxin		4·10 ⁻⁸	
Sulfamethazin		4·10 ⁻⁸	
Sulfadimethoxin		1·10 ⁻⁷	

Tabulka I
Pokračování

Analyt	Metoda	Mez detekce [mol L ⁻¹]	Lit.		
Tetracyklinová antibiotika	FIA-ED	1·10 ⁻⁸	81		
	FIA-ED, Ni/BDDFE	1·10 ⁻⁸	82		
tetracyklin	HPLC-ED, Ni/BDDFE	2·10 ⁻⁸	83		
	HPLC-PAD	1·10 ⁻⁷	84		
chlortetracyklin	HPLC-ED, Ni/BDDFE	1·10 ⁻⁷	83		
	HPLC-PAD	2·10 ⁻⁷	84		
oxytetracyklin	HPLC-ED, Ni/BDDFE	2·10 ⁻⁸	83		
	HPLC-PAD	1·10 ⁻⁷	84		
doxycyklin	HPLC-ED, Ni/BDDFE	1·10 ⁻⁷	83		
	HPLC-PAD	1·10 ⁻⁷	84		
	HPLC-PAD	2·10 ⁻⁷	84		
Trichlorfenoly (2,3,6-TCP; 2,3,4-TCP; 2,4,6-TCP; 2,4,5-TCP; 2,3,5-TCP)	FIA-ED	2·10 ⁻⁸	41		
	HPLC-ED	2·10 ⁻⁹			
Tiopronin	CV	5·10 ⁻⁵	52		
	FIA-ED	1·10 ⁻⁸			
Tricyklická antidepresiva	FIA-ED	1·10 ⁻⁸	85		
				HPLC-ED	
	imipramin	3·10 ⁻⁹			
	desipramin	3·10 ⁻⁹			
	clomipramin	5·10 ⁻¹⁰			
	amitriptylin	2·10 ⁻⁷			
	nortriptylin	1·10 ⁻⁶			
	doxepin	9·10 ⁻⁸			
	Tryptofan	DPV		1·10 ⁻⁵	86
	Tyrosin	DPV		1·10 ⁻⁶	86
Vitamin B ₆ vedle B ₁ a B ₂	SWV, Ru/BDDFE	6·10 ⁻⁸	87		
Xanthin, theofylin, theobromin, kofein	DPV	1·10 ^{-6 a}	88		

^a Dolní hranice kalibrační závislosti, mez detekce neuvedena; seznam použitých zkratk je uveden na konci práce

přenos elektronů ve vrstvě N-NCD a redukce rozpuštěného kyslíku. Stanovení glukosy bylo provedeno LSV při negativním potenciálu (-0,3 V proti SCE) na základě sledování změny proudové odezvy redukce kyslíku v přítomnosti kyseliny askorbové, močové a paracetamolu s lineárním dynamickým rozsahem 1·10⁻⁵–1,5·10⁻² mol L⁻¹ a detekčním limitem 5·10⁻⁶ mol L⁻¹. Přímé stanovení glukosy na BDDFE bez jakékoliv modifikace bylo provedeno v práci⁴⁴ „square wave“ voltmetrií v přítomnosti kyseliny močové a askorbové. BDDFE poskytovala lineární odezvu v celém rozsahu fyziologické koncentrace glukosy v krvi. Aktivace elektrody po dlouhodobém používání byla prováděna cyklickou voltmetrií v 1 M-NaOH mezi 0 a -0,8 V proti SCE. Před jednotlivými měřeními postačuje opláchnutí elektrody deionizovanou vodou. Stanovení glukosy bylo provedeno také ve vzorcích krve a porovnáno s komerčními detektory. Možnosti využití BDDFE ke stanovení různých organických polutantů v pitné vodě jsou popsány v monografii²³.

6. Závěr

BDDFE lze již nyní použít ve velkém množství analytických aplikací a zcela jistě před sebou mají další perspektivní vývoj. Přestože v katodické oblasti nemohou zcela nahradit senzory na bázi rtuti, disponují řadou vynikajících vlastností, které umožňují jejich použití při měření za extrémních podmínek (vysoký tlak nebo teplota, koncentrované kyseliny nebo hydroxidy, mechanické namáhání, přítomnost laseru nebo ultrazvuku), a jejich použití jako biosenzorů při měření v živých tkáních, neboť díky biokompatibilitě nevyvolávají nežádoucí odezvu organismu. V anodické oblasti nabízejí celou řadu výhod ve srovnání s dosud nejčastěji používaným skelným uhlíkem, zejména značnou odolnost vůči pasivaci a podstatně nižší šum. Lze očekávat, že v budoucnu poroste množství praktických aplikací BDDFE jako biosenzorů, senzorů pro online monitorování nebo detektorů k průtokovým analyzátorům, ale také jako velkoplošných elektrod pro elektrochemickou degradaci polutantů v čistírnách odpadních vod.

Seznam zkratek

Amp.	ampérometrie
Au/BDDFE	BDDFE modifikovaná částčkami zlata
BDD	diamant dopovaný borem
BDDFE	diamantové filmové elektrody dopované borem
BDD-MEA	soubor BDD mikroelektrod
BDDMFibE-OPP _y	BDD mikrovláknové elektrody modifikované oxidovaným polypyrrolem
BDD/Si	BDD film nanesený na křemíku
CE	kapilární elektroforéza
CHA	chronoampérometrie
CV	cyklická voltametrie
DCP	dichlorfenol
DOPEG	DL-(3,4-dihydroxyfenyl) ethylenglykol
DPV	diferenční pulzní voltametrie
ED	elektrochemická detekce
FIA	průtoková injekční analýza
GOx	glukosooxidasa
GOx/Au-N-NCD	zlatá elektroda modifikovaná nanokrystalickým nedopovaným diamantem s imobilizovanou glukosooxidase
GOx/BDDFE	BDDFE modifikovaná glukosooxidase
LAV	laserová ablační voltametrie
LOD	mez detekce
NADH	redukována forma nikotinamidenukléotidu
NE	norepinefrin (noradrenalin)
Ni/BDDFE	BDDFE modifikovaná Ni
NM	DL-normetanefrin-hydrochlorid
PAA	poly(allylamin)-hydrochlorid
PAD	pulzní ampérometrická detekce
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PEEK	polyetheretherketon
Pd/BDDEA	soubor BDDFE modifikovaných Pd
Pd/BDDFE	BDDFE modifikovaná Pd
pyrrol-DNA/BDDFE	BDDFE modifikovaná membránou DNA s navázaným pyrrolem
Ru/BDDFE	BDDFE modifikovaná tris(2,2'-bipyridin)rutheniem
SAM/Au/BDDFE	BDDFE modifikovaná částčkami zlata potažená samoskladnou vrstvou kyseliny merkaptocetové
SWV	„square wave“ voltametrie
TCP	trichlorfenol
tyr/BDDFE	BDDFE modifikovaná tyrosinem
VMA	vanilmandlová kyselina

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR (projekt LC 06035 a MSM0021620857), Grantové agentu-

ry Univerzity Karlovy (GA UK 6107/2007/B-Ch/PrF) a Grantové agentury České republiky (grant 203/07/P261).

LITERATURA

1. Chailapakul O., Siangproh W., Tryk D. A.: *Sens. Lett.* 4, 99 (2006).
2. Pleskov Y. V., Sakharova A. Y., Krotova M. D., Bouilov L. L., Spitsyn B. V.: *J. Electroanal. Chem.* 228, 19 (1987).
3. Cvacka J., Quaiserova V., Park J., Show Y., Muck A., Swain G. M.: *Anal. Chem.* 75, 2678 (2003).
4. Tang L., Tsai C., Gerberich W. W., Kruckeberg L., Kania D. R.: *Biomaterials* 16, 483 (1995).
5. Cvačka J., Swain G. M., Berek J., Zima J.: *Chem. Listy* 96, 33 (2002).
6. McCreery R. L., v knize: *Interfacial Electrochemistry* (Wieckowski A., ed.), kap. 35. Dekker, New York 1999.
7. Alfaro M. A. Q., Ferro S., Martinez-Huitle C. A., Vong Y. M.: *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 227 (2006).
8. Compton R. G., Foord J. S., Marken F.: *Electroanalysis* 15, 1349 (2003).
9. Pleskov Y. V.: *Russ. J. Electrochem.* 38, 1275 (2002).
10. Kraft A.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 2, 355 (2007).
11. Fujishima A., Einaga Y., Rao T. N., Tryk D. A.: *Diamond Electrochemistry*. Elsevier, Amsterdam 2005.
12. Panizza M., Cerisola G.: *Electrochim. Acta* 51, 191 (2005).
13. Canizares P., Saez C., Lobato J., Rodrigo M. A.: *Afinidad* 63, 121 (2006).
14. Xu J. S., Chen Q. Y., Swain G. M.: *Anal. Chem.* 70, 3146 (1998).
15. Chen X. M., Chen G. H., Gao F. R., Yue P. L.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 5021 (2003).
16. Chen X. M., Chen G. H., Yue P. L.: *Chem. Eng. Sci.* 58, 995 (2003).
17. Chen X. M., Gao F. R., Chen G. H.: *J. Appl. Electrochem.* 35, 185 (2005).
18. Shaw J., Jones A. N., Monk P. M. S., Rego C. A.: *Diamond Relat. Mater.* 11, 1690 (2002).
19. Fryda M., Herrmann D., Schafer L., Klages C. P., Perret A., Haenni W., Comninellis C., Gandini D.: *New Diamond Front. Carbon Technol.* 9, 229 (1999).
20. Berek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 2003 (2007).
21. Jolley S., Koppang M., Jackson T., Swain G. M.: *Anal. Chem.* 69, 4099 (1997).
22. Peckova K., Mocko V., Opekar F., Swain G. M., Zima J., Berek J.: *Chem. Listy* 100, 124 (2006).
23. Peckova K., Musilova J., Berek J., Zima J.: *Voltametric and Amperometric Determination of Organic Pollutants in Drinking Water Using Boron Doped Diamond Film Electrodes*. V knize: *Progress on Drinking Water Research* (Lefebvre M. H., Roux M. M., ed.). Nova Publishers, New York 2008.
24. <https://www.novapublishers.com>, staženo 20.6.2008.
25. <http://www.windsorscientific.co.uk/>, staženo 20.6.2008.

26. <http://www.adamant-technologies.com>, staženo 20.6.2008.
27. <http://www.e6.com/en/>, staženo 20.6.2008.
28. <http://condias.de>, staženo 20.6.2008.
29. <http://www.sei.co.jp/>, staženo 20.6.2008.
30. <http://www.sp3inc.com/>, staženo 20.6.2008.
31. Wang J., Chen G., Muck A., Shin D. C., Fujishima A.: *J. Chromatogr., A* 1022, 207 (2004).
32. Wang J., Chen G., Chatrathi M. P., Fujishima A., Tryk D. A., Shin D.: *Anal. Chem.* 75, 935 (2003).
33. Shin D. C., Tryk D. A., Fujishima A., Muck A., Chen G., Wang J.: *Electrophoresis* 25, 3017 (2004).
34. Popa E., Notsu H., Miwa T., Tryk D. A., Fujishima A.: *Electrochem. Solid-State Lett.* 2, 49 (1999).
35. Popa E., Kubota Y., Tryk D. A., Fujishima A.: *Anal. Chem.* 72, 1724 (2000).
36. Weng J., Xue J. M., Wang J., Ye J. S., Cui H. F., Sheu F. S., Zhang Q. Q.: *Adv. Funct. Mater.* 15, 639 (2005).
37. Olivia H., Sarada B. V., Shin D., Rao T. N., Fujishima A.: *Analyst* 127, 1572 (2002).
38. Notsu H., Tatsuma T., Fujishima A.: *J. Electroanal. Chem.* 523, 86 (2002).
39. Jing W., Yang Q.: *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1330 (2006).
40. Prado C., Murcott G. G., Marken F., Foord J. S., Compton R. G.: *Electroanalysis* 14, 975 (2002).
41. Terashima C., Rao T. N., Sarada B. V., Tryk D. A., Fujishima A.: *Anal. Chem.* 74, 895 (2002).
42. Saterlay A. J., Foord J. S., Compton R. G.: *Electroanalysis* 13, 1065 (2001).
43. Zhao W., Xu J. J., Qiu Q. Q., Chen H. Y.: *Biosens. Bioelectron.* 22, 649 (2006).
44. Lee J., Park S. M.: *Anal. Chim. Acta* 545, 27 (2005).
45. Muna G. W., Tasheva N., Swain G. M.: *Environ. Sci. Technol.* 38, 3674 (2004).
46. Cizek K., Barek J., Fischer J., Peckova K., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 1295 (2007).
47. Granger M. C., Xu J. S., Strojek J. W., Swain G. M.: *Anal. Chim. Acta* 397, 145 (1999).
48. Lawrence N. S., Pagels M., Meredith A., Jones T. G. J., Hall C. E., Pickles C. S. J., Godfried H. P., Banks C. E., Compton R. G., Jiang L.: *Talanta* 69, 829 (2006).
49. Pedrosa V. D., Codognoto L., Avaca L. A.: *J. Braz. Chem. Soc.* 14, 530 (2003).
50. Wangfuengkanagul N., Chailapakul O.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 841 (2002).
51. Xie S. T., Shafer G., Wilson C. G., Martin H. B.: *Diamond Relat. Mater.* 15, 225 (2006).
52. Siangproh W., Wangfuengkanagul N., Chailapakul O.: *Anal. Chim. Acta* 499, 183 (2003).
53. Wu J., Li X. L., Wu X. M., Huan S. Y., Shen G. L., Yu R. Q.: *Chem. Res. Chin. Univ.* 21, 517 (2005).
54. Chailapakul O., Siangproh W., Sarada B. V., Terashima C., Rao T. N., Tryk D. A., Fujishima A.: *Analyst* 127, 1164 (2002).
55. Nekrassova O., Lawrence N. S., Compton R. G.: *Electroanalysis* 15, 1655 (2003).
56. Spataru N., Sarada B. V., Popa E., Tryk D. A., Fujishima A.: *Anal. Chem.* 73, 514 (2001).
57. Haymond S., Babcock G. T., Swain G. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 10634 (2002).
58. Fujishima A., Rao T. N., Popa E., Sarada B. V., Yagi I., Tryk D. A.: *J. Electroanal. Chem.* 473, 179 (1999).
59. Park J., Quaiserova-Mocko V., Peckova K., Galligan J. J., Fink G. D., Swain G. M.: *Diamond Relat. Mater.* 15, 761 (2006).
60. Wangfuengkanagul N., Chailapakul O.: *Talanta* 58, 1213 (2002).
61. Terashima C., Rao T. N., Sarada B. V., Kubota Y., Fujishima A.: *Anal. Chem.* 75, 1564 (2003).
62. Sarada B. V., Rao T. N., Tryk D. A., Fujishima A.: *Anal. Chem.* 72, 1632 (2000).
63. Batchelor-McAuley C., Banks C. E., Simm A. O., Jones T. G. J., Compton R. G.: *Analyst* 131, 106 (2006).
64. Ivandini T. A., Rao T. N., Fujishima A., Einaga Y.: *Anal. Chem.* 78, 3467 (2006).
65. Ivandini T. A., Sarada B. V., Terashima C., Rao T. N., Tryk D. A., Ishiguro H., Kubota Y., Fujishima A.: *J. Chromatogr., B* 791, 63 (2003).
66. Boonsong K., Chuanuwatanakul S., Wangfuengkanagul N., Chailapakul O.: *Sens. Actuators, B* 108, 627 (2005).
67. Ngamukot P., Charoenraks T., Chailapakul O., Motomizu S., Chuanuwatanakul S.: *Anal. Sci.* 22, 111 (2006).
68. Rao T. N., Yagi I., Miwa T., Tryk D. A., Fujishima A.: *Anal. Chem.* 71, 2506 (1999).
69. Suryanarayan V., Zhang Y., Yoshihara S., Shirakashi T.: *Electroanalysis* 17, 925 (2005).
70. Suffredini H. B., Santos M. C., De Souza D., Codognoto L., Homem-de-Mello P., Honorio K. M., da Silva A. B. F., Machado S. A. S., Avaca L. A.: *Anal. Lett.* 38, 1587 (2005).
71. Rao T. N., Loo B. H., Sarada B. V., Terashima C., Fujishima A.: *Anal. Chem.* 74, 1578 (2002).
72. Ivandini T. A., Honda K., Rao T. N., Fujishima A., Einaga Y.: *Talanta* 71, 648 (2007).
73. Ivandini T. A., Sarada B. V., Rao T. N., Fujishima A.: *Analyst* 128, 924 (2003).
74. Bouvrette P., Hrapovic S., Male K. B., Luong J. H. T.: *J. Chromatogr., A* 1103, 248 (2006).
75. Codognoto L., Machado S. A. S., Avaca L. A.: *Diamond Relat. Mater.* 11, 1670 (2002).
76. Koppang M. D., Witek M., Blau J., Swain G. M.: *Anal. Chem.* 71, 1188 (1999).
77. Witek M. A., Swain G. M.: *Anal. Chim. Acta* 440, 119 (2001).
78. Sarada B. V., Rao T. N., Tryk D. A., Fujishima A.: *Chem. Lett.* 1999, 1213.
79. Rao T. N., Sarada B. V., Tryk D. A., Fujishima A.: *J. Electroanal. Chem.* 491, 175 (2000).
80. Preechaworapun A., Chuanuwatanakul S., Einaga Y., Grudpan K., Motomizu S., Chailapakul O.: *Talanta*

- 68, 1726 (2006).
81. Wangfuengkanagul N., Siangproh W., Chailapakul O.: *Talanta* 64, 1183 (2004).
 82. Tretepvijit S., Chuanuwatanakul S., Einaga Y., Sato R., Chailapakul O.: *Anal. Sci.* 21, 531 (2005).
 83. Tretepvijit S., Preechaworapun A., Praphairaksit N., Chuanuwatanakul U., Einaga Y., Chailapakul O.: *Talanta* 68, 1329 (2006).
 84. Charoenraks T., Chuanuwatanakul S., Honda K., Yamaguchi Y., Chailapakul O.: *Anal. Sci.* 21, 241 (2005).
 85. Ivandini T. A., Sarada B. V., Terashima C., Rao T. N., Tryk D. A., Ishiguro H., Kubota Y., Fujishima A.: *J. Electroanal. Chem.* 521, 117 (2002).
 86. Zhao G. H., Qi Y., Tian Y.: *Electroanalysis* 18, 830 (2006).
 87. Wu J., Lei C. X., Yang H. F., Wu X. M., Shen G. L., Yu R. Q.: *Sens. Actuators, B* 107, 509 (2005).
 88. Spataru N., Sarada B. V., Tryk D. A., Fujishima A.: *Electroanalysis* 14, 721 (2002).
 89. Granger M. C., Witek M., Xu J., Wang J., Hupert M., Hanks A., Koppang D., Butler J. E., Lucazeau G., Mermoux M., Strojek J. W., Swain G. M.: *Anal. Chem.* 72, 3793 (2000)..

J. Musilová, J. Barek, and K. Pecková (*Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry*): **The Use of Boron-Doped Diamond Film Electrodes for Detection of Organic Compounds**

The use of the title electrodes in electroanalysis of organic compounds is reviewed. The electrodes have gained popularity in a variety of electrochemical applications such as electrochemical sensors employed in voltammetric or liquid flow methods (HPLC, flow injection analysis, capillary electrophoresis). Due to their excellent properties, they are useful also in measurements under extreme conditions or in bioelectrochemical applications. The review summarizes the results obtained in the last decade.

PERSPEKTIVY PRODUKCE BUTANOLU ZE ŠKROBNATÝCH A CELULOSOVÝCH MATERIÁLŮ

JAKUB LIPOVSKÝ, PETRA PATÁKOVÁ,
MOJMÍR RYCHTERA, HANA ČÍŽKOVÁ
a KAREL MELZOCH

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6
lipovskj@vscht.cz

Došlo 16.9.08, přijato 5.11.08.

Klíčová slova: aceton-butanolové kvašení, škrob, celuloza, fermentace

Obsah

1. Úvod
2. Aceton-butanolové kvašení
3. Možnosti využití škrobnatých a celulosových materiálů
4. Uspořádání procesu
5. Separace produktu
6. Závěr – vyhlídky do budoucnosti

1. Úvod

Technologie tzv. aceton-butanolového kvašení má dlouhou a zajímavou historii, může se pyšnit mnoha prvenstvími na poli kvasných technologií a v současnosti se těší obnovenému zájmu i velkých průmyslových gigantů, jako jsou např. společnosti British Petroleum nebo DuPont. Zatímco v minulosti byl v centru pozornosti hlavně aceton, používaný jako příměs do leteckých benzinů, nyní jde zejména o butanol, který by na základě svých výhodných vlastností (vyšší obsah energie, nižší těkavost, hydrofilita a nižší korozivita) mohl být přidáván nejen do motorové nafty, ale též do benzínu namísto tzv. bioethanolu¹. Stejně jako v případě bioethanolu zde však vyvstává potřeba nalézt vhodný, dostatečně levný substrát, z něhož by se butanol vyráběl fermentací bakteriemi rodu *Clostridium* a který by primárně nebyl potravinářskou surovinou. Jednoznačnou volbou pro výrobu biopaliv tzv. druhé generace jsou proto zemědělské odpady jako např. obilná sláma a dřevní štěpky a nebo i organické odpady z domácností^{2,3}. Nevýhodou těchto substrátů je však nutnost hydrolytické předúpravy (kyselé, alkalické nebo enzymové hydrolyzy, parní exploze nebo jejich kombinace)² před vlastní fermentací.

2. Aceton-butanolové kvašení

Rozpouštědlovorná klostridia mají schopnost využívat širokou škálu sacharidů od monosacharidů, jako je glukosa, fruktosa, ale i xylosa a arabinosa přes disacharidy jako je sacharosa a laktosa až po polysacharidy, jako je škrob, pektin nebo xylan⁴. Rod *Clostridium* využívá k degradaci hexos EMP (Embden-Mayerhof-Parnas) metabolickou dráhu, pentosy jsou konvertovány na ribosa-5-fosfát a xylulosa-5-fosfát, které vstupují do pentosa-fosfátového cyklu, přičemž následně vzniklé metabolity – fruktosa-6-fosfát a glyceraldehyd-3-fosfát jsou dále využívány v EMP metabolické dráze^{4,5}. Centrálním metabolitem, společným téměř pro všechny produkty, je acetyl-CoA. Avšak pouze dvě třetiny celkového množství hexos je zpracováno na tento metabolit, zbylá třetina odchází do atmosféry v podobě oxidu uhličitého⁶.

Při vsádkové kultivaci tvoří rozpouštědla produkující druhy rodu *Clostridium* vodík, oxid uhličitý, acetylát a butyrát během fáze exponenciálního růstu, která se zároveň často označuje jako acidogenní fáze. Při přechodu kultury do stacionární fáze růstu dochází ke změně metabolismu, kdy se koncovými produkty stávají rozpouštědla a nastává tak solventogenní fáze. Během této fáze dochází k reasimilaci kyselin za stálé spotřeby uhlikatého zdroje⁴. Rovnováha mezi koncovými množstvími redukováných, neutrálních a oxidovaných produktů v průběhu celé fermentace je vyvažována regulací produkce vodíku a ATP. Celkový zisk těchto látek je závislý na kultivačních podmínkách a použitím klostridiálním kmenu⁶. Butanol může být také tvořen přímo ze sacharidického zdroje bez zpětného využití již vytvořených kyselin, přičemž se netvoří vodík a nedochází k tvorbě ATP⁴. Alespoň částečná reutilizace kyselin je typická pro druhy *C. acetobutylicum* a *C. beijerinckii*, ale v případě *C. tetanomorphum* se tvoří simultánně butyrát s butanolem, aceton se netvoří a k reutilizaci butyrátu nedochází vůbec⁶.

Přechod z acidogenní fáze růstu do solventogenní bývá dáván do souvislosti s poklesem pH a akumulací kyselin uvnitř buňky a samotná tvorba rozpouštědel z kyselin je také považována za detoxifikační proces, chránící buňky před acidifikací vnitřního prostředí. Přechod z acidogenní do solventogenní fáze je však velmi komplikovaným dějem, který je podmíněn řadou požadavků ze strany klostridiálních buněk⁹.

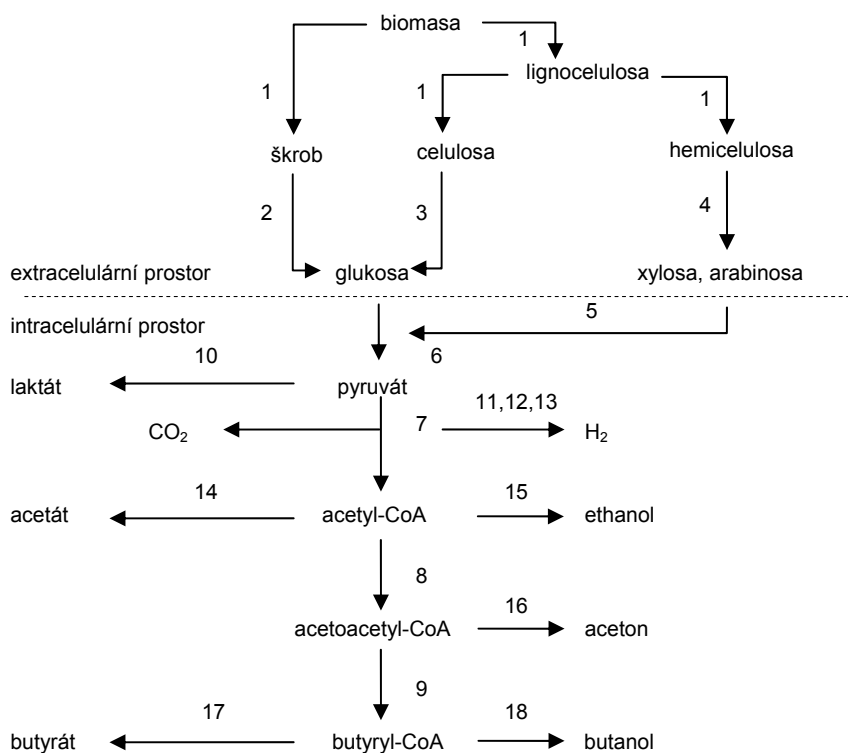
Počáteční zkušenosti s tvorbou rozpouštědel u klostridií naznačovaly, že regulace tvorby rozpouštědel je přímo spojená s regulací sporulace. Tento předpoklad však byl vyvrácen izolací mutantních, nesporulujících klostridiálních kmenů, tvořících rozpouštědla⁴. Nicméně podrobným mapováním procesu sporulace a sledováním morfologických změn kmene *C. acetobutylicum* P262 bylo zjištěno, že tvorba rozpouštědel není podmíněna proběhnutím kom-

pletní sporulace, ale že je nutné, aby se změnila morfologie klostridiálních buněk z tyčinkovitého tvaru do tzv. „typicky klostridiálního tvaru“ tj., aby buňky byly nafouklé, připomínající doutníčky nebo paličky. Pokud buňky nepodstoupí tuto morfologickou změnu, která je zároveň prvním předstupněm sporulace, nejsou ani schopné tvořit rozpouštědla^{10,11}. Toto pozorování bylo potvrzeno i nalezením genu *spo0A* u *C. beijerinckii* NCIMB 8052, který je zodpovědný jak za nastartování sporulace, tak za tvorbu rozpouštědel¹².

3. Možnosti využití škrobnatých a celulosových materiálů

Klostridia jsou schopná produkovat různé enzymy, které štěpí polysacharidy na monomery (obr. 1), např. α -amylasu, α -glukosidasu, β -amylasu, β -glukosidasu, glukoo-

amylasu, pullulanasu a amylopullulanasu^{7,13}. Příkladem škrobnatých materiálů, které mohou být použity pro výrobu biobutanolu jsou brambory, které jsou také původním substrátem, který byl při aceton-butanolovém kvašení používán. Patrně nejlepších výsledků s kmenem *C. beijerinckii* NRRL B592 bylo dosaženo při použití čistě bramborového média bez přidavku dalších látek, a proto jsou brambory velmi atraktivní surovinou pro zpracování ve velkém měřítku¹⁴. Experimenty s klostridiálními kmeny různých druhů porovnávaly použití brambor bez přidavku enzymového amylytického preparátu a s jeho přidavkem, přičemž bylo zjištěno, že kmeny z různých taxonomických skupin tvořících rozpouštědla jsou schopny využít bramborového škrobu i bez použití enzymových přípravků¹⁵. Kromě brambor byly jako další škrobnaté zdroje v minulosti i ve velkém měřítku s úspěchem používány další zemědělské plodiny – obilí, kukuřice a rýže a v laboratoři byly také testovány netradiční suroviny – topinambury a biomasa mořských řas⁴.



Obr. 1. Zjednodušená konverze rostlinné biomasy na rozpouštědla u bakterií rodu *Clostridium*; 1. předúprava zrna / lignocelulosy; 2. hydrolýza škrobu (α -amylasa, β -amylasa, pullulanasu, glukooamylasa, α -glukosidasu); 3. hydrolýza celulosy (celulasa, β -glukosidasu); 4. hydrolýza hemiceulosity; 5. absorpce xylosy/arabinosy a následná transformace transketolasovou-transaldolasovou sekvencí na fruktosa 6-fosfát a glyceraldehyd 3-fosfát postupnou metabolizací Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) drahou; 6. přenos glukosy fosfotransferasovým systémem a konverze na pyruvát EMP drahou; 7. pyruvát-ferredoxin oxidoreduktasa; 8. thiolasa; 9. 3-hydroxybutyl-CoA dehydrogenasa, krotonasa a butyryl-CoA dehydrogenasa; 10. laktát dehydrogenasa; 11. NADH-ferredoxin oxidoreduktasa; 12. NADPH-ferredoxin oxidoreduktasa; 13. hydrogenasa; 14. fosfát acetyltransferasa, acetát kinasa; 15. acetaldehyd dehydrogenasa, ethanol dehydrogenasa; 16. acetoacetyl-CoA:acetát/butyryl-CoA transferasa, acetoacetát dekarboxylasa; 17. fosfát butyltransferasa, butyrát kinasa; 18. butyraldehyd dehydrogenasa, butanol dehydrogenasa^{7,8}

Ačkoliv u kmene *C. acetobutylicum* ATCC 824 byly identifikovány geny pro tvorbu enzymů celulosomu a bylo prokázáno, že se řada těchto enzymů i exprimuje za podmínek indukce příslušným substrátem, celulosom jako celek není funkční a tento ani jiný rozpouštědlový kmen rodu *Clostridium* celulosu nedegraduje^{16,17}. Schopnost využívat celulosu je omezena na termofilní klostridia např. *C. thermocellum*, neprodukující rozpouštědla¹⁸. Z tohoto důvodu je při využití celulosových a lignocelulosových materiálů nutno přistoupit k předúpravě.

Velkoobjemové kvasné výroby používající lignocelulosové materiály využívají většinou techniku parní expanze k rozrušení lignocelulosy na hemicelulosu, lignin a celulosu. Dále jsou jednotlivé složky odděleny a celulosu zcukřena enzymovou hydrolyzou. Cukry získané z celulosy a hemicelulosy jsou pak následně použity jako substrát pro aceton-butanol-ethanolovou (ABE) fermentaci⁴. Většina monosacharidů a disacharidů, které se z lignocelulosových materiálů uvolní, jako jsou glukosa, celobiosa, galaktosa, mannososa, arabinosa a xylosa jsou přímo využitelné pro ABE fermentaci. Názory se však různí v tom, zda je v případě směsi těchto sacharidů přednostně využívána glukosa¹⁹ nebo zda se směs těchto sacharidů využívá příslušným klostridiálním kmenem simultánním způsobem²⁰.

Bylo zjištěno, že při alkalické hydrolyze lignocelulosových materiálů se tvoří soli, které vykazují inhibiční účinek na *C. beijerinckii* P260. Fermentační médium je pak nutno zbavit inhibitorů, má-li být fermentace úspěšná. Při kontrolních kultivacích, kde byla jako zdroj uhlíku použita glukosa, bylo zjištěno 21,37 g l⁻¹ ABE v porovnání s kultivacemi s hydrolyzátem zbaveným solí, kde koncentrace ABE dosáhla 22,17 g l⁻¹ a kultivací s neupraveným hydrolyzátem, kde bylo dosaženo jen 2,59 g l⁻¹ ABE (cit.²¹).

Pro využití odpadní zemědělské biomasy jako substrátu ABE fermentace lze použít kyselou hydrolyzu^{4,20,21}. Kyselá hydrolyza užívá ošetření materiálu zředěnou kyselinou sírovou za zvýšené teploty. Nevýhodou této metody je tvorba komplexní směsi mikrobních inhibitorů, mezi které patří furaldehyd, 5-hydroxymethylfuraldehyd (HMF), kyselina glukuronová, kyselina ferulová a kyselina o-kumarová^{4,20}.

Některé studie ukazují, že furaldehyd a jeho deriváty, vznikající při kyselou hydrolyze, v koncentracích překračujících 2 g l⁻¹, mají při ABE fermentaci 50% inhibiční efekt³. Při kultivaci *C. beijerinckii* BA101 však bylo zjištěno, že furaldehyd a 5-hydroxymethylfuraldehyd působí na růst tohoto mikroorganismu stimulačně, naopak výrazný inhibiční vliv na produkci rozpouštědel byl pozorován v přítomnosti 0,3 g l⁻¹ kyseliny ferulové (kompletní inhibice při 1 g l⁻¹) a 0,5 g l⁻¹ kyseliny *p*-kumarové²⁰.

Další možností předúpravy lignocelulosových materiálů pro ABE fermentaci je enzymová hydrolyza. Užití ligninolytických enzymů dřevokazných hub je další alternativou enzymové hydrolyzy, které ale prozatím brání nízká množství produkovaných enzymů za neindukčních podmínek²².

4. Uspořádání procesu

Vsádkové uspořádání procesu pro výrobu biobutanolu je omezeno produktivitou menší než 0,5 g l⁻¹ h⁻¹ z důvodu zejména nízké koncentrace buněk a produktové inhibice. U vsádkového uspořádání fermentace se dosahuje koncentrací klostridiálních buněk v bioreaktoru nižších než 4 g l⁻¹. Koncentraci buněk v bioreaktoru však lze zvýšit buď recyklací buněk nebo jejich imobilizací. Další nevýhodou použití vsádky je vysoká koncentrace zbytkového substrátu při počáteční koncentraci substrátu vyšší než 70 g l⁻¹ (cit.^{7,23,24}).

Kultivační proces s přítokem substrátu (fed-batch) obchází některé nevýhody vsádkového uspořádání, např. částečně eliminuje inhibiční produkty. Reaktor nejdříve pracuje vsádkově s nízkou koncentrací substrátu v malém objemu a poté se začne dávkovat koncentrované médium v množství odpovídajícím rychlosti spotřeby substrátu – reakční objem i koncentrace produktu se zvyšuje do doby, kdy nastane buď limitace substrátem, produktem nebo kdy je proces ukončen a produkt separován. Přítokované uspořádání se bohužel samostatně nehodí pro ABE fermentaci z důvodu vysoké toxicity butanolu k produkčním kmenům, a proto ho lze použít jen v případě, že je současně separován butanol z fermentačního média²⁴.

V posledních dekádách bylo provedeno mnoho studií zabývajících se alternativami butanolové fermentace a separací produktu. Tyto techniky využívají kontinuálního uspořádání procesu s imobilizovanými buňkami nebo s recyklem buněk v návaznosti na on-line separaci produktu⁷.

5. Separace produktu

Vypuzování rozpouštědel plynem (stripování) je technika, která může být použita pro získávání butanolu v průběhu ABE fermentace. Tato technika využívá probublávání fermentačního média plynem, který unáší těkavé látky z fermentoru do kondenzátoru, z kterého jsou po zkapalnění jímány. Suchý plyn se vrací do fermentoru a celý proces se opakuje. Na vypuzování lze použít inertní dusík nebo pro zlepšení ekonomiky procesu kvasný plyn, který je šetrný vůči mikrobiální kultuře. Kvasný plyn obsahuje především CO₂ a H₂. Použití tohoto procesu pro extrakci butanolu z média může zvýšit produktivitu reaktoru o více než 40 %. Koncentrace butanolu v kondenzátu dosahuje 8 %, což je několikrát více než koncentrace v kontrolních vsádkách^{2,4,7,24–27}.

Další metodou pro získávání butanolu z fermentačního média je extrakce kapalina-kapalina. Extrakce kapalina-kapalina využívá organického s vodou nemísitelného extrakčního činidla, ve kterém je butanol rozpustnější než ve vodě. Butanol se koncentruje v organické fázi, ze které se získává po oddělení od fermentačního média. Jako extraktant se obvykle používá olejilý alkohol pro jeho nízkou toxicitu a dobré extrakční vlastnosti. Další extrakční činidla, která byla pro extrakci kapalina-kapalina zkou-

šena, jsou např. dibutyl ftalát nebo methylovaný surový palmový olej. Jednou z výhod této metody je, že neodstraňuje z média substrát, vodu ani nutrienty. Extrakční činidlo se přidává k fermentačnímu médiu v poměru 1–1,5 : 1 (médiu : extraktant), míchá a následně přivádí do extraktoru, kde se oddělí organická a vodní fáze. Nevýhodou metody je toxicita extraktantu, možnost tvorby suspenzí (špatné dělení směsi), spotřeba extrakčního činidla. Zvýšení produktivity systému a zamezení hromadění buněk na mezifázovém rozhraní lze dosáhnout imobilizací buněk na matici^{7,28,29}.

Pertrakce je proces využívající principu extrakce kapalina-kapalina s oddělením kultivačního média od extraktantu pomocí membrány. Tato metoda má několik výhod proti klasické extrakci – neprojevuje se toxicita extraktantu na buňky kultury, nedochází k akumulaci buněk v extraktantu nebo na mezifázovém rozhraní a nedochází k tvorbě suspenzí. V systému s pertrakční membránou pak dochází k přednostní difuzi butanolu membránou, přičemž jiné komponenty média či fermentační meziprodukty zůstávají ve vodní fázi. Celkový přenos butanolu přes membránu tedy závisí na rychlosti difuze membránou⁷.

Pervaporace je technika, která umožňuje selektivní odstraňování těkavých organických látek z fermentačního média pomocí membrány, která je z jedné strany v kontaktu s fermentačním médiem, a proto mohou těkavé látky difundovat přes membránu. Požadované látky jsou pak získávány kondenzací par na opačné straně membrány. Tento proces nevykazuje nepříznivé účinky na fermentační mikroorganismy a je levnější než klasická destilace. Membrány se vyrábí ze silikonu, polypropylenu a mají v pórech imobilizovaný polypropylen-oleyl alkohol^{7,24,30}.

K odstraňování butanolu z fermentačního média adsorbci se používají např. silikáty, které jsou selektivní pro butanol a mají kapacitu okolo 90 mg g⁻¹ a 20 mg g⁻¹ pro aceton. Po adsorbci se butanol desorbuje sekvenčním zahříváním. Tato metoda poskytuje na výstupu koncentrovaný roztok butanolu (okolo 80 %). Silikát se po každém cyklu regeneruje zahřátím na 200 °C. Jiné testované adsorbenty jsou např. aktivní uhlí, polymerní pryskyřice, polyvinylpyridin a další³¹.

6. Závěr – vyhlídky do budoucnosti

Biobutanolová fermentace má v současnosti řadu omezení jako např. nízkou výtěžnost a produktivitu procesu způsobenou především malou tolerancí solventogenních klostridií k butanolu. Dalšími problémy jsou často pozorovaná degenerace použitého kmene, spočívající ve ztrátě nebo snížení schopnosti tvořit rozpouštědla a také citlivost produkčních kmenů k napadení bakteriofágem. Rovněž regulace metabolických drah není ještě zcela zvládnutá.

Pro možné průmyslové využití je proto jednou z možností genetické vylepšení klostridiálních kmenů používaných pro ABE fermentaci. K potřebné modifikaci metabolických cest solventogenních klostridií je používáno kombinace technologie využívající rekombinantní DNA

s klasickou mutagenézí a selekcí⁷. Další možností je pak izolace nových klostridiálních kmenů s technologicky výhodnějšími vlastnostmi; v nedávné době byl izolován nový kmen *C. butyricum* se značným potenciálem pro průmyslové využití při ABE fermentaci³².

Jinou alternativou je lepší zvládnutí jak techniky hydrolyzy lignocelulózových materiálů, tak izolace fermentačních produktů z kultivačního média, čímž by se zvýšila rentabilita celého procesu.

Tato studie byla zpracována s finanční podporou projektu NAZV č. QH81323/2008 a výzkumného záměru MSM6046137305.

LITERATURA

1. Lee S. Y., Park J. H., Jang S. H., Nielsen L. K., Kim J., Jung K. S.: *Biotechnol. Bioeng.*, v tisku.
2. Qureshi N., Saha B. C., Hector R. E., Hughes S. R., Cotta M. A.: *Biomass Bioenergy* 32, 168 (2008).
3. Claassen P. A. M., Budde M. A. W., López-Contreras A. M.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 39 (2000).
4. Jones D. T., Woods D. R.: *Microbiol. Rev.* 50, 484 (1986).
5. Rehm H. J., Reed G. (ed.), v knize: *Biotechnology*. Vol. 1, str. 298. VCH, Weinheim 1993.
6. Flickinger M. C., Drew S. W. (ed.): *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. Wiley, New York 1999.
7. Ezeji T. C., Qureshi N., Blaschek H. P.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 220 (2007).
8. Castaño D. M.: *Dizertace*. Technische Universität München, München 2003.
9. Terracciano J. S., Kashket E. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 86 (1986).
10. Jones D. T., van der Westhuizen A., Long S., Allock E. R., Reid S. J., Woods D. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1434 (1982).
11. Long S., Jones D. T., Woods D. R.: *Biotechnol. Lett.* 6, 529 (1984).
12. Ravagnani A., Jennert K. C. B., Steiner E., Grünberg R., Jefferies J. R., Wilkinson S. R., Young D. I., Tidswell E. C., Brown D. P., Youngman P., Morris J. G., Young M.: *Mol. Microbiol.* 37, 1172 (2000).
13. Badr H. R., Toledo R., Hamdy M. K.: *Biomass Bioenergy* 20, 119 (2001).
14. Nimcevic D., Schuster M., Gapes J. R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 426 (1998).
15. Gutierrez N. A., Maddox I. S., Schuster K. C., Swoboda H., Gapes J. R.: *Bioresour. Technol.* 66, 263 (1998).
16. Nölling J., Breton G., Omelchenko M. V., Makarova K. S., Zeng Q., Gibson R., Lee H. M., Dubois J., Qiu D., Hitti J.: *J. Bacteriol.* 183, 4823 (2001).
17. López-Contreras A. M., Gabor K., Martens A. A., Renckens B. A. M., Claassen P. A. M., van der Oost J., de Vos W. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5238 (2004).

18. Zhang Y-H. P., Lynd L. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 7321 (2005).
19. El Kanouni A., Zerdani I., Zaafa S., Znassni M., Loutfi M., Boudouma M.: World J Microbiol Biotechnol 14, 431 (1998).
20. Ezeji T., Qureshi N., Blaschek H. P.: Biotechnol. Bioeng. 97, 1460 (2007).
21. Qureshi N., Saha B. C., Hector R. E., Cotta M. A.: Biomass Bioenergy, v tisku.
22. Šušla M., Svobodová K.: Chem. Listy 100, 889 (2006).
23. Badr H. R., Toledo R., Hamdy M. K.: Biomass Bioenergy 20, 119 (2001).
24. Qureshi N., Ezeji T. C.: Biofuels Bioprod. Bioref. 2, 319 (2008).
25. Qureshi N., Saha B. C., Cotta M. A.: Biomass Bioenergy 32, 176 (2008).
26. Qureshi N., Li Xin-Liang, Hughes S., Saha B. C., Cotta M. A.: Biotechnol. Prog. 22, 673 (2006).
27. Qureshi N., Blaschek H. P.: Renewable Energy 22, 557 (2001).
28. Qureshi N., Maddox I. S.: J. Ferment. Bioeng. 80, 185 (1995).
29. Ishizakia A., Michiwakia S., Crabbea E., Kobayashia G., Sonomotoa K., Yoshinob S.: J. Biosci. Bioeng. 87, 352 (1999).
30. Qureshi N., Meagher M. M., Huang J., Hutkins R.W.: J. Membr. Sci. 187, 93 (2001).
31. Qureshi N., Hughes S., Maddox I. S., Cotta M. A.: Bioprocess Biosyst. Eng. 27, 215 (2005).
32. Montoya D., Arevalo C., Gonzales S., Aristizabal F., Schwarz W. H.: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27, 329 (2001).

J. Lipovský, P. Patáková, M. Rychtera, H. Čížková, and K. Melzoch (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Prospects of Butanol Production from Starch and Cellulose Materials**

An interest in butanol production technologies based on clostridial fermentation of various polysaccharides has recently revived. In particular starch materials were used in an original process. At present cellulose is considered to be superior for production of second-generation biofuels. Various modifications of the process are discussed.

PERSPEKTIVY AUTOMOBILŮ POHÁNĚNÝCH VODÍKEM

DALIBOR VOJTĚCH

*Ústav kovových materiálů a korozního inženýrství, VŠCHT
Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
Dalibor.Vojtech@vscht.cz*

Došlo 27.8.08, přijato 28.1.09.

Klíčová slova: vodík, vodíkový automobil, uskladnění vodíku, hydrid

Obsah

1. Úvod
2. Výhody a nevýhody vodíku jako paliva
3. Uskladnění vodíku
4. Závěr

1. Úvod

V poslední době se v médiích stále více objevují zprávy o vývoji automobilů poháněných vodíkem. Světové automobilky jako je General Motors, Toyota, BMW nebo Honda se předhánějí v tom, kdo dříve vyrobí vozidlo schopné běžného provozu s parametry odpovídajícími současným automobilům poháněným benzinem nebo naftou.

2. Výhody a nevýhody vodíku jako paliva

Vodík je lehký (cca 14× lehčí než vzduch) bezbarvý a reaktivní plyn. O jeho využití jako o palivu pro pohon automobilů se začíná stále více uvažovat vzhledem k neustále rostoucím cenám fosilních surovin ropy a plynu a vzhledem ke značné závislosti ekonomik vyspělého světa na producentech těchto surovin. Rovněž oteplování atmosféry způsobené skleníkovými plyny (zejména oxidem uhličitým) uvolňovanými při spalování benzínu a nafty je silným stimulem pro hledání alternativ. Při spalování vodíku totiž dochází k jeho reakci s kyslíkem přítomným ve vzduchu, přičemž vzniká pouze voda ve formě páry neškodná pro životní prostředí.

Na zemi je vodík součástí mnoha látek, ze kterých lze různými postupy získat (voda, uhlovodíky). Jako prvek se však vyskytuje poměrně vzácně. To je jeho nevýhoda v porovnání s fosilními surovinami. Na výrobu vodíku je totiž nutno nejprve vyrobit energii např. v jaderné elektrár-

ně a tu až poté využít na výrobu vodíku např. elektrolýzou z vody. Z pohledu energie je tedy vodík pouze nositelem nebo zásobníkem energie podobně jako baterie, nikoli jejím primárním zdrojem, jako je tomu u ropy a plynu. Pokud uvážíme, že by všech zhruba 500 milionů automobilů na světě bylo poháněno vodíkem, pro jeho výrobu by bylo třeba nepředstavitelného množství energie. Proto jsou intenzivně hledány energeticky účinné postupy výroby vodíku z levných surovin.

Spalování vodíku je možno realizovat po jeho smísení se vzduchem ve spalovacím prostoru motoru, přičemž energie uvolněná touto reakcí se mění na mechanický pohyb pístu. Tento přístup zvolila firma BMW u svého nového vodíkového prototypu Hydrogen 7 (cit.¹). Druhý přístup, u kterého je dle některých názorů získávána energie z vodíku s vyšší účinností, využívá palivových článků, což jsou zařízení, která přeměňují energii získanou reakcí vodíku a kyslíku na energii elektrickou. Ta je pak využívána k pohonu elektromotorů umístěných ve vozidle. Nedávno představený model Honda FCX Clarity využívá právě tohoto uspořádání².

Energie, kterou je možno získat spálením např. 1 kg vodíku je značná a je zhruba 2,6× vyšší než energie získaná z 1 kg benzínu. Avšak díky tomu, že vodík, a to i ve zkapalněném stavu, je velmi lehký (hustota zkapalněného vodíku je pouhých 70 kg m⁻³, přičemž hustota benzínu je cca 750 kg m⁻³), je pro získání stejného množství energie (pro ujetí stejné vzdálenosti) potřeba cca 4× větší objem zkapalněného vodíku než benzínu. V řeči spotřeby: Automobilu s průměrnou spotřebou benzínu 4 l/100 km odpovídá spotřeba zkapalněného vodíku 15 l/100 km. Má-li tedy např. benzinová nádrž objem 40 litrů, odpovídající nádrž na zkapalněný vodík potřebná pro ujetí stejné vzdálenosti by musela mít objem 150 litrů, což je zejména pro automobily nižší a střední třídy nepředstavitelné.

3. Uskladnění vodíku

Z výše uvedených údajů o značných objemových nárocích vodíku vyvstává zásadní otázka, kterou se v současnosti zabývají vědci i inženýři na celém světě: Jak uskladnit co největší hmotnost vodíku v co nejmenším objemu? Objem nádrže je obvykle omezen konstrukčním řešením vozidla a závisí na jeho velikosti, typu a třídě. Proto byl na základě požadavku co největší hmotnosti uskladněného vodíku Americkým energetickým úřadem (US Department of Energy (DoE)) stanoven doporučený minimální hmotnostní obsah vodíku ve vodíkovém zásobníku určeném pro automobily 6 % (cit.³). Nižší hmotnosti vodíku výrazně omezují akční rádius vozidel a tím je činí nekonkurenceschopnými vozidly na klasická paliva.

V současnosti jsou zvažovány čtyři hlavní metody

uchovávání vodíku^{3,4}:

1. zkपालnění a uchování v tepelně izolovaných zásobnících,
2. stlačení vysokým tlakem a uchování v tlakových nádobách,
3. uchování v pevné fázi – ve formě hydridů kovů nebo adsorpce v porézních materiálech s vysokým měrným povrchem.

U v současnosti vyráběných prototypů vodíkových automobilů je využíván zejména první způsob uchování vodíku, u kterého jsou dosahovány obsahy vodíku cca 10 %, což převyšuje minimální požadavek DoE. I tento způsob se však z energetického hlediska jeví poněkud problematickým, uvážíme-li, že zkपालnění vodíku vyžaduje teploty nižší než $-250\text{ }^{\circ}\text{C}$, což je extrémně energeticky náročné. Uvádí se, že zkपालnění spotřebuje až 30 % veškeré energie, kterou lze spálením vodíku získat. Kromě toho je třeba u zkपालněného vodíku počítat s jeho průběžnými ztrátami odparem, které činí kolem 1 % za den. Hlavní nevýhodou druhého způsobu – tedy uchovávání ve stlačeném stavu – je relativně nízký hmotnostní obsah vodíku. V klasických ocelových tlakových nádržích činí pouze zhruba 1 %, u novějších nádrží z kompozitů vyztužených uhlíkovými vlákny může dosahovat až k více než 5 %, avšak za cenu značně energetické náročnosti stlačování. Při uchovávání zkपालněného i stlačeného vodíku je rovněž třeba vzít v úvahu značné nároky na zabezpečení vodíkových systémů, neboť i malé úniky mohou mít katastrofální následky. Pro masivní využití zkपालněného nebo stlačeného vodíku bude nutno vybudovat rozsáhlou infrastrukturu zahrnující energetické zdroje, výroby vodíku, jeho dopravu a síť čerpacích stanic, což bude pravděpodobně proces trvající řadu let.

Poněkud odlišné principy a nároky má třetí způsob uchovávání vodíku – uchovávání v pevné fázi. Zde je největší pozornost věnována sloučeninám některých kovů s vodíkem – hydridům. Tyto sloučeniny jsou totiž v sobě schopny absorbovat značná množství vodíku převyšující komerční požadavky. Zejména hydridy na bázi lehkých kovů (Mg, Ca, Li, Na, Al) jsou v centru pozornosti pracovišť vyvíjejících automobily na vodíkový pohon. Tyto hydridy se obvykle vyrábějí syntézami kovů s plynným vodíkem za vysokých teplot a tlaků. Za normální teploty jsou stabilní, nerozkládají se a jsou tedy relativně bezpečnými zásobníky vodíku. K jejich rozkladu dochází až za vyšších teplot, přičemž se uvolňuje vodík, který je přiváděn k palivovému článku. Žádoucí je, aby rozklad probíhal za teplot jen mírně zvýšených ($150\text{--}200\text{ }^{\circ}\text{C}$), aby samotný ohřev hydridu nespotebovával nadměrné množství energie. Právě hledáním hydridů s nízkými teplotami rozkladu a s vysokými obsahy vodíku se v současnosti zabývá řada výzkumných a vývojových pracovišť. Jsou již navrženy účinné systémy schopné absorbovat vysoká množství vodíku, která se blíží a u některých dokonce převyšují 10 %. Jmenovat lze např. hydridy MgH_2 , LiBH_4 , NaBH_4 , NaAlH_4 , $\text{Mg}(\text{AlH}_4)_2$ a další⁴.

Automobil vybavený hydridovým systémem musí obsahovat zásobník hydridu, zařízení k jeho ohřevu a pali-

vový článek. Jistou nevýhodou tohoto systému je, že po rozkladu veškerého hydridu v zásobníku se produkty rozkladu musejí ze zásobníku odstranit a ten se musí znovu naplnit novým hydridem. Východiskem by mohly být hydridy schopné uvolnění vodíku a jeho opětovné absorpce opakovaně např. u speciálního čerpacího zařízení. Takové hydridy jsou sice v současnosti dostupné, ale obvykle se vyznačují nižšími obsahy vodíku, které jsou schopny uchovat. Proto se spíše nabízejí menší zásobníky na jedno použití, které by bylo možno snadno vyjmout a vyměnit za nové, přičemž jejich opětovné naplnění by probíhalo ve specializovaných pracovištích podobně, jako je tomu v současnosti např. u lahví se stlačenými plyny.

Jiný navržený systém založený na hydridech nevyužívá jako zdroje vodíku tepelného rozkladu hydridů, nýbrž jejich reakce s vodou. Pokud by byla využita voda odcházející jako odpad z palivového článku, je množství získaného vodíku dokonce ještě vyšší než je jeho obsah v hydridu, neboť část vodíku při reakci pochází z vody. Alternativou jsou „paliva“ ve formě suspenzí hydridu ve vodě nebo v oleji, u kterých je vývin vodíku iniciován buď přidávkem katalyzátoru nebo ve druhém případě vody. I u těchto systémů se „palivo“ musí po spotřebování hydridu vypustit, recyklovat a doplnit nové. Výhodou je, že není nutno vyvíjet složité a nákladné hydridy s nízkými rozkladnými teplotami.

Vodíkový systém založený na hydridech by vyžadoval menší nároky na infrastrukturu v porovnání se systémy pracujícími se stlačeným nebo zkपालněným vodíkem. Nutností by byly zdroje energie, výroby vodíku a hydridů a pracoviště pro recyklaci jejich zásobníků. Odpadla by však nutnost sítě čerpacích stanic, neboť zásobníky hydridů nebo jejich suspenze by principiálně mohly být dostupné u stávajících stanic. Hlavním faktorem, který pravděpodobně dosud brání masivnějšímu rozšíření systémů založených na hydridech, je vysoká cena těchto sloučenin. Odráží se zde poměrně komplikovaná cesta, která vede od výroby elementárních kovů, výroby vodíku, jejich transportu až po tlakovou syntézu hydridu. Uvážíme-li např. cenu hydridu NaBH_4 obsahujícího cca 10 % vodíku ve výši 80 USD kg^{-3} , pak při spotřebě 1 kg $\text{H}_2/100\text{ km}$ je cena za 1 km rovna 8 USD, což je nesrovnatelně více v porovnání s benzinem nebo naftou. Výrazné snížení ceny hydridů je tak základním předpokladem pro jejich výraznější zavedení do praxe. Zde se otevírá velké pole pro výzkum nových typů sloučenin a nových levnějších postupů jejich výroby.

4. Závěr

K masovějšímu zavedení vodíkových technologií do automobilového průmyslu v nejbližších letech brání vysoké ceny energií nutných pro výrobu, skladování a distribuci vodíku. Dalším důvodem je nedostatečná infrastruktura. Vodík se může stát konkurencí klasických paliv, pokud nové energetické zdroje a vylepšené postupy umožní jeho výrobu z vody ve velkých množstvích a za přijatelnou cenu. Systémy založené na uskladnění vodíku pomocí

hydridů nabízejí alternativu k čistému vodíku, neboť nevyžadují tak velké investice do infrastruktury. Tyto systémy však budou konkurenceschopné pouze tehdy, pokud ceny hydridů, např. díky novým postupům jejich výroby, výrazně poklesnou.

Autor příspěvku děkuje Grantové agentuře České republiky za finanční podporu výzkumu metod uchování vodíku ve formě hydridů kovů (projekt č. 104/09/0263). Také děkuje Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM 6046137302.

LITERATURA

1. <http://www.autobloggreen.com/2006/09/12/bmw-officially-announces-the-bmw-hydrogen-7/>, staženo 13.7.2008.
2. <http://automobiles.honda.com/fcx-clarity/> staženo, 13.7.2008.
3. Ross D. K.: *Vacuum* 80, 1084 (2006).
4. Eigen N., Keller C., Dornheim N., Klassen T., Borrmann R.: *Scripta Mater.* 56, 847 (2007).

D. Vojtěch (*Department of Metals and Corrosion Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Prospects of Hydrogen-Fuelled Cars**

Hydrogen has been considered a prospective fuel for future generations of cars. In the present review, various aspects of its use in this field are mentioned. Hydrogen is pure, i.e., it does not produce carbon dioxide in combustion. Moreover, it possesses a very high energy density. In contrast to fossil fuels, hydrogen is an energy carrier, i.e., it is first produced by an energy-consuming process, such as water electrolysis. In hydrogen-fuelled cars, it can be directly supplied into the combustion engine or converted to electric power in fuel cell. Hydrogen-fuelled cars are equipped with a safe and efficient hydrogen storage system. Various ways of hydrogen storage have been studied such as liquid or high-pressure hydrogen storage and storage in solid metal hydrides or in porous materials with high specific surfaces. The first two methods are currently used in the prototypes of hydrogen vehicles. The use of liquid or high-pressure hydrogen requires expensive infrastructure. Hydrogen storage in the form of light metal hydrides (MgH_2 , LiBH_4 , NaBH_4 , NaAlH_4 , $\text{Mg}(\text{AlH}_4)_2$) is a promising and safe alternative. The hydrides are stable at room temperature but they decompose to hydrogen at elevated temperatures or in the reaction with water. Unfortunately, their costs are high. At present, inexpensive methods of hydride preparation are the subject of extensive studies all over the world.

LIPOXYGENÁZY A ICH VÝZNAM V BIOCHEMICKÝCH PROCESOCH V RASTLINNÝCH ORGANIZMOCH

IVANA HOLKOVÁ, LÝDIA BEZÁKOVÁ,
MARIÁN VANKO, FRANTIŠEK BILKA
a MAREK OBLOŽINSKÝ

Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava
holkova@fpharm.uniba.sk

Došlo 15.2.08, prepracované 8.7.08, prijaté 6.8.08.

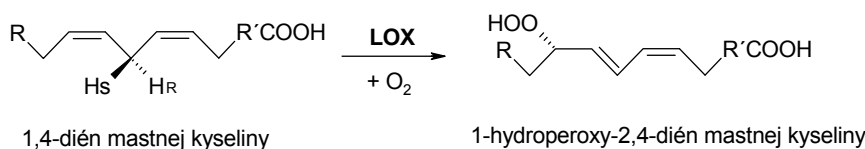
Kľúčové slová: lipoxygenáza, lipoxygenázová cesta, oxilipíny, kyselina jasmónová, signálne transdukčné procesy

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika a výskyt rastlinných lipoxygenáz
3. Lipoxygenázová cesta
4. Regulácia lipoxygenázovej cesty
5. Úloha LOX v semenách rastlín
6. Úloha LOX počas vegetatívneho rastu
7. Úloha LOX v obranných procesoch rastlín
8. Úloha LOX v programovanej smrti rastlinných buniek
9. Záver

1. Úvod

Lipoxygenázy (LOX, linoleát: oxygen oxidoreduktázy, EC 1.13.11.12) sú dioxygenázy obsahujúce nehémové železo, ktoré katalyzujú tvorbu hydroperoxidových derivátov polynenasýtených mastných kyselín. Tieto enzýmy boli predmetom intenzívneho výskumu predovšetkým v živočíšnych systémoch. Premenu kyseliny arachidónovej na kyselinu hydroperoxyeikozatetraénovú katalyzujú živočíšne LOX prvý krok v syntéze regulačných molekúl ako sú lipoxíny a leukotriény, ktoré sú mediátormi zápalových procesov a alergických reakcií v organizme.



Obr. 1. Reakcia katalyzovaná lipoxygenázou (LOX)

V porovnaní so živočíšnymi LOX je funkcia LOX v rastlinách doteraz oveľa menej objasnená. Lipoxygenázy majú aj v rastlinách ústredné postavenie v metabolickej ceste označovanej ako lipoxygenázová (oktadekánová) cesta, ktorej produkty majú funkciu ako rastové regulátory, antimikrobiálne a antifungálne zlúčeniny, aromatické látky a tiež ako signálne molekuly. Na základe funkcie produktov LOX cesty a tiež na základe vzájomného vzťahu medzi zvýšením expresie proteínu LOX a začiatkom špecifických procesov sa predpokladá účasť LOX počas rastu a vývinu rastlín a tiež v odpovedi rastlín na stres, ako je napríklad poranenie alebo infekcia rastlín patogénmi. V poslednom období sa stále viac vedeckých skupín venuje štúdiu lipoxygenáz izolovaných z rôznych rastlinných druhov. Získanie poznatkov o LOX je jedným z predpokladov pochopenia jej fyziologickej úlohy v rastlinnej bunke. Objasnenie funkcií LOX v rastlinách je komplikované prítomnosťou viacerých izoenzymových foriem LOX a ich rôznou tkanivovo-špecifickou a vývinovo regulovanou expresiou. Štúdium tohto enzýmu v rastlinách má význam nielen z hľadiska biochemického, ale vzhľadom na zapojenie LOX do procesov signalizácie a regulácie biosyntézy sekundárnych metabolitov, aj z hľadiska možného využitia získaných poznatkov vo farmácii a medicíne.

2. Charakteristika a výskyt rastlinných lipoxygenáz

Lipoxygenázy katalyzujú polohovo a priestorovo špecifickú adíciu molekuly kyslíka na polynenasýtené mastné kyseliny s *cis,cis*-1,4-pentadiénovou konfiguráciou (ako sú napr. kyselina linolová, kyselina linolénová alebo kyselina arachidónová) za tvorby príslušných hydroperoxidových derivátov (obr. 1). V rastlinách sú substrátmi LOX najmä kyselina linolová a linolénová, ktoré sú hlavnými polynenasýtenými mastnými kyselinami rastlinných membránových fosfolipidov.

Lipoxygenázy sa nachádzajú vo väčšine rastlinných orgánov, pričom ich aktivita sa mení v závislosti od stupňa vývinu a vplyvu stresových faktorov. Najvyššia aktivita LOX bola pozorovaná v kľúčiacich semenách a rýchlo sa deliacich pletivách¹. LOX sú monoméne proteíny

s molekulovou hmotnosťou 94–104 kDa. V rastlinách sa nachádza niekoľko izoenzymových foriem LOX. Zo semien sóje boli izolované tri izoenzy² LOX (L-1, L-2 a L-3) a ďalších päť izoenzymových foriem LOX bolo charakterizovaných v listoch sóje³, v hľuzách a listoch zemiakov boli identifikované tri izoenzymové formy⁴, štyri u paradajky⁵, dve izoformy boli izolované z cícera⁶ a tiež z kľúčnych listov uhorky⁷ a repky⁸. Jednotlivé izoenzy⁹ sa líšia svojimi vlastnosťami a subcelulárnou lokalizáciou. Väčšina rastlinných LOX sú solubilné enzýmy nachádzajúce sa v cytoplazme buniek⁹. Prítomnosť LOX však bola zistená aj v iných bunkových kompartmentoch – v stróme chloroplastov¹⁰, v lipidových telieskach¹¹, vo vakuolách¹², a tiež v mitochondriách¹³. LOX bola detegovaná aj v plazmatickej membráne¹⁴, v mikrozomálnych membránach¹¹ a v membráne chloroplastov¹⁵. Jednotlivé izoenzymové formy lipoxygenáz s rôznou vnútrobunkovou lokalizáciou majú aj rôznu funkciu v bunke. LOX prítomná v stróme chloroplastov je zodpovedná za syntézu signálnej molekuly – kyseliny jasmónovej indukovanej pri poranení rastliny¹⁵. LOX lipidových teliesok zabezpečuje mobilizáciu zásobných lipidov počas klíčenia semien olejnatých rastlín¹⁶. Lipoxygenázy prítomné vo vakuolách sú využívané ako vegetatívne zásobné proteíny¹.

3. Lipoxygénázová cesta

Metabolická cesta premeny vyšších polynenasýtených mastných kyselín prebiehajúca cez lipoxygenázou katalyzovanú reakciu a za ňou nasledujúce reakcie sú spoločne označované ako oktadekánová (lipoxygenázová) cesta. Hydroperoxydy polynenasýtených mastných kyselín, ktoré vznikajú pri LOX reakcii, sú ďalšími enzýmami metabolizované na biologicky aktívne zlúčeniny, nazývané oxylipíny. Tieto zlúčeniny vznikajúce v jednotlivých vetvách lipoxygenázovej cesty sú dôležité signálne molekuly (kyselina jasmónová, kyselina 12-oxo-fytodiérová), antimikrobiálne a antifungálne zlúčeniny (aldehydy, divinylétery), prechavé látky (alkoholy). Významnú funkciu majú v období vývinu rastliny a pri adaptácii rastliny na rôzne formy biotického alebo abiotického stresu.

V živočíšnych bunkách bola lipoxygenázová cesta skúmaná veľmi intenzívne, pretože vedie k syntéze eikozanoidov (leukotriénov, lipoxínov) dôležitých v niekoľkých fyziologických procesoch, napr. v zápalovej odpovedi charakteristickej pre alergické prejavy, ako sú astma, artritída, v chemotaktickej a mitogénnej odpovedi v bunkách hladkých svalov obehového systému¹⁷. Štruktúrna podobnosť týchto látok so zlúčeninami izolovanými z rastlín viedla k skúmaniu metabolickej cesty ich biosyntézy aj v rastlinách. Ako prvý lipoxygenázovú cestu v rastlinách popísali Vick a Zimmerman (1983)¹⁸ a potvrdili význam kyseliny jasmónovej v procesoch prenosu signálu. Iniciovali zvýšený záujem o štúdium signalizácie v rastlinách, čo viedlo k objaveniu aj ďalších bioaktívnych látok zo skupiny oktadekanoidov zúčastňujúcich sa na regulácii viacerých rastlinných odpovedí.

K adícii molekulového kyslíka na 18-uhlíkaté polynenasýtené mastné kyseliny (kyselinu linolovú alebo linolénovú) prostredníctvom LOX dochádza na jednom alebo druhom konci *cis,cis*-1,4-pentadiénovej štruktúry, teda na 9. alebo 13. atóme uhlíka. Môžu tak vzniknúť dva rôzne polohové izoméry (9*S*)-hydroperoxy- alebo (13*S*)-hydroperoxyderiváty polynenasýtených mastných kyselín, na základe čoho sú rastlinné LOX označované ako 9-LOX alebo 13-LOX. Vzniknuté 13- alebo 9-hydroperoxidové deriváty sú následne metabolizované v jednej z vetiev lipoxygenázovej cesty¹⁹. Na obr. 2 sú znázornené jednotlivé vetvy v prípade, že substrátom je kyselina linolénová (C 18:3) a jej dioxygenáciu katalyzuje 13-LOX. Produktom je kyselina 13-hydroperoxy-[9(*Z*),11(*E*),15(*Z*)]-oktadekatriénová (13-HPOT).

Peroxygenázová vetva

Enzým peroxygenáza (POX), nazývaná tiež hydroperoxidizomeráza, premieňa hydroperoxidové deriváty polynenasýtených mastných kyselín intramolekulovým prenosom kyslíka na epoxy- alebo dihydrodiol polyénové mastné kyseliny²⁰. Z 13-HPOT vzniká kyselina 15,16-epoxy-13-hydroxy-[9(*Z*),11(*E*)]-oktadekadiénová.

Divinylétersyntázová vetva

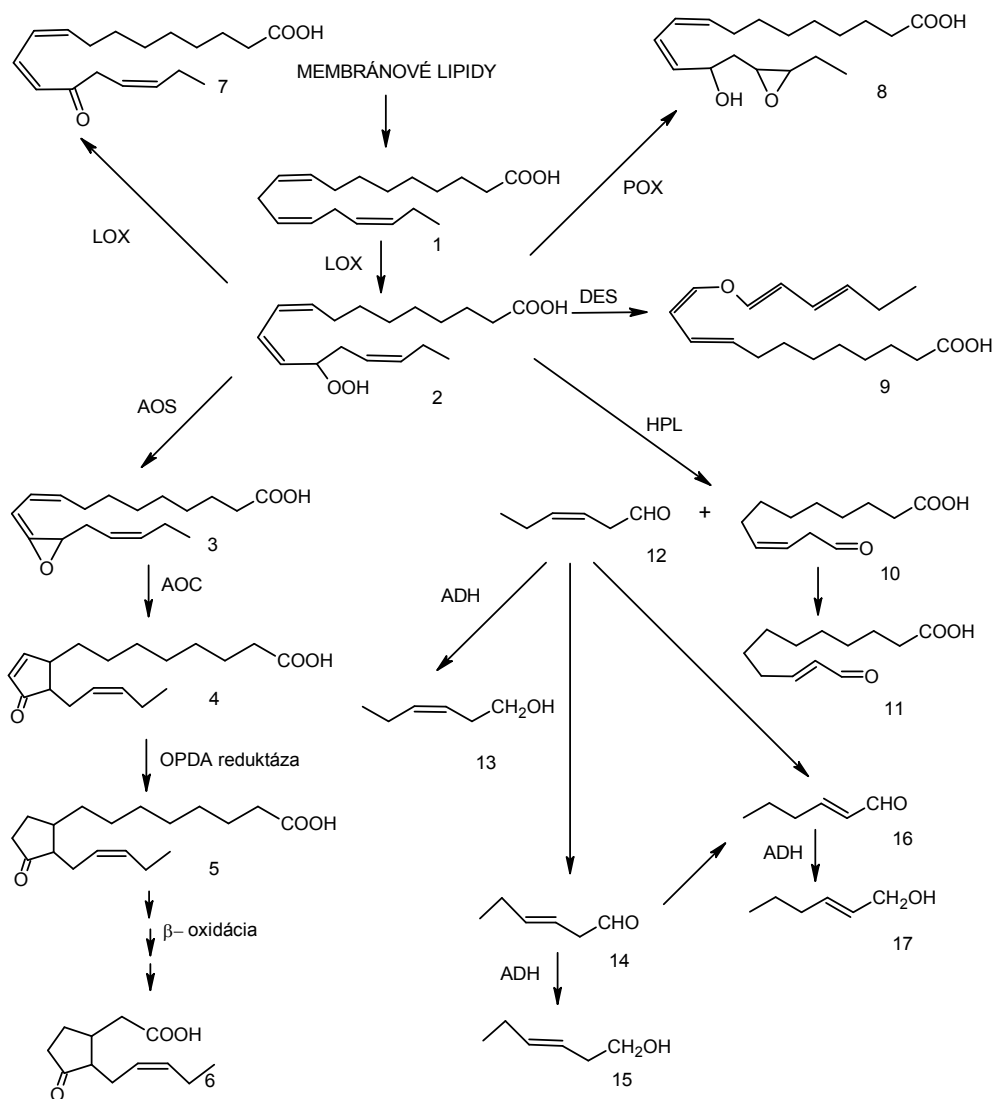
Produktami tejto metabolickej cesty katalyzovanej divinylétersyntázou (DES) sú divinylétery. Tieto látky sú dôležité pri obrane rastliny pred patogénmi^{21,22}.

Hydroperoxidlyázová vetva

Hydroperoxidlyáza (HPL) katalyzuje oxidatívne štiepenie uhlíkovodíkového reťazca 9- alebo 13-HPOT medzi hydroperoxidovým uhlíkom a uhlíkom susednej násobnej väzby (intramolekulová C-C väzba je destabilizovaná v dôsledku reaktívneho hydroperoxidu). Vznikajú aldehydy s krátkym reťazcom (C₆- alebo C₉-aldehydy) a oxokyseliny (C₁₂- alebo C₉-)²³. Z 13-HPOT (obr. 2) vzniká kyselina 12-oxo-9(*Z*)-dodecénová a 3(*Z*)-hexenal. Následne nastáva izomerizácia na stabilnejšie zlúčeniny: kyselinu 12-oxo-10(*E*)-dodecénovú (traumatín) a 3(*E*)-hexenal. Alkoholdehydrogenáza (ADH) môže ďalej redukovať hexenal na príslušný alkohol (hexenol), ktorý spolu s vytvoreným aldehydom zodpovedajú za špecifickú tzv. zelenú vôňu listov²⁴. Aldehydy tiež plnia dôležitú úlohu v obrane rastliny pri jej napadnutí patogénmi. Traumatín známy ako hormón poranenia sa ľahko oxiduje na kyselinu traumatínovú. Obidve látky sa zapájajú do hojenia poranení v rastlinných pletivách²⁵.

Allenoxidsyntázová vetva

Allenoxidsyntáza (AOS), nazývaná tiež hydroperoxid-dehydratáza, premieňa 13-HPOT na nestabilný epoxid kyselinu 12,13(*S*)-epoxy-[9(*Z*),11(*E*),15(*Z*)]-oktadekatriénovú (12,13-EOT). Tento epoxid je potom neenzymaticky hydrolyzovaný na α -ketol alebo γ -ketol, alebo je enzýmom allenoxicyklázou (AOC) cyklizovaný na biologicky aktívnu zlúčeninu – kyselinu 12-oxo-10,15(*Z*)-fytodiérovú (OPDA)²⁶. Následnou redukciou dvojitej väzby medzi 10.



Obr. 2. Lipoxygenázová metabolická cesta³¹. Dioxygenácia kyseliny linolénovej (C18:3) [1] katalyzovaná 13-lipoxygenázou – LOX. DES – divinylétersyntáza, HPL – hydroperoxidlyáza, ADH – alkoholdehydrogenáza, AOS – allenoxidsyntáza, AOC – allenoxidcykláza, OPDA reductáza – reductáza kyseliny 12-oxo-10,15(Z)-fytodiénovej. 2 – kyselina 13(S)-hydroperoxy-[9(Z),11(E),15(Z)]-oktadekatriénová (HPOT), 3 – kyselina 12,13(S)-epoxy-[9(Z),11(E),15(Z)]-oktadekatriénová, 4 – kyselina 12-oxo-10,15(Z)-fytodiénovej, 5 – kyselina 3-oxo-2(2'(Z)-pentenyl)-cyklopentan-1-oktánová, 6 – kyselina jasmónová, 7 – kyselina 13-keto-[9(Z),11(E),15(Z)]-oktadekatriénová, 8 – kyselina 15,16-epoxy-13-hydroxy-[9(Z),11(E)]-oktadekadiénová, 9 – kyselina eterolénová (divinyléter), 10 – kyselina 12-oxo-9(Z)-dodecénová, 11 – kyselina 12-oxo-10(E)-dodecénová (traumatín), 12 – 3(Z)-hexenal, 13 – 3(Z)-hexen-1-ol, 14 – 3(E)-hexenal, 15 – 3(E)-hexenol, 16 – 2(E)-hexenal, 17 – 2(E)-hexenol

a 11. atómom uhlíka OPDA-reduktázou (ako koenzým využíva NADH) vzniká kyselina 3-oxo-2(2'(Z)-pentenyl)-cyklopentan-1-oktánová (OPC), ktorá následne prechádza 3 cyklami β -oxidácie, pričom sa vytvára konečný produkt tejto vetvy lipoxygenázovej cesty – kyselina jasmónová (JA)¹⁸. JA aj OPDA sú významné signálne molekuly v odpovedi rastliny na rôzne formy stresu. Z kyseliny jasmónovej sa v rastlinách vytvárajú ďalšie metabolity s biologickou aktivitou ako napr. metyljasmonát, kyselina kurkubová (derivát JA s hydroxylovaným cyklopentáno-

vým kruhom) alebo konjugáty s aminokyselinami, najmä s leucínom a izoleucínom¹⁹.

Reduktázová vetva

Hydroperoxydy polynenasýtených mastných kyselín môžu byť redukované na hydroxyderiváty, ktoré majú antimikrobiálnu aktivitu. Mechanizmus redukcie ešte nie je presne objasnený, ale predpokladá sa účasť glutatiónu v tejto reakcii²⁷.

Lipoxygenázou katalyzovaná vetva

Za určitých podmienok je lipoxygenáza schopná katalyzovať homolytické rozštiepenie O-O väzby HPOT za vzniku alkoxidových radikálov, z ktorých sa následne vytvárajú ketodiény²⁸. Vznik ketoderivátov polynenasýtených mastných kyselín v lipoxygenázovej ceste bol potvrdený, avšak ich funkcia zostáva neobjasnená²⁹.

Epoxyalkoholsyntázová vetva

Táto vetva lipoxygenázovej cesty bola zatiaľ identifikovaná iba u rastlín čeľade *Solanaceae*. Pôsobením enzýmu epoxyalkoholsyntázy (EAS) dochádza k intramolekulovému preusporiadaniu 13- alebo 9-HPOT, pričom vznikajú epoxy-hydroxyderiváty polynenasýtených mastných kyselín²². Produkty tejto reakcie sú rovnaké ako produkty, ktoré sa vytvárajú v peroxygenázovej vetve lipoxygenázovej cesty, lišia sa iba stereochemicky. Predpokladá sa, že tieto látky majú funkciu v obranných reakciách rastlín³⁰.

4. Regulácia lipoxygenázovej cesty

V lipoxygenázovej ceste sa vytvárajú viaceré zlúčeniny s významnou biologickou funkciou. Hlavným miestom regulácie tejto metabolickej cesty je reakcia vzniku 9- alebo 13-hydroperoxidových derivátov katalyzovaná LOX, ktoré sú ďalej metabolizované v jednej zo siedmych vetiev lipoxygenázovej cesty. Lipoxygenázy poskytujú substráty pre aktivitu ďalších enzýmov tejto metabolickej cesty a zohrávajú tak kľúčovú úlohu¹⁹.

Najviac poznatkov o regulácii bolo zatiaľ získaných o AOS vetve. Expresia génov kódujúcich biosyntézu kyseliny jasmónovej je indukovaná poranením alebo pôsobením metyljasmonátu a systemínu. Tieto údaje boli experimentálne potvrdené v listoch zemiakov, rajčín a arabkovky, kde došlo k zvýšeniu syntézy mRNA 13-LOX, AOS a AOC^{5,32,33}. Biosyntéza JA je regulovaná nasledujúcimi faktormi: a) dostupnosťou substrátu, čo je výsledkom stimulačných faktorov a signálov z vonkajšieho prostredia; b) pletivo špecifickou tvorbou a akumuláciou kyseliny jasmónovej; c) metabolickou transformáciou JA na jej metylester alebo na prchavý degradačný produkt *cis*-jasmón¹⁹. Regulácie ďalších vetiev lipoxygenázovej cesty sú menej objasnené, predpokladá sa, že sú regulované dostupnosťou substrátu a tiež ďalšími regulačnými mechanizmami, ako sú fosforylácia /defosforylácia enzýmov³⁴ alebo degradácia enzýmov ubikvitináciou³⁵.

5. Úloha LOX v semenách rastlín

V semenách olejnatých rastlín sa LOX zúčastňuje mobilizácie zásobných lipidov počas klíčenia. U olejní sú lipidy hlavným zdrojom energie v tomto procese, kým v iných rastlinách napr. zemiakoch sa na produkciu ATP využívajú zásoby škrobu. Počas skorých štádií klíčenia dochádza k indukcii LOX a následne k oxidácii esterifikovaných polynenasýtených mastných kyselín v lipidových

telieskach. Oxidované mastné kyseliny v triacylglyceroloch sú následne prednostne odštiepované lipázami a uvoľňované z lipidových teliesok do cytoplazmy⁷⁶. Predpokladá sa, že slúžia ako substrát pre β -oxidáciu. Účast' LOX lipidových teliesok v skorých štádiách klíčenia bola experimentálne potvrdená v semenách uhorky (*Cucumis sativus* L.), tabaku (*Nicotiana tabacum* L.) a repky (*Brassica napus* L.)¹⁶.

V semenách podzemnice (*Arachis hypogaea* L.) bol gén kódujúci PnLOX1 indukovaný po infikovaní hubou *Aspergillus*. Produkty reakcie katalyzovanej PnLOX1 – 13-HPOT a 13-HPOD ovplyvňovali syntézu mykotoxínu, čo potvrdzuje funkciu tejto LOX v obranných reakciách³⁶. Taktiež pre LOX *Arabidopsis thaliana* sa predpokladá funkcia v obrane kľúčnych rastlín produkciou antimikrobiálnych látok, ale tiež v raste a vývine, ktorý je regulovaný produktami lipoxygenázovej cesty³⁷.

Zo semien sóje boli izolované 3 izoenzýmy LOX (L-1, L-2 a L-3)². Počas prvých dní klíčenia semien tieto izoenzýmy zaniknú a v kľúčnych listoch sú syntetizované tri ďalšie izoenzýmové formy LOX. Na rozdiel od LOX v semenách uhorky, sójové LOX v semenách aj v kľúčnych listoch nie sú asociované s lipidovými telieskami. Nachádzajú sa v cytoplazme alebo vakuolách. Pri klíčení semien sóje nedochádza k významnej oxidácii polynenasýtených mastných kyselín. Zistilo sa, že lipoxygenázy v semenách sóje sa nezúčastňujú na mobilizácii zásobných lipidov počas klíčenia, ale majú význam ako zásobné proteíny⁹. V listoch sóje bolo charakterizovaných ďalších 5 izoenzýmových foriem LOX označených ako vegetatívne lipoxygenázy (VLXA, VLXB, VLXC, VLXD a VLXE). Tieto LOX boli lokalizované tiež v cytoplazme a vakuolách. Zúčastňujú sa nielen v metabolizme lipidov, ale sú využívané aj ako vegetatívne zásobné proteíny v závislosti od potreby rastlín uskladiť nadbytok dusíka³.

6. Úloha LOX počas vegetatívneho rastu

Vývinový proces, ktorého aspekty boli intenzívne skúmané je tvorba hľúz u zemiakov. V zemiakoch boli izoenzýmy LOX detegované v hľuzách a v koreňoch. mRNA kódujúca LOX1 bola lokalizovaná v najaktívnejšie rastúcich častiach hľúz zemiakov. V transgénnych rastlinách, v ktorých bola aktivita LOX znížená, došlo k značnej redukcii tvorby hľúz. Hľuzy, ktoré sa vytvorili, boli zdeformované a menšie. Uvedené LOX sa zúčastňovali na kontrole rastu a vývoja hľúz iniciáciou syntézy oxylipínov, regulujúcich rast buniek počas ich tvorby. Konkrétne sa v tomto procese potvrdila úloha kyseliny tuberónovej (kyselina 12-hydroxyjasmónová)³⁸.

V rajčínach boli identifikované tri gény kódujúce LOX, označené ako TomloxA, TomloxB a TomloxC, ktoré boli aktívne počas dozrievania plodov. TomloxC kóduje LOX chloroplastov. Zistilo sa, že uvedené gény sú počas dozrievania plodov aktivované etylénom a doposiaľ bližšie neurčenými vývinovými faktormi. Predpokladá sa, že majú funkciu v obranných reakciách. LOX plodov sú tiež dôle-

žité v syntéze C6 aldehydov zodpovedných za typickú vôňu a chuť plodov rajčín a význam majú i v degradácii membrán tylakoidov pri premene chloroplastov na chromoplasty³⁹.

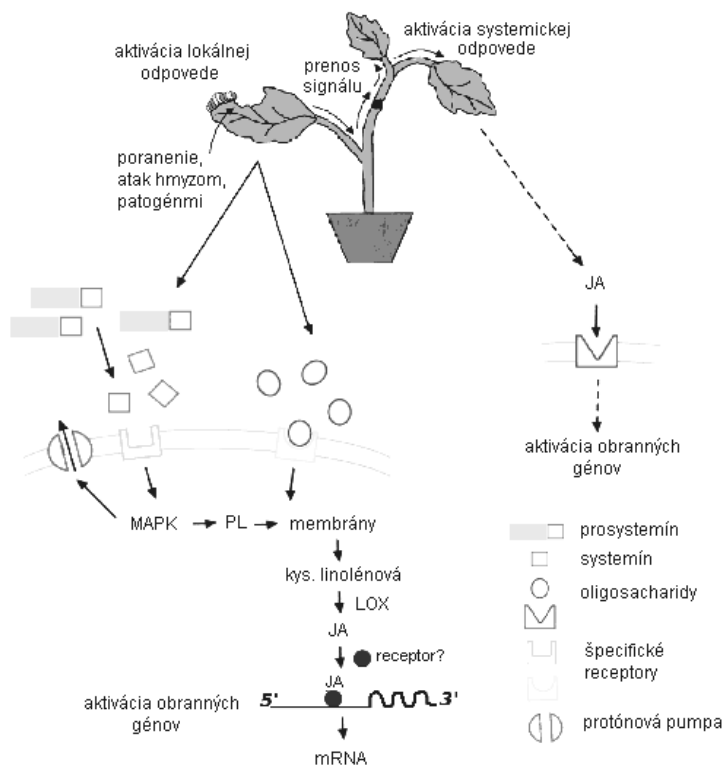
7. Úloha LOX v obranných procesoch rastlín

K aktivácii obranných procesov rastlín dochádza pri poranení, pri napadnutí rastlín škodcami alebo patogénmi. Tieto procesy vedú k zahojeniu poškodeného pletiva a tiež k aktivácii obranných mechanizmov s cieľom predísť ešte väčšiemu poškodeniu. Obranné mechanizmy indukované niekoľko minút prípadne hodín po poranení, pozostávajú zo syntézy (prípadne uvoľnenia) primárnych signálov, ich prijatia receptormi a následnej transmisie prostredníctvom špecifických signálnych molekúl, ktoré aktivujú transkripciu tzv. obranných génov. Proteíny kódované obrannými

génmi patria do rozličných kategórií. Sú to tzv. obranné proteíny ako napríklad inhibitory proteínáz a proteolytické enzýmy, alebo enzýmy zapojené do biosyntézy obranných sekundárnych metabolitov. Ďalšiu skupinu indukovaných proteínov tvoria proteíny zúčastňujúce sa signálnej transdukčnej cesty, ako napríklad lipoxygénáza a kalmodulín⁴⁰.

Pri poškodení určitej časti rastlinného pletiva dochádza nielen k aktivácii obranných reakcií v mieste poškodenia (tzv. lokálna odpoveď), ale aj v iných častiach rastlinného organizmu (tzv. systemická odpoveď) (obr. 3). V rastlinách sa vyvinula zložitá sieť signalizácie indukovaná pri poranení, v ktorej sa zúčastňujú viaceré, štruktúrne často veľmi odlišné molekuly napr. oligopeptid systemín⁴¹, oligosacharidy uvoľnené z poškodených bunkových stien⁴², H₂O₂⁴⁷ a molekuly s hormonálnou aktivitou ako sú jasmonáty^{43,44}, etylén⁴⁵ a kyselina abscisová⁴⁶.

Primárne signály spúšťajúce poranením aktivované obranné odpovede neboli doposiaľ jednoznačne definova-



Obr. 3. Schéma obranných procesov indukovaných pri poranení rastlín, ataku hmyzom alebo patogénmi (spracované podľa^{34,58}). Pri poranení rastlín, ataku hmyzom alebo patogénmi dochádza nielen k aktivácii obranných reakcií v mieste poškodenia (tzv. lokálna odpoveď), ale aj v iných častiach rastlinného organizmu (tzv. systemická odpoveď). Primárne signály (systemín uvoľnený z neaktívneho prekursora - prosystemínu, oligouronidy uvoľnené z poškodených bunkových stien) interagujú s receptormi v plazmatickej membráne buniek, čo je prvým krokom zložitej vnútrobunkovej signalizačnej kaskády pozostávajúcej z aktivácie MAP kináz (MAPK), ktoré moduluje aktivitu protónových púmp, ďalej aktivácie fosfolipáz (PL) a uvoľnenia kyseliny linolénovej z membrán, ktorá je lipoxygénázou (LOX) a ďalšími enzýmami oktadekánovej cesty premieňaná na kyselinu jasmónovú (JA). JA je významným sekundárnym poslom, ktorý aktivuje expresiu obranných génov, a to nielen v mieste poškodenia, ale aj vo vzdialenejších nepoškodených častiach rastlín

né. Indukcia obranných odpovedí si často vyžaduje súčasné pôsobenie viacerých signálnych molekúl, ktoré môžu byť rozdielne u jednotlivých rastlinných druhov³⁴. Primárnym signálom sú napríklad oligosacharidy, ktoré sa pri poranení uvoľňujú z poškodených bunkových stien. Doares a spol. (1995)⁴² experimentálne dokázali, že oligouronidy z bunkových stien rastlín a chitosan pochádzajúci z bunkových stien húb indukovali po aplikácii v listoch rajčín (*Lycopersicon esculentum*) expresiu inhibítorov proteínáz. Oligosacharidy majú veľmi obmedzenú pohyblivosť, a preto je ich aktivita v signalizácii pri poranení spojená iba s aktiváciou obranných reakcií v mieste poškodenia – v tzv. lokálnej odpovedi⁴⁸. Ďalším signálom, ktorý indukoval expresiu obranných génov bol systemín. Je to peptid pozostávajúci z 18 aminokyselín, ktorý vzniká limitovanou proteolýzou – odštiepením C-konca z neaktívneho 200 aminokyselín obsahujúceho prekurzora prosystemínu. Prítomnosť systemínu bola zatiaľ potvrdená iba u rastlín z čeľade *Solanaceae*⁴⁹. Systemín uvoľňovaný z poškodených miest sa viaže na špecifický receptor v membráne okolitých buniek a prenáša signál aj do vzdialenejších nepoškodených častí rastliny⁴¹. Je mobilným signálom dôležitým v tzv. systemickej odpovedi rastlín na poranenie³⁴.

Vplyvom uvedených primárnych signálov dochádza pri poranení rastlín k aktivácii oktadekánovej (lipoxygénazovej) cesty biosyntézy kyseliny jasmónovej (JA)^{50–52}. Predpokladá sa, že tieto signály interagujú s receptormi v membráne rastlinných buniek, pričom sa aktivujú procesy, ktoré vedú k rýchlemu zvýšeniu vnútrobunkovej hladiny JA. JA je derivátom kyseliny linolénovej, najviac zastúpenej mastnej kyseliny v lipidoch membrán v rastlinách. Predpokladá sa, že kyselina linolénová je uvoľnená z membránových lipidov pôsobením fosfolipázy A₂ a následne sa stáva substrátom LOX, počiatočného enzýmu oktadekánovej cesty⁵⁰.

Potvrdením zapojenia oktadekánovej cesty v procesoch signalizácie smerujúcich k aktivácii obranných génov bolo identifikovanie niekoľkých inhibítorov, ktoré blokujú túto cestu. Napríklad dietylditiokarbamát sodný a salicylát sodný. Uvedené látky inhibovali oktadekánovú dráhu a syntézu inhibítorov proteínáz v odpovedi na poranenie, systemín a oligouronidy⁴². Inhibícia prostredníctvom dietylditiokarbamátu sodného spočívala v premene 13-HPOT (produkty reakcie katalyzovanej LOX) na 13-HOT, ktoré už nie sú intermediátmi v biosyntéze JA. Salicylát sodný blokoval oktadekánovú cestu na úrovni allenoxidsyntázy⁵³. Efekty týchto inhibítorov sa zhodujú s hypotézou, že molekuly primárnych signálov vytvorené pri poranení aktivujú expresiu obranných génov cez oktadekánovú dráhu. Táto dráha je tiež pozitívne alebo negatívne regulovaná kyselinou abscisovou a kyselinou indolactovou⁵⁴. V listoch ryže bola potvrdená recipročná regulácia oktadekánovej cesty kyselinou jasmónovou a kyselinou salicylovou pri odpovedi rastlín na poranenie⁵⁵.

Kyselina jasmónová je významným sekundárnym poslom aktivujúcim transkripciu génov a následne syntézu obranných sekundárných metabolitov a proteínov. Dopa-

siaľ bolo získaných len veľmi málo poznatkov týkajúcich sa mechanizmu gémovej aktivácie v odpovedi na poranenie. Analýzou 5' regulačných oblastí génov, ktoré sú aktivované JA, bola zistená prítomnosť konsenzus sekvencií, o ktorých sa predpokladá, že sa zúčastňujú v regulácii gémovej expzie touto molekulou^{56,57}. Štúdiu zapojenia JA a jej derivátov v procesoch odpovede rastlín na poranenie bola venovaná veľká pozornosť, avšak nielen JA, ale aj jej deriváty napr. metyljasmonát a aj iné produkty oktadekánovej cesty sú syntetizované pri poranení a zúčastňujú sa v týchto procesoch⁴³.

Potvrdená bola tiež úloha kyseliny 12-oxo-fyto-diénovej (OPDA, prekurzor kyseliny jasmónovej) ako signálnej molekuly⁵⁹. OPDA je dokonca výraznejším aktivátorom expzie génov ako samotná JA. V súčasnosti je OPDA považovaná za hlavnú signálnu molekulu vo väčšine rastlinných druhov, zatiaľ čo JA zostáva aktívnym metabolitom svojho prekurzora. Experimentálne sa však dokázalo, že JA na rozdiel od OPDA je sekretovaná z buniek do extracelulárneho média, čo naznačuje funkciu JA aj ako medzibunkovej signálnej molekuly⁶⁰. JA je mobilným sekundárnym signálom, podobne ako systemín, prenáša signál z miesta poškodenia aj do iných častí rastlinného organizmu, avšak menšia a rozpustnejšia kyselina jasmónová umožňuje prenos signálu na väčšie vzdialenosti³⁴.

Ďalšími oxylipínmi s funkciou v obranných procesoch rastlín sú produkty HPL vetvy oktadekánovej cesty: C12-oxokyseliny (traumatín), C6 aldehydy a alkoholy. Tieto látky sú syntetizované pri poranení a slúžia tiež ako signálne molekuly. U *Arabidopsis 2(E)*-hexenal indukuje skupinu obranných génov⁶¹. K vyššej produkcii prchavých látok uvoľňovaných rastlinou dochádza najmä pri ataku rastlín hmyzom. Tieto látky majú iné zloženie ako látky uvoľňované nepoškodenými rastlinami⁶². Niektoré pôsobia ako atraktanty prirodzených predátorov hmyzu, ktorý napadol rastlinu⁶³. V obranných reakciách sa zúčastňujú aj produkty peroxygénazovej a divinylétersyntázovej vetvy lipoxygénazovej cesty^{20,64}.

Odpoveď rastlín na poranenie, atak hmyzom alebo patogénmi si vyžaduje aktiváciu zložitej siete vzájomne regulovaných signalizačných kaskád, v ktorých sa významným spôsobom zúčastňujú aj od lipidov odvodené oxylipíny^{34,65,66}. LOX sa svojím postavením na počiatku lipoxygénazovej cesty biosyntézy týchto látok zapája do obranných procesov rastlín. Potvrdením boli aj experimentálne výsledky získané Arimurou a spol. (2000)⁶², ktorí dokázali, že inhibícia tohto enzýmu vedie k blokovaniu expzie jasmonátmi aktivovaných obranných génov. V odpovedi rastlín na poranenie bola potvrdená účasť chloroplastovej izoenzymovej formy LOX u arabkovky (*Atlox2*)¹⁵, zemiakov (*H3*)⁶⁷ a v listoch rajčín⁵ a mučenky⁶⁸. Na základe toho možno konštatovať, že syntéza jasmonátov je iniciovaná v chloroplastoch. Dôkazom bolo aj zistenie, že pri poranení dochádza k zníženiu obsahu monogalaktozyl-diacylglycerolov v membráne chloroplastov, o ktorých sa predpokladá, že sú zdrojom kyseliny linolénovej pre biosyntézu jasmonátov⁶⁹. Porta a spol. (1999)⁷⁰ experimentálne potvrdili, že k aktivácii LOX

dochádza aj po exogénnej aplikácii JA, čo predpokladá tzv. feed-back mechanizmus regulácie oktaadekánovej cesty.

8. Úloha LOX v programovanej smrti rastlinných buniek

Lipoxygenázou katalyzovaná oxidácia lipidov sa zúčastňuje degradácie membrán pri tzv. hypersenzitívnej odpovedi rastlinných buniek na atak patogénov, pri ktorej dochádza k smrti rastlinných buniek v mieste infekcie⁷¹. Hypersenzitívna odpoveď je charakterizovaná stratou integrity membrán a je spojená s tvorbou peroxidov lipidov a kyslíkových radikálov. Experimentálne výsledky poukazujú najmä na peroxid vodíka, ktorého aj malé množstvá viedli k aktivácii hypersenzitívnej odpovede v bunkách sóje. Indukcia hypersenzitívnej odpovede a následnej bunkovej smrti bola spojená s aktiváciou LOX⁷². Podobné výsledky boli pozorované aj na listoch fazule⁷³, papriky⁷⁴ a tabaku⁷¹ po infikovaní patogénmi. Zistilo sa tiež, že produkty LOX reakcie 9- alebo 13-hydroperoxydov polynenasýtených mastných kyselín, ako aj ich redukované formy, boli schopné indukovať fragmentáciu DNA a bunkovú smrť. Pri použití inhibítorov LOX alebo inhibičných anti-LOX monoklonálnych protilátok, ktoré blokovali aktivitu LOX bez ovplyvnenia oxidačného stavu bunky, nedošlo k oxidačným stresom indukovanej smrti buniek⁷⁵. Uvedené experimenty poskytli dôkaz o účasti lipoxygenáz v procesoch indukcie programovanej smrti rastlinných buniek.

9. Záver

Lipoxygenázy sú v živočíšnych aj v rastlinných organizmoch na počiatku metabolických dráh, ktorých produkty majú viaceré dôležité biologické funkcie. Predovšetkým je významné zapojenie LOX do transdukcie signálov a bunkových regulačných procesov. LOX svojim postavením na počiatku týchto metabolických ciest ovplyvňuje dostupnosť substrátov pre enzýmy v jej ďalších vetvách a stáva sa tak významným miestom regulácie. Výskum v tejto oblasti priniesol v posledných rokoch viac poznatkov vedúcich k lepšiemu poznaniu a pochopeniu lipoxygenázovej cesty a jej významu aj v rastlinách. Prvou preskúmanou skupinou látok, ktoré sa vytvárajú v jednej zo siedmych doposiaľ popísaných vetiev lipoxygenázovej cesty, boli jasmonáty – dôležité v signálne transdukčných procesoch rastlín. Avšak aj produkty tvoriace sa v ďalších vetvách lipoxygenázovej cesty majú významnú biologickú funkciu. V poslednom období narastajú poznatky o subcelulárnej lokalizácii, štruktúre, mechanizme katalýzy rastlinných lipoxygenáz. Klonovanie, expresia a funkčná analýza génov kódujúcich jednotlivé izoenzymové formy lipoxygenáz, ako aj snahy o kryštalizáciu purifikovaných enzýmov prispievajú k získavaniu nových poznatkov o úlohe lipoxygenáz v rastlinách.

LITERATÚRA

- Porta H., Rocha-Sosa M.: *Plant Physiol.* 130, 15 (2002).
- Axelrod B., Cheesborough T. M., Laasko S.: *Meth. Enzymol.* 71, 441 (1981).
- Fuller M. A., Weichert H., Fisher A. M., Feussner I., Grimes H. D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 146 (2001).
- Rojo J., Vancanney G., Pérez A. G., Sanz C., Störmann K., Rosahl S. Sanchez-Serrano J. J.: *J. Biol. Chem.* 271, 21012 (1996).
- Heitz T., Bergey D. R., Ryan C. A.: *Plant Physiol.* 114, 1085 (1997).
- Sanz L. C., Perez A. G., Rios J. J., Olias J. M.: *Phytochemistry* 31, 3381 (1992).
- Matsui K., Irie M., Kajiwara T., Kakuno T., Hatanaka A.: *Phytochemistry* 32, 1387 (1993).
- Terp N., Brandt A.: *Biochem. Soc. Trans.* 28, 832 (2000).
- Siedow J. N.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 145 (1991).
- Douillard R., Bergeron E.: *Plant Sci. Lett.* 22, 263 (1981).
- Feussner I., Kindl A.: *Planta* 194, 22 (1994).
- Tranbarger T., Franceschi V., Hildebrand D., Grimes H.: *The Plant Cell* 3, 973 (1991).
- Braidot E., Petrusa E., Micolini S., Tubaro F., Vianello A., Macri F.: *J. Exp. Botany* 2004, 2.
- Nellen A., Rojahn B., Kindl H.: *Z. Naturforsch Teil C.* 50, 29 (1995).
- Bell E., Creelman R. A., Mullet J. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8675 (1995).
- Feussner I., Wasternack C., Kindl H., Kühn H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11849 (1995).
- Izumi T., Hoshiko S., Radmark O., Samuelsson S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7477 (1990).
- Vick B. A., Zimmerman D. C.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111, 470 (1983).
- Feussner I., Wasternack C.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 52, 275 (2002).
- Bleé E.: *Fett. Lipid* 100, 121 (1998).
- Grechkin A.: *Prog. Lipid Res.* 37, 317 (1998).
- Hamberg M.: *Lipids* 34, 1131 (1999).
- Matsui K.: *Belg. J. Bot.* 131, 50 (1998).
- Hatanaka A.: *Phytochemistry* 34, 1201 (1993).
- Croft K.P.C., Jüttner F., Slusarenko A. J.: *Plant Physiol.* 101, 13 (1993).
- Hamberg M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 543 (1998).
- Weichert H., Stenzel I., Berndt E., Wasternack C., Feussner I.: *FEBS Lett.* 464, 133 (1999).
- Kühn H., Weisner R., Rathmann J., Schewe T.: *Eicosanoids* 4, 9 (1991).
- Vollenweider S., Weber H., Stolz S., Chetelat A., Farmer E. E.: *Plant J.* 24, 467 (2000).
- Göbel C., Feussner I., Schmidt A., Scheel D., Sanchez-Serrano J.: *J. Biol. Chem.* 276, 6276 (2001).

31. Shaller F.: *J. Exp. Bot.* 52, 11 (2001).
32. Howe G. A., Lee G. I., Itoh A., Li L., De Rocher A. E.: *Plant Physiol.* 123, 711 (2000).
33. Laudert D., Weiler E. W.: *Plant J.* 15, 675 (1998).
34. León J., Rojo E., Sánchez-Serrano J. J.: *J. Exp. Bot.* 52, 1 (2001).
35. Xie D. X., Feys B. F., James S., Nietorostro M., Turner J. G.: *Science* 280, 1091 (1998).
36. Burow G. B., Gardner H. W., Keller N. P.: *Plant Mol. Biol.* 42, 689 (2000).
37. Melan M. A., Enriquez A. L. D., Peterman T. K.: *Plant Physiol.* 105, 385 (1994).
38. Kolomiets M. V., Hannapel D. J., Chen H., Tymeson M., Gladon R. J.: *Plant Cell* 13, 613 (2001).
39. Griffiths A., Barry C., Alpuche-Solis A. G., Grierson D.: *J. Exp. Bot.* 50, 793 (1999).
40. Bergey D. R., Howe G. A., Ryan C. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12053 (1996).
41. Yin Y., Wu D., Chory J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9090 (2002).
42. Doares S. H., Syrovets T., Weiler E. W., Ryan C. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4095 (1995).
43. Farmer E. E., Ryan C. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7713 (1990).
44. Mueller M. J., Gundlach H., Parchmann S.: *Plant Physiol.* 115, 1057 (1997).
45. O'Donnell P. J., Calvert C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H. M. O., Bowles D. J.: *Science* 274, 1914 (1996).
46. Peña-Cortés H., Sánchez-Serrano J. J., Mertens R., Willmitzer L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9851 (1989).
47. Orozco-Cárdenas M. L., Narváez-Vásquez J., Ryan C. A.: *Plant Cell* 13, 179 (2001).
48. Baydoun E. A. H., Fry S. C.: *Planta* 165, 269 (1985).
49. Constabel C. P., Yip L., Ryan C. A.: *Plant Mol. Biol.* 36, 55 (1998).
50. Farmer E. E., Ryan C. A.: *Plant Cell* 4, 129 (1992).
51. Mueller M. J., Brodschelm W., Spannagl E., Zenk M. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 490 (1993).
52. Peña-Cortés H., Fisahn J., Willmitzer L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4106 (1995).
53. Harms K., Ramirez I., Peña-Cortés H.: *Plant Physiol.* 118, 1057 (1998).
54. Kernan A., Thornburg R. W.: *Plant Physiol.* 91, 73 (1989).
55. Lee A., Cho K., Jang S., Rakwal R., Iwahashi H., Agrawal G. K., Shim J., Han O.: *Biochem. Biophys. Res. Com.* 318, 734 (2004).
56. Kim S. R., Choi J. L., Costa M. A., An G.: *Plant Physiol.* 99, 627 (1992).
57. Mason H. S., DeWald D. B., Mullet J. E.: *Plant Cell* 5, 241 (1993).
58. Stratmann J., Scheer J., Ryan C. A.: *PNAS* 97, 8862 (2000).
59. Bleichert S., Brodschelm W., Hölder S., Kammerer L., Kutchan T. M., Xia Z. Q., Zenk M. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4099 (1995).
60. Parchmann S., Gundlach H., Mueller M. J.: *Plant Physiol.* 115, 1057 (1997).
61. Bate N. J., Rothstein S. J.: *Plant J.* 16, 561 (1998).
62. Arimura G., Ozawa R., Shimoda T., Nishioka T., Bolland W., Takabayashi J.: *Nature* 406, 512 (2000).
63. Agrawal A. A.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 329 (2000).
64. Weber H., Chételat A., Caldelari D., Farmer E. E.: *Plant Cell* 11, 485 (1999).
65. Devoto A., Turner J. G.: *Ann. Bot.* 92, 329 (2003).
66. Halitschke R., Baldwin I. T.: *J. Plant Growth Regul.* 23, 238 (2005).
67. Royo J., León J., Vancanneyt G., Albar J. P., Rosahl S., Ortego F., Castañera P., Sánchez-Serrano J. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1146 (1999).
68. Rangel M., Machado O. L. T., Cunha M., Jacinto T.: *Phytochemistry* 60, 619 (2002).
69. Conconi A., Mique I. M., Browse J. A., Ryan C. A.: *Plant Physiol.* 111, 797 (1996).
70. Porta H., Rueda-Benítez P., Campos F., Colmenero-Flores J. M., Colorad J. M., Carmona M. J., Covarrubias A. A., Rocha-Sosa M.: *Plant Cell Physiol.* 40, 850 (1999).
71. Rustérucci C., Montillet J.-L., Agnel J.-P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J.-J., Etienne P., Suty L., Blein J.-P.: *J. Biol. Chem.* 274, 36446 (1999).
72. Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C.: *Cell* 79, 583 (1994).
73. Croft K. P. C., Voisey C. R., Slusarenko A. J.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36, 49 (1990).
74. Buonaurio R., Servili M.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54, 155 (1999).
75. Maccarrone M., Van Zadelhoff G., Veldink G. A., Vliegthart J. F. G., Finazzi-Agrò A.: *Eur. J. Biochem.* 267, 5078 (2000).
76. Feussner I., Kühn H., Wasternack C.: *Trends Plant Sci.* 6, 268 (2001).

I. Holková, L. Bezáková, M. Vanko, F. Bilka, and M. Obložinský (*Department of Cell and Molecular Biology of Pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava*): **Lipoxygenases and Their Significance in Biochemical Processes in Plant Organisms**

Lipoxygenases (LOX; linoleate: oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.12) are a family of dioxygenases that do not contain hem-bonded iron at the active site. They catalyze peroxidation of polyunsaturated fatty acids, in particular linolic and linolenic acids, which gives hydroperoxy derivatives of (9*S*)- or (13*S*)-polyunsaturated fatty acids (9-LOX or 13-LOX, respectively). Lipid peroxidation is important in plant evolution and for their response to various forms of stress, both of biotic and abiotic origin. LOX is the starting enzyme of the lipoxygenase metabolic pathway producing oxylipins such as signal molecules, antimicrobial and antifungal compounds.



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Česká společnost chemická
Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha

Pořádají ve dnech 11. až 13. listopadu 2009 mezinárodní konferenci

Polysacharidy V.

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

Okruhy:

Produkce polysacharidů a jejich derivátů.

Charakterizace a analýza polysacharidů z přírodních zdrojů.

Fyziologické účinky polysacharidů.

Biodegradabilní plasty na bázi polysacharidů.

Plenární přednášky:

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

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

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

Jazyk: anglický a český

Termín podání abstrakt: 30.6.2009

Termín podání přihlášek: 15.9.2009

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

URČOVÁNÍ MIKROSTRUKTURNÍCH DESKRIPTORŮ Z DIGITÁLNÍCH SNÍMKŮ PÓROVITÝCH LÁTEK

VLADIMÍR HEJTMÁNEK^a, PAVEL ČAPEK^b,
LIBOR BRABEC^c, ARLETTE ZIKÁNOVÁ^c
a MILAN KOČIŘÍK^c

^a Ústav chemických procesů, v.v.i., AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha, ^b Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha, ^c Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, v.v.i., AV ČR, Dolejškova 3, 182 23 Praha
hejtmánek@icpf.cas.cz

Došlo 29.10.07, přijato 11.2.08.

Klíčová slova: nábrus, zpracování digitálních snímků, fázová funkce, pórovitost, dvoubodová pravděpodobnostní funkce, specifický povrch

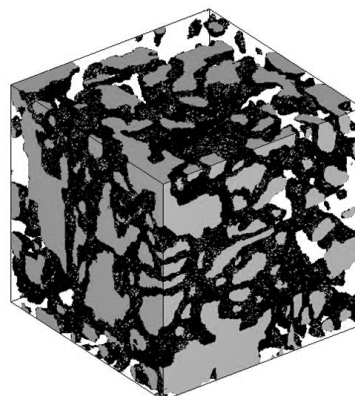
1. Úvod

Prakticky a teoreticky zajímavou skupinu pevných látek tvoří tzv. nestejnorodé materiály, které se vyznačují prostorově náhodným rozložením fází vytvářejících materiál. Mezi nestejnorodé materiály patří také pórovité látky, které v nejjednodušším případě představují dvoufázový systém, ve kterém póry (vyplněné nějakou tekutinou) tvoří jednu fázi a vlastní pevná látka druhou. Náhodnost prostorového rozložení fází způsobuje, že vztahy mezi mikrostrukturou těchto materiálů a jejich makroskopickými vlastnostmi, jako jsou elektrická a tepelná vodivost, efektivní permeabilita a difuzivita, a kapilární tlakové křivky, jsou značně komplikované. Pod pojmem mikrostruktura (nebo také textura) se v tomto textu myslí struktura materiálu na měřítku, na kterém můžeme jasně pozorovat fázové rozhraní mezi póry a pevnou látkou. Dřívější pokusy modelovat pórovité látky jako systém geometricky jednoduchých objektů (například jako svazek paralelních kapilár) se ukázaly být liché^{1,2}. Výrazným nedostatkem těchto postupů bylo, že ignorovaly vliv topologie prostoru pórů na vlastnosti pórovitých látek. Z tohoto důvodu je současný vývoj oboru zaměřen na modely, které dokážou co možná nejvěrněji zachytit morfologii pórů a topologii prostoru pórů. Veliká tvarová proměnlivost pórů je příčinou toho, že podrobnosti mikrostruktury mohou být zachyceny pouze na určitém měřítku při vynaložení rozumného úsilí

a použití přiměřeně nákladných prostředků. Právě tento důvod nás nutí se uchýlovat ke statistickým metodám modelování mikrostruktury^{3,4}. Souhlas mezi mikrostrukturou reálné pórovité látky (vzoru) a mikrostrukturou její repliky (obrazu) je pak dosahován ve smyslu rovnosti jistých statistických veličin.

Mezi zajímavé a účinné metody statistického modelování mikrostruktury patří třízměrná (3D) stochastická rekonstrukce^{5–8}. Ta je založena na pořízení velkého množství snímků náhodně orientovaných řezů pórovitou látkou. Snímky jsou transformovány pomocí standardních metod zpracování digitálního obrazu tak, aby bylo dosaženo jednoznačného přiřazení bodů dvourozměrného (2D) digitálního obrazu (též obrazový bod či pixel) jednotlivým fázím. Výsledek této transformace je statisticky zpracován a získaná statistická informace je použita pro 3D stochastickou rekonstrukci (její výsledek v podobě repliky pórovitého media viz obr. 1).

Tato práce popisuje přípravu nábrusů makropórovitých látek, snímkování těchto nábrusů elektronovým mikroskopem a následné zpracování digitálních snímků. Protože na konci řetězce operací nad digitálním obrazem stojí (kvantitativní) statistické charakteristiky dále používané při 3D stochastické rekonstrukci, zaměřili jsme se také na vliv parametrů jednotlivých operací zpracování obrazu na tyto charakteristiky. Navrhli jsme rovněž nezávislé postupy, jak tyto parametry nastavit za účelem maximální věrohodnosti statistické informace. Zmíněné nezávislé postupy zahrnují využití dat z heliové pyknometrie, rtuťové porometrie a měření povrchu metodou BET. Celý postup je demonstrován na modelovém materiálu reprezentovaném tabletami α -aluminu.



Obr. 1. Příklad repliky pórovité látky získané metodou 3D stochastické rekonstrukce

2. Experimentální část

Prvním krokem je pořízení nábrusů pórovitých látek následované snímkováním řádkovacím elektronovým mikroskopem. V dalším kroku jsou získané digitální snímky zpracovávány standardními metodami, které zajišťují potlačení šumu a rozdělení pozorovaných objektů podle jejich příslušnosti buď k fázi pórů nebo fázi pevné látky.

2.1. Příprava nábrusů

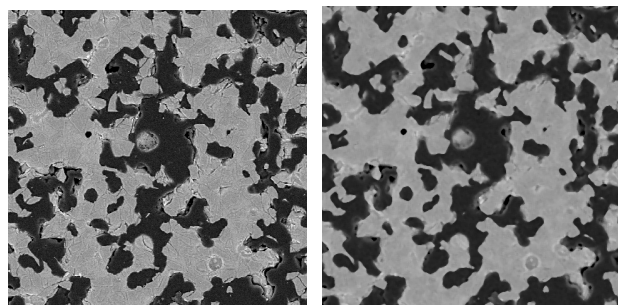
Nejprve je nutné vyplnit prostor pórů vhodnou látkou tak, aby na snímcích mohly být s dostatečnou přesností odlišeny póry od vlastní pevné fáze. Pro tento účel se využívá metoda vakuové impregnace. Látka, která vyplňuje prostor pórů, je volena tak, aby měla dobrou adhezi k pórovitému materiálu a po vytvrzení jen nepatrně měnila svůj objem. V metalografii, kde metoda dosáhla největšího rozvoje, se používají tři základní skupiny zalévacích látek: epoxidové pryskyřice, akryláty a polyestery⁹. Vlastnosti, o kterých již byla zmínka, splňuje skupina epoxidových pryskyřic, které mají navíc relativně nízkou viskozitu a doba vytvrzení je počítána v hodinách při laboratorní teplotě.

Válcové tablety α -aluminu (velikosti 5×5 mm) byly vysušeny a v počtu 1 až 4 kusy umístěny v plastové formičce o průměru 25 mm (Multiform, Struers, GmbH., SRN) do upraveného exsikatoru, který byl opatřen zařízením umožňujícím dávkování epoxidové pryskyřice Araldite (Struers, GmbH., SRN) za vakua. Po 30 minutách evakuace byla do formičky po kapkách přidávána směs pryskyřice a tvrdidla (10/3) zředěná methylethylketonem (3 hm.%). Po zalití tablet byl tlak v exsikatoru vyrovnán s atmosférickým. Formička byla přenesena do autoklávu, kde byla kapalná pryskyřice vtačována do pórů dusíkem o tlaku 11 MPa po dobu jedné hodiny a poté za téhož tlaku vytvrzována při teplotě 40 °C po dobu pěti hodin.

Vytvrzený odlitek byl seříznut diamantovou pilou a řezná rovina, zahrnující pórovitý materiál, byla obroušena diamantovým kotoučem (Discoplan TS, Struers, GmbH., SRN). Řezná plocha byla lapována karborundovým brusivem o velikosti zrna 70 μm a na závěr byla vyleštěna diamantovými pastami (D3 5/3 μm , D2 3/2 μm , D0,7 1/0 μm ; Urdiamant s.r.o., Šumperk) na umělé textilní podložce (Struers, GmbH., SRN), zvlhčené mazadlem (ethanol/glycerin = 2/1) do hladkého vzhledu. Jelikož pórovité materiály impregnované epoxidovou pryskyřicí jsou většinou nevodivé, jsou jejich nábrusy opatřovány tenkou vrstvou platiny nebo grafitu pro odvedení elektrického náboje, hromadícího se při pozorování.

2.2. Snímkování nábrusů

Nábrusy jsou obvykle pozorovány v řádkovacím elektronovém mikroskopu, který dovoluje dosáhnout potřebného zvětšení. Pro účely snímkování nábrusů je nejvhodnější pozorovat zpětně odražené (rozptýlené) elektrony (BSE, Back-Scattered Electron). Tento režim mikroskopu slouží



Obr. 2. Originální snímek řezu (vlevo) a upravený mediánovým filtrem, velikost masky 5×5 pixelů (vpravo), velikost výřezu 480×480 pixelů. Póry jsou tmavé, pevná látka světlá

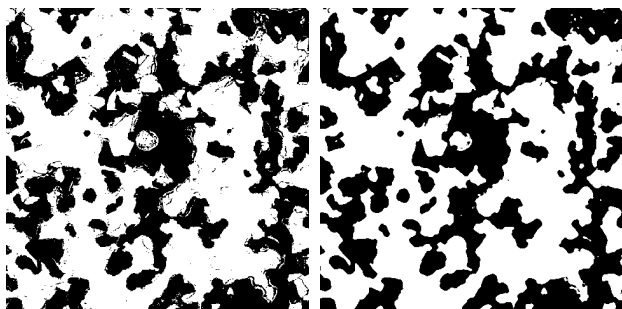
jako jistý druh chemické sondy. Povrch, ve kterém převládají atomy s malým atomovým číslem, se jeví jako tmavý, neboť počet odražených elektronů je malý. Naopak povrch, ve kterém převládají atomy s velkým atomovým číslem, je zobrazován na monitoru mikroskopu jako světlý, protože těžké atomy odrážejí více elektronů. Atomy tvořící epoxidovou pryskyřici mají obvykle menší atomová čísla než atomy, ze kterých jsou tvořeny pórovité látky. Proto, existuje-li materiálový rozdíl mezi epoxidovou pryskyřicí a pevnou látkou, zajišťuje tato metoda dobrý kontrast mezi fázemi.

V případě našeho modelového materiálu byla tato podmínka splněna, a proto byl dosažen výtečný kontrast mezi fází pórů (epoxidem) a fází pevné látky (α -aluminu). Nábrusy byly pozorovány v elektronovém mikroskopu JSM-5500LV (Jeol, Japonsko), jehož výstupem byly digitální snímky v osmibitové škále jasu (256 odstínů šedi v intervalu od 0, tj. černé, do 255, tj. bílé). V reprezentivním snímku (obr. 2, vlevo) lze pozorovat plochy, které se liší úrovní šedi. Spočtením četnosti výskytu jednotlivých úrovní šedi byl získán histogram, který měl dvě dobře oddělená maxima. Ve stonásobném zvětšení bylo shromážděno několik desítek snímků o velikosti 1280×960 pixelů při velikosti pixelu 1×1 μm^2 .

2.3. Úprava digitálních snímků

Každý z digitálních snímků povrchu pórovitého materiálu byl podroben sledu operací, zahrnujících nelineární filtrování, úplnou segmentaci a odstranění malých shluků pixelů z obou fází. Klíčovou operací je úplná segmentace snímků neboli identifikace jednotlivých fází. Ta spočívá v určení nejsvětlejšího odstínu šedi (prahu), který ještě reprezentuje epoxidovou fázi. Z počátku byl k částečnému zpracování snímků (filtrace a segmentace) používán komerční program Image Toolbox MATLAB (The MathWorks, Inc., USA), později byl vyvinut vlastní program pro rychlé, automatizované zpracování celého souboru snímků.

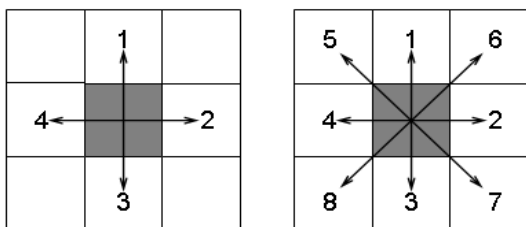
Snímky z elektronového mikroskopu vždy obsahují náhodný šum, k jehož odstranění byl použit mediánový filtr¹⁰. Tento nelineární filtr je velmi účinný pro redukci



Obr. 3. Snímek segmentovaný bez předchozí filtrace (vlevo) a snímek segmentovaný po předchozí filtraci (vpravo). Velikost výřezu 480×480 pixelů. Póry jsou černé, pevná látka bílá

náhodného šumu typu „sůl a pepř“ neboli velmi světlých a tmavých plošek různé velikosti, které jsou rozptýleny po snímku. Mediánový filtr nahrazuje hodnotu úrovně šedi daného pixelu mediánem úrovně šedi pixelů v jeho okolí vymezeném maskou. Ve srovnání s lineárními vyhlazovacími filtry se stejnou velikostí masky zachovává kontrast mezi velkými objekty. Vliv velikosti čtvercové masky filtru na statistický popis snímků je diskutován v následujícím textu. Obr. 2 zachycuje originální snímek povrchu řezu a snímek upravený mediánovým filtrem o velikosti masky 5×5.

Filtrované snímky byly jednoznačně rozděleny na dvě fáze – na póry (černé pixely) a na pevnou látku (bílé pixely). Pro snímky charakterizované histogramem se dvěma vrcholy byla v literatuře popsána řada metod, které automaticky naleznou vhodnou hodnotu příslušející prahovému odstínu šedi. Mezi metody prosté předpokladů o tvaru histogramu a odolné vůči vlivu šumu, se řadí Otsuův algoritmus, který maximalizuje rozptyl úrovně šedi mezi objekty popředí a pozadí¹¹. Otsuova metoda identifikovala prahový odstín šedi v těsné blízkosti minima mezi oběma vrcholy, což bylo v souladu s jeho intuitivním určením. Například filtrovanému snímku v obr. 2 byla přiřazena prahová hodnota odstínu šedi 100 a následně všem pixelům tmavším než tato úroveň šedi byla přidělena černá barva, ostatním bílá barva tak, jak je zobrazeno v obr. 3.



Obr. 4. Pravidlo sousednosti pixelů, 4 sousedící pixely (vlevo, pouze společné hrany s centrálním pixelem) a 8 sousedících pixelů (sdílení hran a vrcholů)

Segmentované snímky mohly být dále zpracovávány odstraněním malých shluků pixelů. Jako shluk pixelů bylo označováno takové uspořádání pixelů zvolené fáze, ve kterém centrální pixel masky sdílí s okolními pixely buď (i) hrany nebo (ii) hrany a rohy, viz obr. 4. Tento krok byl používán k odstraňování malých objektů obou fází, jejichž existence nebyla potvrzena jinými, nezávislými metodami. Na rozdíl od mediánového filtru tento způsob vyhlazování zachovává malé objekty, které jsou spojeny se sousedními velkými objekty prostřednictvím „můstků“. Volba pravidla sousednosti je pochopitelně více či méně subjektivní, v případě (i) se dosáhne většího vyhlazovacího účinku.

Před odstraněním shluků o počtu pixelů menším než zvolená hranice je nutno určit příslušnost jednotlivých pixelů ke shlukům, čímž je identifikována jejich velikost. Pro tento účel byl implementován Hoshenův-Kopelmanův algoritmus¹².

3. Statistický popis snímků

Černobílé snímky mohou být dále transformovány do podoby, která je vhodná pro statistické zpracování. Účelný způsob spočívá v převodu bílé a černé barvy do formy tzv. fázové funkce. Podle Torquata⁴ je struktura dvofázového nestejnorodého (pórovitého) materiálu úplně určena fázovou funkcí $I(\vec{x})$, kterou definoval jako

$$I(\vec{x}) = \begin{cases} 1, & \text{pokud } \vec{x} \text{ leží ve fázi pórů} \\ 0, & \text{jinak} \end{cases} \quad (1)$$

kde \vec{x} je polohový vektor. Protože výchozí snímky jsou digitální, je polohový vektor definován v celočíselných souřadnicích, ve kterých je rozdíl mezi dvěma nejbližšími hodnotami libovolné souřadnice dán velikostí pixelu. Střed pixelů jsou pak umístěny na čtvercové mřížce.

Existuje celá řada tzv. mikrostrukturálních (morfoloogických) deskriptorů, které statisticky charakterizují mikrostrukturu pórovitých látek⁴. Mezi základní patří n -bodové pravděpodobnostní funkce. Z nich se nejčastěji používá jednobodová a dvoubodová pravděpodobnostní funkce. K důležitým kritériím, která rozhodují o použitelnosti deskriptoru (funkce) pro účely stochastické rekonstrukce, patří shodný průběh či hodnota ve dvou- a třírozměrném prostoru. Výpočet mikrostrukturálních deskriptorů se velmi zjednoduší, je-li studované medium stacionární (časově neproměnné), statisticky homogenní (dvoubodová pravděpodobnostní funkce je invariantní vůči posunu prostorových souřadnic) a isotropní (dvoubodová pravděpodobnostní funkce je invariantní vůči otáčení prostorových souřadnic). Za těchto okolností lze nahradit statistické průměry přes všechny možné realizace media objemovým průměrem z jedné realizace.

Jednobodová pravděpodobnostní funkce či celková pórovitost ϕ je definována jako podíl počtu pixelů označujících fázi pórů k celkovému počtu pixelů ve snímku. Dvoubodová pravděpodobnostní funkce $S_2(r)$ pro fázi pórů

je definována jako pravděpodobnost, že oba konce úsečky délky r , náhodně vhozené na snímek, padnou do fáze pórů. Funkce $S_2(r)$ nese zejména informaci o morfologii pórů a platí pro ni následující vztahy

$$S_2(0) = \phi, \quad \lim_{r \rightarrow \infty} S_2(r) = \phi^2 \quad (2)$$

Mezi specifickým povrchem pórů s (v případě digitálního 2D pórovitého média se jedná o obvod pórů vztažený na jednotkovou plochu snímku) a funkcí $S_2(r)$ platí následující vztah

$$s = -4 \left. \frac{dS_2(r)}{dr} \right|_{r=0} \quad (3)$$

Jiným užitečným deskriptorem je tzv. funkce lineární dráhy $L(r)$ pro fázi pórů. Tato funkce je definována jako pravděpodobnost, že celá úsečka délky r , která byla náhodně vhozena na snímek, bude ležet ve fázi pórů. Přináší jistou informaci o propojenosti prostoru pórů, přinejmenším ve směru vzhazovaných úseček, a platí pro ni tyto vztahy

$$L(0) = \phi, \quad \lim_{r \rightarrow \infty} L(r) = 0 \quad (4)$$

Při praktickém výpočtu deskriptorů lze za výše uvedených předpokladů o povaze média provádět vzorkování či vzhazování úsečky pouze ve vybraném směru, například ve směru osy x . Zopakováním postupu ve směru osy y nebo v diagonálních směrech lze ověřit, zdali je materiál isotropní. Obr. 5 ukazuje funkce $S_2(r)$ a $L(r)$. Jejich nezávislost na uvedených směrech vzorkování dokládá, že modelová látka byla isotropní. Porovnáním $S_2(r)$ a $L(r)$ určených ze snímků různých míst jednotlivých řezů a ze snímků z různých řezů byla ověřena statistická homogenita materiálu. Protože modelová látka měla tyto vlastnosti,

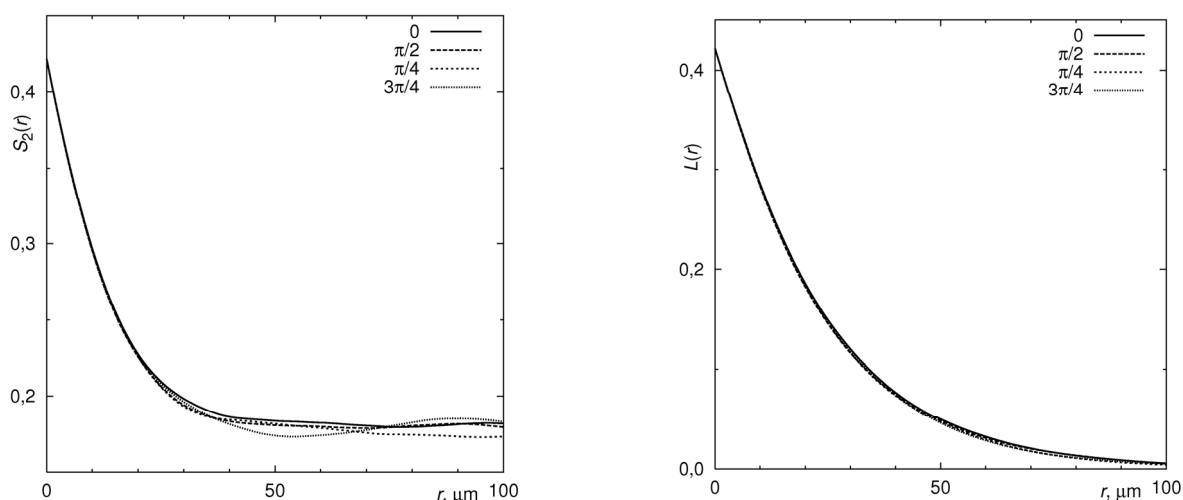
jsou dále zobrazovány funkce $S_2(r)$ a $L(r)$ pouze ve směru osy x (horizontální směr). Převod černobílých snímků na fázovou funkci a výpočty mikrostrukturních deskriptorů byly prováděny vlastním programem.

4. Výsledky a diskuse

Z výkladu v předchozích sekcích (zejména 2.3.) by se mohlo zdát, že volba parametrů algoritmů pro zpracování obrazu je subjektivní. V následujícím textu bude ukázáno, že existují postupy, jak objektivně zvolit parametry pro tyto algoritmy. Základním kritériem, které musí být splněno, je shoda celkové pórovitosti určené jednak z obrazové analýzy a jednak nezávislým postupem, například z kombinace heliové pyknometrie a rtuťové pórometrie. Dále se požaduje nezávislost či velmi slabá závislost celkové pórovitosti na způsobu zpracování snímků (na parametrech jednotlivých operací).

Vliv velikosti masky mediánového filtru na průběh funkcí $S_2(r)$ a $L(r)$ je ilustrován v obr. 6A. Absence mediánového filtru při zpracování snímků, tj. výlučná aplikace segmentace, vedla k velkému specifickému povrchu a navíc k prostoru pórů s nízkou propojeností v přímém směru, což bylo indikováno rychlým poklesem $L(r)$. Zejména ve fázi pevné látky se vyskytovaly četné černé izolované pixely nebo jejich malé shluky (obr. 3), které významně zvětšovaly specifický povrch. Zvětšující se maska progresivně redukovala specifický povrch (tab. I), zatímco celková pórovitost nepatrně klesala a propojenost prostoru pórů se v přímém směru zvyšovala (růst hodnot $L(r)$ v obr. 6A).

Po provedené segmentaci – buď s předchozí filtrací nebo bez ní – bylo možno odstraňovat malé shluky pixelů. K tomu účelu byla definován kritický shluk pixelů, což byl největší shluk (vyjádřeno počtem přítomných pixelů), který byl ještě odstraněn. Aby bylo možno porovnávat účinek

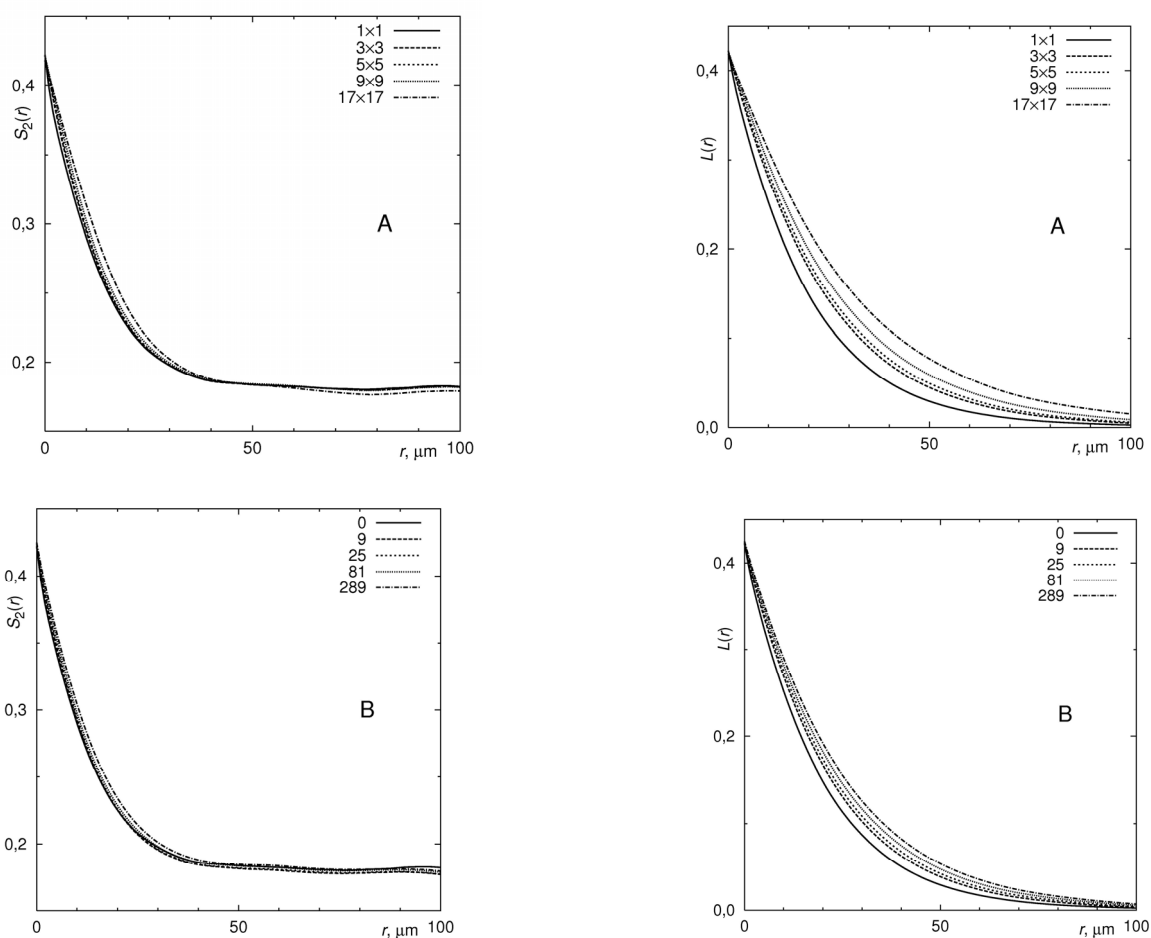


Obr. 5. Funkce $S_2(r)$ a $L(r)$ vypočtené ve směrech os x (0) a y ($\pi/2$) a v diagonálních směrech ($\pi/4$, $3\pi/4$)

Tabulka I

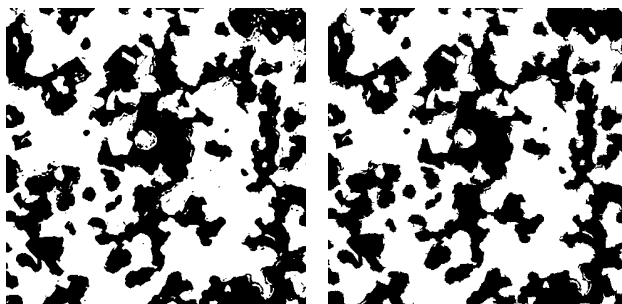
Vliv velikostí masky filtru a kritického shluku pixelů na celkovou pórovitost ϕ a specifický povrch s určený podle rov. (3)

Velikost masky	ϕ^b	$s [\mu\text{m}^{-1}]$	Velikost shluku	ϕ^b	$s [\mu\text{m}^{-1}]$
1×1 ^a	0,4225	0,1029	0 ^a	0,4225	0,1029
3×3	0,4218	0,0706	9	0,4217	0,0775
5×5	0,4219	0,0594	25	0,4221	0,0721
9×9	0,4218	0,0526	81	0,4237	0,0685
17×17	0,4184	0,0440	289	0,4250	0,0651

^a Ekvivalentní vynechané operaci, ^b celková pórovitost nezávisle určená ze skutečné a zdánlivé hustoty byla 0,423Obr. 6. Vlivy velikostí masky filtru (A) a kritického shluku (B) na $S_2(r)$ a $L(r)$. Čísla v legendě označují (A) velikost masky v pixelech, 1×1 značí vynechání filtrace, (B) velikost kritického shluku, 0 značí výlučně užití segmentace

mediánové filtrace a odstraňování shluků pixelů, byla velikost kritického shluku volena tak, aby počty pixelů v masce filtru a v kritickém shluku souhlasily. Shluky pixelů byly odstraňovány symetricky v obou fázích pro

danou velikost kritického shluku. Tím byla zajištěna stabilita celkové pórovitosti, která byla blízká hodnotě 0,423, nezávisle určené z kombinace heliové pyknometrie a rtuťové pórometrie. Z tab. I je vidět, že specifický povrch



Obr. 7. Porovnání filtrovaného a segmentovaného snímku (vlevo, maska 3×3) se snímek, který byl segmentován a následně byly odstraněny malé shluky pixelů (vpravo, velikost kritického shluku 35 pixelů)

klesal mnohem pomaleji než v předchozím případě. Celková pórovitost kolísala okolo hodnoty příslušející pouze segmentovanému snímku. Z porovnání obr. 6A a 6B je také patrné, že velikost kritického shluku pixelů ovlivňovala průběh funkcí $S_2(r)$ a $L(r)$ slaběji než odpovídající velikost masky filtru.

Z vizuálního porovnání segmentovaného snímku nejprve podrobeného filtraci s maskou 3×3 na jedné straně a segmentovaného snímku s dodatečným odstraněním malých shluků pixelů (kritický shluk o velikosti 35 pixelů) na druhé straně je patrný rozdíl ve funkcích obou algoritmů (obr. 7). V tomto případě velikosti masky filtru a kritického shluku byly voleny tak, aby výsledné specifické povrchy byly téměř totožné. Při odstraňování malých shluků pixelů byly plochy reprezentující jednotlivé fáze zbaveny všech malých „černých nebo bílých ostrůvků“ při zachování značné členitosti fázového rozhraní, viz četné „nitkovité“ útvary vyčnívající z okrajů velkých pórů. Naopak, mediánový filtr více vyhladil okraje velkých objektů a zanechal malé shluky pixelů v obou fázích.

Objektivním kritériem pro přijetí vhodných parametrů obou diskutovaných operací je velikost povrchu stanovená nezávislou metodou, například pomocí nízkoteplotní adsorpce kryptonu (povrch stanovený metodou BET*). Takto stanovený povrch odpovídá spojitě třírozměrné reprezentaci pórovitého materiálu. Po korekcích⁴ na rozdíly mezi diskretní a spojitou reprezentací média je možno určit povrch příslušející digitalizovanému 2D pórovitému mediu a následně zvolit správné parametry operací. V našem případě byla hodnota specifického povrchu s odhadnuta na $0,057 \mu\text{m}^{-1}$. V předchozí diskusi však bylo ukázáno, že prostřednictvím vhodně zvolených hodnot parametrů obou operací bylo možno dosáhnout takový průběh $S_2(r)$, který by odpovídal výše uvedené hodnotě s . Tato nejednoznačnost výběru operací byla potlačena pomocí informací získaných z intrúzní křivky rtuti. Ačkoliv existují závažné

výhrady^{1,2} proti kvantitativnímu hodnocení textury pórovitých látek rtuťovou pórometrií, pro účely této práce se jednalo o přijatelný způsob. Z tlaku, při kterém dochází k úplnému zaplnění pórů rtuť, byl odhadnut poloměr nejmenšího póru přítomného v našem vzorku na $2,9 \mu\text{m}$ a jeho průřez $2,9^2 \pi \approx 26 \mu\text{m}^2$. Z této hodnoty a velikosti pixelu ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) byla odvozena velikost kritického shluku pixelů rovná 26. Kombinace odstraňování shluků až do velikosti 26 pixelů a mediánového filtru s maskou 5×5 vedla ke specifickému povrchu, který odpovídal experimentální hodnotě dané metodou BET.

5. Závěr

Popsanou metodiku zpracování digitálních snímků pórovitého materiálu lze užít^{7,8} pro makropórovité látky s póry charakteristické velikosti větší než $0,1 \mu\text{m}$. Při zpracování snímků je třeba klást důraz na nezávislé ověřování vypočítávaných statistických charakteristik (mikrostrukturálních deskriptorů), neboť některé operace obrazové analýzy neumožňují objektivně zvolit jejich parametry. Jako podpůrné, nezávislé metody se osvědčily kombinace heliové pyknometrie a rtuťové pórometrie pro stanovení celkové pórovitosti, metody BET pro určení specifického povrchu, a odhadu charakteristické velikosti nejmenšího póru ze rtuťové pórometrie.

LITERATURA

1. Dullien F. A. L.: *Porous Media: Fluid Transport and Pore Structure*. 2. vyd., Academic Press, San Diego 1992.
2. Sahimi M.: *Flow and Transport in Porous Media and Fractured Rock: From Classical Methods to Modern Approaches*. VCH, Weinheim 1995.
3. Adler P. M.: *Porous Media: Geometry and Transports*. Butterworth/Heinemann, Boston, 1992.
4. Torquato S.: *Random Heterogeneous Materials: Microstructure and Macroscopic Properties*. Springer-Verlag, New York 2002.
5. Kosek J., Štěpánek F., Marek M., v knize: *Advances in Chemical Engineering* (Marin G. B., ed.), Vol. 30, Multiscale Analysis, str. 137, Elsevier, Londýn 2005.
6. Čapek P., Hejtmánek V., Brabec L., Zikánová A., Kočiřík M.: *Chem. Eng. Sci.* 62, 5117 (2007).
7. Manwart C., Torquato S., Hilfer R.: *Phys. Rev. E* 62, 893 (2000).
8. Talukdar M. S., Torsaeter O., Ioannidis M. A., Howard J. J.: *Transport in Porous Media*. 48, 101 (2002).
9. Struers Materialographic Consumables Product

* Přesné stanovení povrchu makropórovitých látek vyžaduje zvláštní experimentální zařízení, neboť plocha jejich povrchu je extrémně malá.

- Guide, katalog, www.struers.com, 2005.
- Gonzales R. C., Woods R. E.: *Digital Image Processing*. 2. vyd., Prentice Hall, New Jersey 2002.
 - Otsu N.: IEEE Trans. Syst., Man, Cybern. SMC-9, 62–66 (1979).
 - Hoshen J., Kopelman R.: Phys. Rev., B 14, 3438 (1976).

*Autoři této práce děkují Grantové agentuře České republiky za podporu projektu 203/05/0347, Grantové agentuře AV ČR za podporu projektu IAA400400501 a MŠMT ČR za podporu prostřednictvím výzkumného zá-
měru číslo MSM6046137301.*

**V. Hejtmánek^a, P. Čapek^b, L. Brabec^c,
A. Zikánová^c, and M. Kočířik^c** (^a*Institute of Chemical
Processes, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Prague,* ^b*Institute of Chemical Technology, Prague,*
^c*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of
Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Determination
of Microstructure Descriptors from Digital Images of
Porous Media**

Preparation of polished sections of macroporous solids as well as their digital imaging, processing and analysis are described. The principal feature of the procedure is the image transformation to the corresponding phase function, which is a starting point in evaluation of statistical information on texture. This information can be used for three-dimensional stochastic reconstruction of porous solids. Out of many possible combinations of image processing methods, the following sequence is the most appropriate for our aim: (1) non-linear (median) filtration, (2) image segmentation based on maximization of grey-level variance between foreground and background objects, (3) removal of small clusters of pixels. As an additional criterion in optimization of computational parameters of the image processing methods, independent textural information was obtained by other experimental techniques, such as helium pycnometry, mercury porosimetry and low-temperature adsorption of krypton.

OVLIVNĚNÍ PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ V BUNĚČNÉ KULTUŘE *Silybum marianum* PŘÍDAVKEM ELICITORU PARAQUAT

LENKA TŮMOVÁ^a a JIŘÍ TŮMA^b

^a Katedra farmakognosie, Farmaceutická fakulta UK v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,

^b Katedra biologie, Pedagogická fakulta, Universita Hradec Králové, Víta Nejedlého 573, 500 03 Hradec Králové
tumova@faf.cuni.cz

Došlo 17.6.08, přepracováno 17.10.08, přijato 23.10.08.

Klíčová slova: elicítace, flavonoidy, *Silybum marianum*, methylviologen, paraquat

Úvod

Vyšší rostliny jsou nejen důležitým zdrojem potravin, dřeva, vlákniny, olejů, ale také poskytují nejbohatší výběr přírodních látek, z nichž mnohé jsou využívány v medicíně, kosmetice a potravinářství. Odhaduje se, že asi 30 000 známých přírodních produktů je z více než 80 % rostlinného původu a asi třetina vyráběných léčivých přípravků obsahuje biogenní látky rostlinného původu nebo z nich získané deriváty¹. Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky únosnou organickou syntézou a jejich výroba pomocí genového inženýrství v mikrobiálních systémech není zatím řešitelná, protože vznikají mnohostupňovými syntézami. Jednou z možností, jak získat požadované rostlinné látky, je i využití rostlinných explantátových kultur¹. Vzhledem k tomu, že až na výjimky je charakteristickým problémem kultivace rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* nízká produkce sekundárních metabolitů těmito kulturami, jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšené produkce sekundárních látek je metoda elicítace.

Elicítací vyvolaný stres aktivuje obranné reakce rostliny či rostlinného explantátu, které vedou, mimo jiné, ke změně transkripce genů kódujících enzymy ovlivňující biosyntézu sekundárních metabolitů². Elicítace rostlinných kultur za účelem zvýšené produkce sekundárních látek je v současné době studována především pro svoji jednoduchost. Navíc se jedná o metodu ekonomicky výhodnou bez velkých nároků na prostory. Základním předpokladem úspěšné elicítace je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby jeho působení na rostlinnou kulturu *in vitro*. Elicitor stojí na počátku všech obranných reakcí jako spouštěcí faktor².

Cílem práce bylo zjistit vliv potenciálního elicitoru – methylviologenu na produkci flavonolignanů a v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum*.

Methylviologen (paraquat)

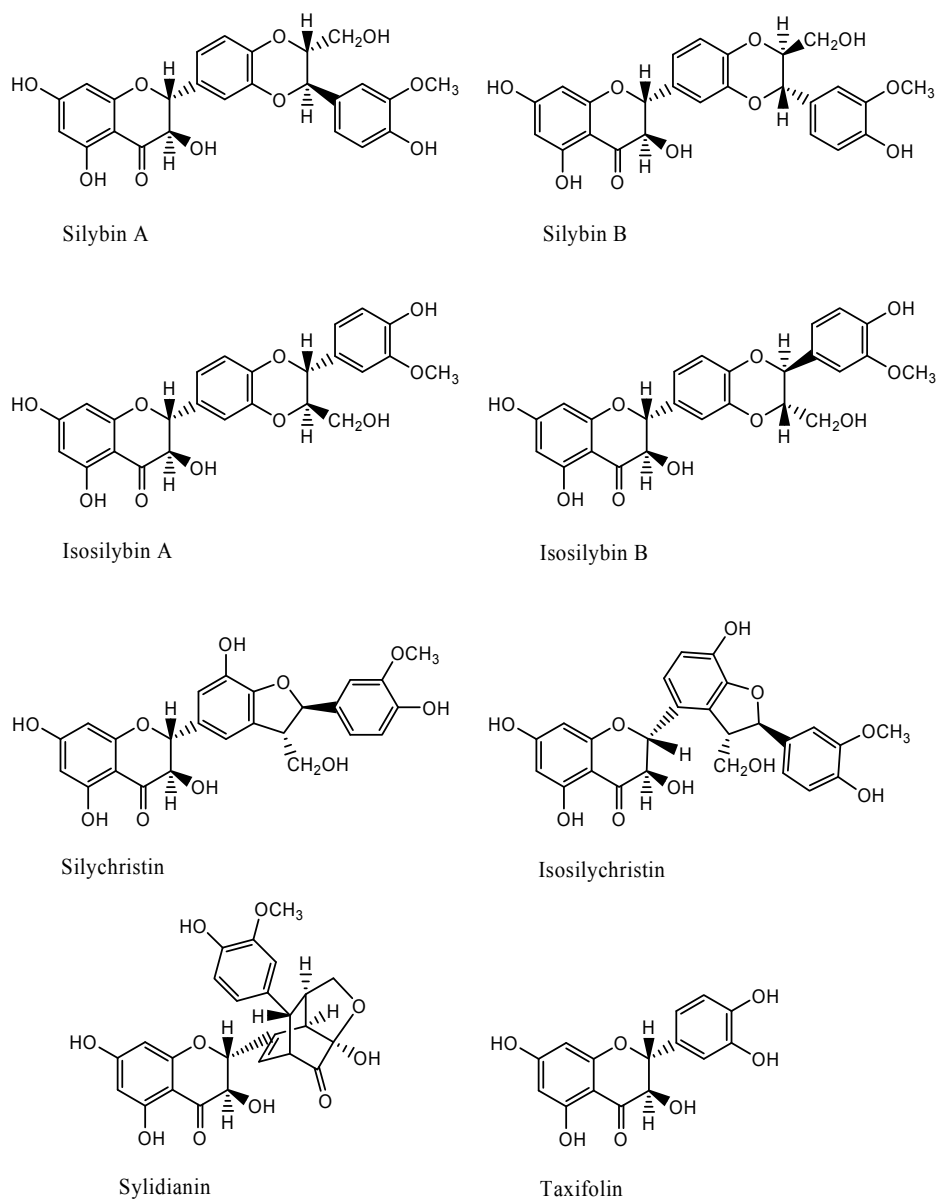
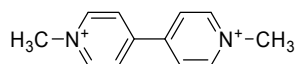
Methylviologen neboli paraquat lze zařadit mezi bipyridilové herbicidy, které jsou využívány jako kontaktní herbicidy či vysušovačla polí. Základní mechanismus působení oxidativního stresu bipyridilů je dán tím, že po jejich působení dochází ke vzniku volných hydroxylových radikálů, které jsou toxické a reagují s membránovými lipidy (peroxidace lipidů)³. Působením methylviologenu se zvyšuje v rostlinách či kulturách *in vitro* množství aktivních forem kyslíku (ROS). Jako zdroj ROS je často používán ke sledování působení oxidačního stresu na rostliny a může tudíž ovlivnit produkci sekundárních látek⁴.

Vliv methylviologenu byl testován na kultuře *Silybum marianum in vitro*. Jako droga se používá v terapii *Cardui mariae fructus* (usušený zralý plod druhu *Silybum marianum* (L.) GAERTN.). Musí obsahovat nejméně 1,0 % silymarinu, počítaného jako silybin⁵.

Obsahové látky a terapeutické účinky *Silybum marianum*

Hlavními obsahovými látkami *Silybum marianum* je skupina flavonolignanů komplexně nazývaná silymarin (1,5–3 %). Silymarin je isomerní směs obsahující silybin, isosilybin (1:1 směs diastereoisomerů), silychristin a silydianin. Další významné flavonolignany identifikované v *Silybum marianum* jsou 2,3-dehydrosilybin, 2,3-dihydrosilychristin, dále flavonoidy jako taxifolin, apigenin a jeho 7-*O*-glukosid, 7-*O*-glukuronid, 4,7-diglukosid, dále kaemferol, jeho 7-*O*-glukosid a 3-sulfát, luteolin a jeho 7-glukosid. Z dalších látek byly prokázány sitosterol a jeho glukosid, polyacetyleny, kyselina fumarová⁶.

U silymarinového komplexu byla prokázána antioxidační, antihepatotoxická, antiflogistická a protialergická aktivita. Hepatoprotektivní účinky se projevují u alkoholem indukované, akutní a chronické virové hepatitidy, hepatitidy navozené organickými látkami, toxiny a drogami⁷. Dále byly prokázány účinky antitumorové. Se stabilizací buněčných membrán souvisí antialergická aktivita (stabilizuje buněčnou stěnu žírných buněk), což souvisí s antioxidačním účinkem silymarinu, jeho schopností vychytávat volné radikály a inhibovat lipidovou peroxidasu⁷. Působí jako choleretikum a slabé spasmolytikum. Silymarin se dobře vstřebává z trávicí soustavy a rychle se vylučuje žlučí (max. hladina asi 1 h po podání). Vlivem zpětné resorpce z tlustého střeva se silymarin zadržuje v enterohepatálním oběhu a tím je podmíněn jeho ochranný účinek proti hepatotoxinům a při jaterních cirhózách⁸. V nedávné době byly přesně určeny struktury silybinu A a B a popsány některé zcela nové mechanismy účinků na signální procesy ve zdravých a nádorových buňkách⁹.

Obr. 1. Chemická struktura hlavních složek silymarinového komplexu⁶

PQ (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium ion)

Obr. 2. Chemická struktura methylviologenu (paraquat)⁴

Experimentální část

Materiál a metody

Přístroje

Kolona LiChrospher RP-18 250-4, sorbent Li Chrospher 5 μm ; mikrofiltry (0,45 μm), Tessek, ČR; předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5 μm ; pumpa Jasco PU-2089 Plus, Japonsko; termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko.

Chemikálie

Methanol HPLC grade, Merck, Německo; methanol p.a., Penta, ČR; methylviologendichlorid hydrát, Sigma-Aldrich, ČR; Silymarin p.a., Sigma-Aldrich, ČR.

Biologický materiál

Byla použita tkáňová kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Silybum marianum* (L.) Gaertn. v 34.–40. pasáži.

Pasážování a kultivace

V prostředí laminárního boxu bylo do sterilizovaných Erlenmayerových baněk přeneseno inokulum (část kalusu z předchozí kultivace) na můstek z filtračního papíru (u kalusové kultury) nebo přímo do živného media Murshigeho a Skooga (MS)¹¹ (u suspenzní kultury, po mechanickém rozmělnění kalusu). Baněk s naočkovanými kulturami byly opět uzavřeny hliníkovou fólií. Kultivace probíhala za normálního světelného režimu (16 h světlo, 8 h tma). Kultura rostla po dobu 30 dnů při 25 °C. Suspenzní kultura byla kultivována na třepačce (120 ot min⁻¹) za stejných světelných a teplotních podmínek.

Elicítace kalusových kultur

Jako elicitor byl použit roztok methylviologendichlorid dihydrátu v ethanolu, ve třech koncentracích, a to:

$$c_1 = 10,0 \text{ mg}/100 \text{ ml} \ (2,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}),$$

$$c_2 = 1,0 \text{ mg}/100 \text{ ml} \ (2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}),$$

$$c_3 = 0,1 \text{ mg}/100 \text{ ml} \ (2,19 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}).$$

Na základě vyhodnocení růstové a produkční křivky tkáňové kultury *Silybum marianum* v předchozí studii¹² byl zvolen optimálním dnem k aplikaci elicitoru 30. den po subkultivaci. Po 30 dnech od subkultivace byl do 30 baněk pipetován vždy 1 ml elicitoru. Elicitor byl přidáván za aseptických podmínek pomocí sterilních nástrojů. Kalusy byly z baněk odebírány v šesti časových intervalech od aplikace elicitoru po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách.

Tkáňové kultury byly po uvedené době z baněk vyjmuty a usušeny na filtračním papíru za laboratorní teploty. Získané usušené kalusy byly rozetřeny v třecí misce a použity ke stanovení obsahu flavonolignanů. Jako kontrola byla zvolena tkáňová kultura pěstovaná bez přídavku elicitoru.

Bylo sledováno i vylučování metabolitů do živného média. Vzorky média nebyly odebírány pravidelně. Odebrané médium (6 ml) bylo odpařeno na vakuové odparce a získaný odparek byl rozpuštěn v 6 ml methanolu a analyzován.

Elicítace suspenzních kultur

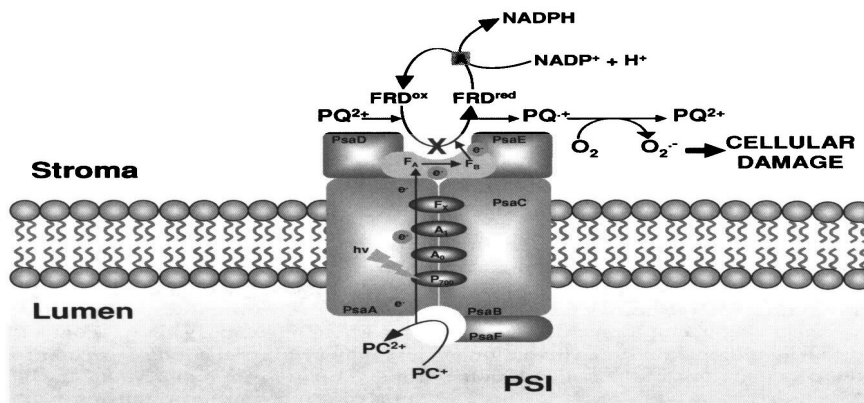
Suspenzní kultury byly získány mechanickým rozmělněním kalusu ve 30 ml živného média. Tyto kultury byly kultivovány 30 dnů na třepačce 120 ot min⁻¹, která zabezpečovala promíchávání a provzdušňování živné půdy. Elicítace suspenzních kultur a jejich následné zpracování bylo stejné jako u kultur kalusových.

Stanovení obsahu flavonolignanů v kalusu**Parametry HPLC analýzy**

HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250 × 4 (5 μm) s ochranou předkolonkou. K detekci byl použit DAD detektor (190 až 450 nm). Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 288 nm. Objem nástřiku byl 20 μl. Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově, z 0 % methanolu v čase $t = 0$ do 50 % methanolu v čase $t = 5$ min. Následovala isokratická eluce 50% methanolem do času $t = 25$ min. Mobilní fáze obsahovala jako pufr vždy 0,15 % kyseliny fosforečné. Průtok byl 1,4 ml min⁻¹. Standardy: Silymarin p.a., Sigma-Aldrich, ČR.

Validace HPLC analýzy

Instrumentální validace byla zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco), a to normou ISO 9001



Obr. 3. Mechanismus herbicidního účinku methylviologenu⁴; PSI – fotosystém 1, PC – plastocyanin, FRD – feredoxin, PQ – plastoquinon, NADP – nikotinamidadeninindukleotid, NADPH – nikotinamidadeninindukleotid redukovaný, Cellular damage – poškození buňky

(International Organization for Standardization).

Způsobnost chromatografických systémů byla navíc ověřena testem opakovaného nástřiku – tzv. testem na přesnost (provedeno vždy šest nástřiků týmž vzorkem, vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a testem linearity (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu r , která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékopisu, 3. vydání: *Asymetrie píku a počet teoretických pater*¹³. Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry: Správnost metody – jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem)^{14,15}. Kvantitativní limit – jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %)^{14,15}.

Byl použit standard silymarinu, který obsahoval průměrně 5,230 % taxifolinu, 24,731 % silychristinu, 3,094 % silydianinu, 23,831 % silybinu A, 30,009 % silybinu B, 7,159 % isosilybinu A a 2,216 % isosilybinu B (uvedená procenta jsou vypočtena jako poměr plochy příslušného píku k celkové ploše všech píků ve standardu). Kalibrační přímky pro jednotlivé látky byly sestaveny metodou nejmenších čtverců, a to na základě analýz standardu silymarinu a výpočtu jejich množství z průměrného obsahu. Opakovatelnost metody (měřeno na standardu silymarinu) jsme charakterizovali směrodatnou odchylkou ($s_x = 0,0009$), která dosahovala výše 0,9 % průměrné hodnoty. Odchylka byla pod limitem dovolené diference pro opakovatelnost metody ($R_{max} = 0,00664$), na hladině významnosti $P = 0,95$.

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. U této metody byly meze detekce následující: taxifolin 0,0005 %, silychristin 0,0001 %, silydianin 0,0006 %, silybin A 0,0001 % silybinu B 0,0001 %, isosilybin A 0,0005 % a isosilybin B 0,0010 %.

Tabulka I

Obsah flavonolignanů (%) v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Elicitor: methylviologen (MV)

Koncentrace methylviologenu [mol l^{-1}]	Doba odběru [h]	Obsah flavonolignanů [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota test. kritéria
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	OK ^a	0,0008	0,0001	–
	6	0,002	0,0004	3,7283
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	OK ^a	0,0008	0,0001	–
	6	0,0100	0,0024	5,2633
	12	0,0030	0,0003	7,9046
	24	0,0040	0,0024	1,8044
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	OK ^a	0,0008	0,0001	–
	6	0,0040	0,0004	9,4779
	12	0,0030	0,0005	5,4828
	24	0,0040	0,0006	7,3522
	48	0,0040	0,0004	9,4779
	72	0,0070	0,0004	21,9996
	168	0	0	0

^aOK – kontrola v době 0 h. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení

Postup stanovení

Sušené vzorky kalusů a suspenzí kultur (300 až 500 mg) byly po rozdrobnění v třecí misce dvakrát extrahovány vždy 10 ml methanolu po dobu 10 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Oba extrakty byly spojeny a doplněny na 20 ml. Po filtraci přes mikrofiltr (0,45 μm) bylo asi 1,7 ml roztoku převedeno do zkumavky a analyzováno metodou HPLC. Vzorky média byly nejprve vysušeny na vakuové odparce a poté rozpuštěny v methanolu a po filtraci převedeny do zkumavek a analyzovány metodou HPLC. Obsah flavonolignanů byl vztažen na suchou hmotnost kultury *in vitro*. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení.

Výsledky a diskuse

Ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah flavonolignanů byl použit t-test rozdílů dvou průměrů. Pro zvolenou hladinu významnosti $P=0,05$ a pro 4 stupně volnosti $v=4$ je kritická hodnota testovacího kriteria 2,78.

V kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. došlo ke statisticky významnému nárůstu obsahu flavonolignanů pouze po 6 hodinové elicitaci methylviologenum

o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a to o 1250 %. Po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách se obsah flavonolignanů zvýšil jen nepatrně nebo naopak významně poklesl (tab. I). U zbývajících testovaných koncentrací elicitoru při aplikaci k suspenzní kultuře byl nárůst produkce flavonolignanů minimální.

V suspenzní kultuře *Silybum marianum* byla produkce flavonolignanů po aplikaci u všech tří koncentrací methylviologenum nepatrná, jen jednou dosáhla stejné produkce ve srovnání s kontrolním vzorkem, a to po 6 hodinové elicitaci methylviologenum o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (tab. II). Gallová¹² detegovala v kalusové kultuře *Silybum marianum* pouze silychristin. Řimáková¹⁶ našla v kalusových kulturách *Silybum marianum* po elicitaci prekurzorem konyferylalkoholem taxifolin a silydianin a to silydianin u kontrolních vzorků i v živném médiu, taxifolin pouze v živném médiu. Po elicitaci suspenzní kultury *Silybum marianum* chitosanem nebyla detegována žádná ze složek silymarinového komplexu. V kontrolních vzorcích média byl však detegován taxifolin. V buňkách kontrolních vzorků kalusové kultury ani v kalusové kultuře *Silybum marianum* Řimáková¹⁶ neprokázala po elicitaci UV zářením žádnou ze složek silymarinového komplexu, jen vysoké koncentrace fenolových kyselin.

V této studii byla detegována v kalusové kultuře kro-

Tabulka II

Obsah flavonolignanů (%) v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Elicitor: methylviologen (MV)

Koncentrace methylviologenum [mol l ⁻¹]	Doba odběru [h]	Obsah flavonolignanů [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	0K	0,0040	0,0004	–
	6	0	0	0
	12	0,0020	0,0004	4,3815
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0,0030	0,0006	1,7715
	168	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	0K	0,0040	0,0004	–
	6	0,0040	0,0003	5,3717
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0,0010	0,0004	6,7331
	168	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	0K	0,0040	0,0004	–
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0,0010	0,0003	7,8779
	72	0,0020	0,0003	5,2786
	168	0,0010	0,0002	8,3236

Tabulka III

Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v kalusové kultuře *Silybum marianum* při použití různých koncentrací elicitoru methylviologenu (MV)

Koncentrace MV [mol l ⁻¹]	Doba odběru [h]	TAX ^b [%]	SILCHR ^c [%]	ISO B ^d [%]	Silymarin komplex
	OK ^a	0	0	0	0
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	6	0	0,002	0	0,002
	12	0	0	0	0
	24	0,001	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0,011	0	0	0
	168	0	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	6	0	0,008	0,002	0,01
	12	0,016	0,003	0	0,003
	24	0	0,004	0	0,004
	48	0	0	0	0
	72	0,002	0	0	0
	168	0,002	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	6	0,001	0,004	0	0,004
	12	0	0,003	0	0,003
	24	0,001	0,004	0	0,004
	48	0	0,004	0	0,004
	72	0	0,007	0	0,007
	168	0	0	0	0

^a OK – kontrola v době 0 h. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení, ^b TAX – taxifolin, ^c SILCHR – silychristin, ^d ISO B – isosilybin B

mě taxifolinu, silychristinu ještě další složka silymarinového komplexu – isosilybin B a to pouze v nepatrném množství (0,002 %) po 6 hodinovém působení elicitoru methylviologenu o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ (tab. III).

V suspenzní kultuře byly zjištěny tyto složky silymarinového komplexu: isosilybin A (po působení methylviologenu (MV) 12 hodin o koncentraci $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ a po působení 72 hodin MV o koncentraci $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹), isosilybin B (po 12 h působení MV o $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ a po 48 h působení MV o $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹), silybin A (po 72 h působení MV o $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹) a silychristin (po 6 a 72 h působení MV o $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹), dále pak taxifolin (u všech tří koncentrací MV). Všechny složky byly zastoupeny pouze v minimálních množstvích, podrobněji tab. III a IV.

V kontrolních vzorcích suspenzní i kalusové kultury *Silybum marianum* nebyl taxifolin zaznamenán vůbec, pouze v kontrolách suspenzních kultur bylo detegováno nepatrné množství silybinu A a B. Všechny složky silymarinového komplexu zjištěné jak u suspenzních, kalusových kultur, tak v živném médiu byly prokázány pouze v nepatrných množstvích (tab. III, tab. IV).

Při náhodném odběru vzorků média při kultivaci suspenzní kultury byl stanoven pouze silybin A (0,001 %)

po 12 hodinovém působení methylviologenu o koncentraci $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹.

U suspenzních i kalusových kultur *Silybum marianum* po působení různých koncentrací methylviologenu bylo zajímavé zvýšení obsahu taxifolinu. Dá se tedy předpokládat, že methylviologen působí jako stresový faktor vyvolávající zvýšenou tvorbu obranných látek – flavonoidů (v tomto případě taxifolinu). Důvodů nízké produkce flavonolignanů v kultuře *Silybum marianum* může být několik. Jedním z nich mohlo být stáří kultury. V této studii byly použity kalusové a suspenzní kultury v 34.–40. pasáži. Gallová¹² ve své studii použila kalusovou a suspenzní kulturu v 10.–25. pasáži. Obsah flavonolignanů však prokazatelně klesal a již ve 34. pasáži byla jejich produkce nulová. Řimáková¹⁶ použila ve své studii nově odvozenou kulturu a elicitační pokusy byly zahájeny od 5. pasáže. Také Alikardis a spol.¹⁷ ve své studii pozorovali pokles produkce flavonolignanů kulturou *Silybum marianum* v závislosti na jejím stáří. Dalším faktorem mohla být volba živného média nebo volba růstových regulátorů. Podle typu a koncentrace auxinů může docházet k pozitivnímu nebo negativnímu ovlivnění biosyntézy nebo akumulace sekundárních produktů¹⁸. Dalším důvodem mohl být nevhodně zvolený elicitor. Předpokladem

Tabulka IV

Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* při použití různých koncentrací elicitoru methylviologenu (MV)

Koncentrace MV [mol l ⁻¹]	Doba odběru [h]	TAX ^b [%]	SILCHR ^c [%]	SIL A ^d [%]	ISO A ^e [%]	ISO B ^f [%]	Silymarin komplex
	0K ^a	0	0	0	0	0	0
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	6	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0,001	0,001	0,002
	24	0,003	0	0	0	0	0
	48	0,002	0	0	0	0	0
	72	0	0	0,003	0	0	0,003
	168	0	0	0	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	6	0,003	0,004	0	0	0	0,004
	12	0,002	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0,001	0	0	0	0	0
	72	0	0,001	0	0	0	0,001
	168	0,001	0	0	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	6	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0,002	0	0	0	0,001	0,001
	72	0,001	0	0	0,001	0	0,002
	168	0,001	0	0	0	0	0,001

^aOK – kontrola v době 0 h. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení, ^bTAX – taxifolin, ^cSILCHR – silychristin, ^dSIL A – silydianin, ^eISO A – isosilybin A, ^fISO B – isosilybin B

úspěšné elicítace je použití vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doba působení. Sánchez-Sampedro a spol.¹⁹ ve své studii dosáhli největší produkce silymarinu použitím elicitoru methyljasmonátu v koncentraci 100 μM, a to o 600 % oproti kontrole. Chen a spol.²⁰ ve své studii sledovali vztah mezi působením reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a produkcí fytoalexinu v kulturách *Salvia miltiorrhiza*. Jako původce superoxidového anionu použili methylviologen. Působení methylviologenu (MV) na rozdíl od působení peroxidu vodíku spustilo produkci fytoalexinu kryptotanshinonu ve všech sledovaných kulturách. Zároveň MV inhiboval tvorbu biomasy a snížil obsah fenolových kyselin.

Práce vznikla díky podpoře Výzkumného úkolu MSM 0021620822 -Výzkum nových lékových struktur.

LITERATURA

- Vodrážka Z.: *Biotechnologie*, str. 7, 63. Academia, Praha 1992.
- Beiderbeck R., Reichling J.: *Biologie* 5, 453 (1989).
- Abdollahi M., Rajnbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A.: *Med. Sci. Monitor.* 10, 141 (2004).
- Ke D. S., Sun G. C., Wang Z. X.: *Plant Growth Reg* 51, 83 (2007).
- Kolektiv autorů: *Český lékopis 2005*. Grada Publishing, Praha 2005.
- Wichtl M.: *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, str. 121. Medfarm, Marburg 1994.
- Kosina P., Bartek J.: *Chem. Listy* 94, 115 (2000).
- Flora M. D. K., Hahn M. D. M., Rosen M. D. H., Banner M. D. K.: *Am. J. Gastroenterol.* 93, 139 (1998).
- Fraschini F., Demartini G., Esposti D.: *Clinic. Drug Investig.* 22, 51 (2002).
- Křen V., Gažák R., Walterová D., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 100, 565 (2006).
- Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant* 15, 473 (1962).
- Gallová K.: *Rigorózní práce*. Universita Karlova, Praha 2003.
- Kolektiv autorů.: *European Pharmacopeia*, 4. vyd. EDQM, Strassburg 2002.
- Kolektiv autorů.: ČSN ISO 3534-1, Statistika-slovník,

- značky, část 1.: Pravděpodobnost a obecné statistické termíny, ČNI, Praha 1994.
15. Kolektiv autorů: Věstník SÚKL 1994.
 16. Řimáková J.: *Disertační práce*. Universita Karlova, Praha 2005.
 17. Alikaris F., Papadakis D., Pantelia K., Kephelas T.: *Fitoterapia* 71, 379 (2000).
 18. Tůmová L., Gallová K., Řimáková J.: *Čes. Slov. Farm.* 53, 135 (2004).
 19. Sánchez-Sampedro M. A., Fernández-Tárrago J., Corchete P.: *J. Biotechnol.* 110, 60 (2005).
 20. Chen H., Chen F.: *Biotechnol. Lett.* 22, 715 (2000).

L. Tůmová and J. Tůma (^a *Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové,* ^b *Department of Biology, Pedagogical Faculty, University, Hradec Králové*): **Affecting Production of Secondary Metabolites in *Silybum marianum* Cell Culture by Paraquat Elicitor Treatment**

Elicitation is one of the methods used for increasing the production or accumulation of secondary metabolites. The present study investigates the effect of time and concentration of methylviologen (paraquat) as abiotic elicitor on the flavonolignan production by *Silybum marianum* callus and suspension cultures. The cultures were cultivated on a Murashige-Skoog medium with addition of 10 mg l^{-1} of 1-naphthylacetic acid. The content of flavonolignans was determined by HPLC. The maximal content of flavonolignans was obtained at the methylviologen concentration in callus cultures $c = 2.19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. The production of flavonolignans in suspension culture was little influenced by elicitation.

KATALYZÁTOR PRO SYNTÉZU ISOPROPOXIDU HLINITÉHO

MIROSLAV RICHTER

Fakulta životního prostředí Univerzity J. E. Purkyně, Králova výšina 3132/7, 400 96 Ústí n.L.

Miroslav.Richter@ujep.cz

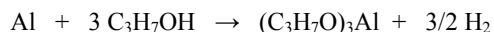
Došlo 27.8.07, přepracováno 4.2.08, přijato 6.2.08.

Klíčová slova: katalyzátor, isopropoxid hlinitý, chlorid hlinitý

Úvod

V rámci výzkumu speciálních keramických materiálů¹ byla ověřena klasická metoda přípravy isopropoxidu hlinitého – jednoho z alkoholátů hlinitých, které jsou běžně laboratorně připravovány a průmyslově vyráběny.

Dle údajů dostupných v literatuře^{2–7} je isopropoxid hlinitý laboratorně připravován a průmyslově vyráběn z práškového nebo granulovaného hliníku různé zrnitosti. Hliník je rozpouštěn v bezvodém propan-2-olu. Reakce je realizována za minimálně 30% přebytku propan-2-olu při teplotě bodu varu reakční směsi. Teplota se pohybuje dle koncentrace roztoku mezi 83 až 85 °C. Reakce se běžně provádí za přítomnosti chloridu rtuťnatého jako katalyzátoru. Při dávkování obvykle postačuje 5 hm.% katalyzátoru vzhledem ke hmotnosti reagujícího hliníku. Průběh chemické reakce je popsán stechiometrickou rovnicí:



Nevýhodou uvedeného způsobu přípravy je právě použití chloridu rtuťnatého jako katalyzátoru. Rtuť a její sloučeniny jsou klasifikovány jako látky nebezpečné, velmi toxické. Proto podléhají speciálním předpisům týkajících se evidence jejich užití, skladování a veškerého nakládání s nimi. Během syntézy znečišťují sloučeniny rtuti všechny reagující i reakcí vznikající látky a reakční aparaturu. Existuje trvalé riziko jejich úniku do pracovního a životního prostředí v důsledku poruch a netěsností aparatury. Zbytek hliníku z rozkladu je klasifikován jako nebezpečný odpad dle zákona o odpadech. Všechny materiály kontaminované rtutí proto musí být ukládány na skládkách nebezpečných odpadů, což je spojeno s vysokými poplatky za uložení.

Proto veškeré laboratorní výzkumné práce komplikovalo použití katalyzátoru na bázi rtuti. Navíc byl do systému reagujících sloučenin vnášen další chemický prvek, který je v meziproduktech nežádoucí. Potenciální uživatel vyvíjené technologie projevil zájem o náhradu chloridu rtuťnatého jiným, nertuťovým katalyzátorem. Proto bylo rozhodnuto o vyzkoušení jiných chemikálií, které by vykazovaly katalytické účinky.

Experimentální část

Chemikálie

V laboratorních podmínkách^{4,6} byly používány výhradně laboratorní chemikálie běžně dostupné na trhu v ČR. Práškový hliník čistoty min. 99,0 %, byl produkt firmy ACROS ORGANICS, New Jersey, USA, dodaný firmou MERCK. Bezvodý propan-2-ol (IPA) čistoty p.a. (min. 99,7 %) dle PND 31-807-78 byl dodáván Lachemou, o.p. Brno, závod Neratovice. Jako katalyzátor byl v první fázi pokusů použit chlorid rtuťnatý čistoty p.a. (min. 99,0 %) dodávaný firmou PENTA, výrobní divizi Chrudim. Ve druhé fázi pokusů byl jako katalyzátor použit bezvodý chlorid hlinitý (min. 98,0 %) dodávaný firmou MERCK.

Pracovní postup

Při přípravě isopropoxidu hlinitého bylo zpravidla dávkováno 300 ml propan-2-olu na 15,0 g práškového hliníku. Přebytek propan-2-olu byl proti stechiometrickému poměru vyšší o 135 %. Toto dávkování je výhodné jak z hlediska chemismu procesu, tak s ohledem na nižší viskozitu reakční směsi.

Jak již bylo uvedeno, v první fázi pokusů byl jako katalyzátor použit chlorid rtuťnatý. Zpravidla bylo dávkováno 0,50 g HgCl₂ na 15,0 g práškového hliníku. Ve druhé fázi pokusů bylo k reagujícím složkám dávkováno 1,0 až 1,5 g bezvodého chloridu hlinitého.

Reakční směs byla po navážení složek dávkována do skleněné baňky s magnetickým míchadlem, opět zvažena a umístěna na elektrickou topnou plochu. Na hrdlo rozkladné baňky byl připojen zpětný vodní chladič s teploměrem. Za stálého míchání byla reakční směs ohřívána k teplotě bodu varu, která je cca 83 °C. Ještě před dosažením teploty bodu varu se začaly uvolňovat bubliny vodíku. Chemická reakce rozpouštění hliníku v propan-2-olu je exotermní a reakční směs se intenzivně zahřívá. Při katalýze chloridem rtuťnatým je průběh reakce rychlejší než v případě použití bezvodého chloridu hlinitého. To dokládají dále uvedené výsledky. Před dosažením bodu varu směsi bylo vypnuto topení nebo intenzita vytápění snížena. Od začátku rozkladu byla do zpětného chladiče puštěna chladící voda. Chladný kondenzát propan-2-olu ze zpětného chladiče postačuje pro chlazení reagující směsi a potlačení pění. Za trvalého míchání byl hliník rozpouštěn po dobu 3 h.

Pak byl v laboratorní destilační aparatuře za atmosférického tlaku z reakční směsi oddestilován přebytek propan-2-olu. Dále byl za sníženého tlaku oddestilován isopropoxid hlinitý. V rozkladné nádobě zbýval pouze tuhý podíl nerozpuštěného hliníku a katalyzátoru. Tento zbytek byl opět zvažován. Z rozdílu hmotností před reakcí a po reakci s destilacemi byla vypočítána účinnost rozpouštění hliníku. Příklady dosažených účinností rozkladu jsou uvedeny v tab. I–III.

Výsledky a diskuse

V první fázi pokusů při použití katalyzátoru chloridu rtuťnatého bylo dosaženo průměrné účinnosti rozkladu 90,6 %, jak je uvedeno v tab. I.

Laboratorně bylo opakovaně ověřeno, že výše uvedenou reakci rozpouštění práškového hliníku v bezvodém propan-2-olu lze katalyzovat také bezvodým chloridem hlinitým (AlCl_3) zcela bez přítomnosti chloridu rtuťnatého. Tím se zabrání tomu, aby byl do systému reagujících látek vnášen další chemický prvek, což je výhodné pro čistotu připravovaného isopropoxidu hlinitého a dalších z něho připravovaných produktů. Použitá metodika rozpouštění a vyhodnocení výsledků byla stejná jako v případě použití chloridu rtuťnatého. Dosažené výsledky uvádí tab. II.

Pokud byl použit jako katalyzátor bezvodý chlorid hlinitý, byla účinnost rozkladu průměrně 81,0 %, tj. o 9,6 % nižší než v případě použití chloridu rtuťnatého. S ohledem na možné úspory propan-2-olu bylo zkoušeno snížení přebytku propan-2-olu ze 135 % na polovinu zdvojnásobením dávky práškového hliníku, při dávkování

Tabulka I

Účinnost rozpouštění práškového hliníku v propan-2-olu za přítomnosti HgCl_2

Vzorek	Vstup Al + kat. [g]	Výstup Al + kat. [g]	Účinnost [%]
1	15,0 + 0,05	1,80	88,04
2	15,0 + 0,05	1,78	88,17
3	15,0 + 0,5	1,36	91,23
4	15,0 + 0,5	1,19	92,32
5	15,0 + 0,7	1,27	91,91
6	15,0 + 1,1	1,29	91,98

Tabulka II

Účinnost rozpouštění práškového hliníku v propan-2-olu za přítomnosti AlCl_3

Vzorek	Vstup Al + kat. [g]	Výstup Al + kat. [g]	Účinnost [%]
1	15,0 + 1,0	3,30	79,37
2	15,0 + 1,0	3,01	81,19
3	15,0 + 1,0	3,74	82,19
4	15,0 + 1,0	2,60	83,75
5	15,0 + 1,0	2,80	82,50
6	15,0 + 1,0	2,57	83,93
7	15,0 + 1,5	3,40	79,39
8	15,0 + 1,5	3,30	80,00
9	15,0 + 1,0	3,09	80,63
10	15,0 + 1,5	3,10	81,21
11	15,0 + 1,5	3,80	76,96

Tabulka III

Účinnost rozpouštění práškového hliníku v propan-2-olu za přítomnosti AlCl_3

Vzorek	Vstup Al + kat. [g]	Výstup Al + kat. [g]	Účinnost [%]
1	30,0 + 1,5	8,20	73,97
2	30,0 + 1,5	7,80	75,24
3	30,0 + 1,5	8,40	73,33
4	30,0 + 1,5	7,93	74,82

katalyzátoru 1,5 g a stejných reakčních podmínkách. Výsledky jsou uvedeny v tab. III.

Porovnáním výsledků uvedených v tab. II a III je patrné další snížení účinnosti rozkladu průměrně o 5,7 % při dávce katalyzátoru 1,5 g. S ohledem na růst viskozity roztoku a nižší účinnost nebylo dále sníženo dávkování propan-2-olu do rozkladu používáno.

Závěr

Bylo prokázáno, že reakci práškového hliníku s propan-2-olem lze úspěšně katalyzovat bezvodým chloridem hlinitým. Dávkování katalyzátoru musí být 6 až 10 hm.% vzhledem ke hmotnosti reagujícího hliníku. Účinnost rozpouštění a tím výtěžnost chemické reakce je při použití bezvodého chloridu hlinitého jako katalyzátoru o 9,6 % nižší, než je v případě použití chloridu rtuťnatého při shodných fyzikálně-chemických podmínkách reakce. Orientačně bylo ověřeno, že ani prodloužením doby rozkladu na 5 h nedošlo k významnému zvýšení účinnosti rozkladu. Důvodem je pravděpodobně to, že při použití AlCl_3 je rychlost vratné reakce vyšší než při použití HgCl_2 .

Testy účinnosti a rychlosti rozkladu práškového hliníku ve propan-2-olu s uvedenými katalyzátory nebyly realizovány za zvýšeného tlaku a teploty v autoklávu, kdy lze očekávat dosažení srovnatelných účinností rozpouštění hliníku na úrovni 80 % v kratším reakčním čase.

Naprostým vyloučením sloučenin rtuti z procesu laboratorní přípravy nebo průmyslové výroby isopropoxidu hlinitého je zcela vyřešen problém nebezpečných, vysoce toxických sloučenin rtuti. Je tak odstraněno riziko kontaminace všech použitých materiálů, meziproductů, výrobků a aparatur sloučeninami rtuti. Poplatky za ukládání odpadů jsou použitím nertuťového katalyzátoru výrazně sníženy. Je eliminováno riziko poškození pracovního a životního prostředí sloučeninami rtuti.

K rozkladu byl rovněž používán propan-2-ol oddestilovaný z reakční směsi. Pokud obsahoval v důsledku sorpce atmosférické vlhkosti více vody než originální alkohol (do 0,2 % H_2O), bylo možné jej dosušit zvýšením dávky chloridu hlinitého v množství cca 0,5–1,0 g před dávkováním práškového hliníku. K rozkladu práškového hliníku je tedy možné použití regenerovaného propan-2-olu bez rizika hydrolyzy připravovaného isopropoxidu hlinitého.

LITERATURA

1. *International Chemical Safety Cards*. BGVV, Berlin 1997.
2. Austin G. T.: *The Industrially Significant Organic Chemicals*. McGraw-Hill, New York 1974.
3. Červinka O., Dědek V., Ferles M.: *Chemie organických sloučenin I*. SNTL, Praha 1991.
4. Červinka O., Dědek V., Ferles M.: *Organická chemie*. Informatorium, Praha 1991.
5. Gauckler L. J.: *Ingenierkeramik 2. Herstellung von Keramik, Band 1*, Vorlesung WS 2000/2001, Zürich 2001.
6. Richter M.: *Disertační práce*, Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, Pardubice 2001.
7. http://en.wikipedia.org/wiki/Aluminium_isopropoxide, staženo 11. prosince 2007.

M. Richter (*Faculty of Environment, J. E. Purkyně University, Ústí nad Labem*): **A New Catalyst for the Synthesis of Aluminum Isopropoxide**

Aluminum reacts with excess anhydrous propan-2-ol at the boil in the presence of a catalyst. The toxic mercury (II) chloride catalyst can be replaced by anhydrous aluminum trichloride. The yields of the reaction are somewhat lower but the catalyst is hazardless.



Americké vědecké informační středisko, o.p.s.

Kontakt:

AMVIS, o. p. s.

Senovážné nám. 24

110 00 Praha 1

e-mail: amvis@amvis.cz

VÝZVA

k podávání žádostí o podporu
česko-americké vědeckotechnické spolupráce

Uzávěrka přihlášek je 10. července 2009.

Bližší informace na www.amvis.cz

VÝUKA CHEMIE

KRITÉRIÁ POUŽITIA APROXIMATÍV- NYCH VZŤAHOV PRI VÝPOČTE JEDNODUCHÝCH PROTOLYTICKÝCH ROVNOVÁH. SLABÉ ZÁSADY A HYDROLYZOVANÉ SOLI

PETER TOMČÍK^{a,b}, VERONIKA KLBÍKOVÁ^a
a DUŠAN BUSTIN^a

^a Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Katedra chémie, Pedagogická fakulta, Katolícka univerzita v Ružomberku, Námestie A. Hlinku 56/1, 034 01 Ružomberok, Slovenská republika
peter.tomcik@stuba.sk

Došlo 10.1.08, prepracované 25.11.08, prijaté 5.12.08.

Kľúčové slová: protolytické rovnováhy, slabé zásady, hydrolyzované soli, výpočet pH, aproximácie

Obsah

1. Úvod
2. Výpočet pH vodných roztokov slabých jednosýtnych zásad
3. Výpočet pH vodných roztokov hydrolyzovaných solí silnej zásady a slabej kyseliny
4. Výpočet pH vodných roztokov hydrolyzovaných solí slabej zásady a silnej kyseliny
5. Záver

1. Úvod

Predložená práca sa zaoberá kritériami použitia aproximatívnych vzťahov pri výpočte pH v prípadoch jednoduchých protolytických rovnováh v zriadených vodných roztokoch slabých jednosýtnych zásad a hydrolyzovaných solí. Nadväzuje na náš predchádzajúci článok¹, v ktorom sme odvodili kritériálne nerovnice pre silné protolyty a slabé jednosýtne kyseliny. Riešením kritériálnych nerovnic bola hodnota tzv. kritickej koncentrácie c_k daného protolytu, udávajúca hranicu možnosti použitia jednoduchého aproximatívneho vzťahu pre výpočet pH ($c > c_k$), alebo nutnosti uchýliť sa k exaktnějšíemu, ale zložitejšie-

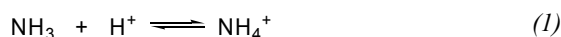
mu vzťahu. V podstate ide o vymedzenie koncentračných oblastí pre daný typ protolytu, v ktorých sa pH počíta pomocou kubickej rovnice, kvadratickej rovnice, kvadratickej rovnice bez lineárneho člena, alebo pomocou tzv. najjednoduchšieho vzťahu. Výpočet c_k je vzťahnutý na tolerovateľnú chybu 0,01 jednotky pH t.j. na relatívnu chybu $[H^+]$ 2,28 %. Vplyv na použitie istej aproximácie má nielen koncentrácia daného protolytu, ale v prípade slabých protolytov aj ich sila vyjadrená disociačnou resp. protonizačnou konštantou. Pri výpočtoch považujeme aktivitné koeficienty za jednotkové a pri viacsýtnych protolytoch predpokladáme len jednostupňovú rovnováhu.

Veríme, že práca bude učiteľom chémie a ich študentom nápomocná pri objasňovaní zákonitostí, spojených s chemickými rovnovahami v pedagogickom procese na stredných či vysokých školách.

2. Výpočet pH vodných roztokov slabých jednosýtnych zásad

Pri výpočte tohto typu protolytickej rovnováhy je najlepšie vychádzať z Brønstedovej teórie kyselín a zásad. Táto teória je založená na tom, že slabá zásada je taká chemická substancia, ktorá vo vodnom roztoku prijíma protón (protonizuje). Protonizácia nie je stopercentná, ale ustáľuje sa rovnováha medzi protonizovanou a deprotonizovanou formou podľa príslušnej protonizačnej konštanty.

Najčastejšie sa ako príklad slabej jednosýtnej zásady uvádza amoniak NH_3 , ktorý protonizuje podľa rovnice



Rovnováhu protonizácie vyjadruje protonizačná konštantá

$$K_{NH_3}^H = \frac{[NH_4^+]}{[NH_3][H^+]} \quad (2)$$

Vo vodnom roztoku amoniaku bude od nuly odlišná rovnovážna koncentrácia nasledujúcich častíc: $[H_2O]$ (nemá vplyv na rovnováhu), $[NH_3]$, $[OH^-]$, $[H^+]$ a $[NH_4^+]$.

Na opis sústavy potrebujeme 4 rovnice, ktorými bude táto rovnovážna sústava jednoznačne opísaná. Sú to podmienka elektroneutrality roztoku, látková bilancia amoniaku, vzťah pre protonizačnú konštantu amoniaku a vzťah pre iónový súčin vody.

$$K_{NH_3}^H [H^+]^3 + (K_{NH_3}^H c_{NH_3} + 1) [H^+]^2 - K_{NH_3}^H K_V [H^+] - K_V = 0 \quad (3)$$

Dosadzovacou metódou výpočet smeruje k rovnici (3), z ktorej $[H^+]$ možno vypočítať iteráčnym spôsobom. Pre $c_{NH_3} = 0$ je riešenie $[H^+] = 10^{-7}$, čo zodpovedá čistej vode. Kubická rovnica je všeobecným vzťahom pre výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov a pH pre vodný roztok slabej jednosýtnej zásady. Iteračné riešenie je zložité a nepohodlné, preto sa pri týchto typoch rovnovážnych výpočtov uchýľujeme k istým zjednodušeniam, ktoré vedú k aproximativným vzťahom.

Ak môžeme zanedbať $[H^+]$ oproti $[OH^-]$, dostaneme kvadratickú rovnicu:

$$K_{NH_3}^H c_{NH_3} [H^+]^2 - K_{NH_3}^H K_V [H^+]^2 - K_V = 0 \quad (4)$$

Jej riešením je fyzikálne významný koreň

$$[H^+] = \frac{K_{NH_3}^H K_V + \sqrt{(K_{NH_3}^H K_V)^2 + 4K_{NH_3}^H K_V c_{NH_3}}}{2K_{NH_3}^H c_{NH_3}} \quad (5)$$

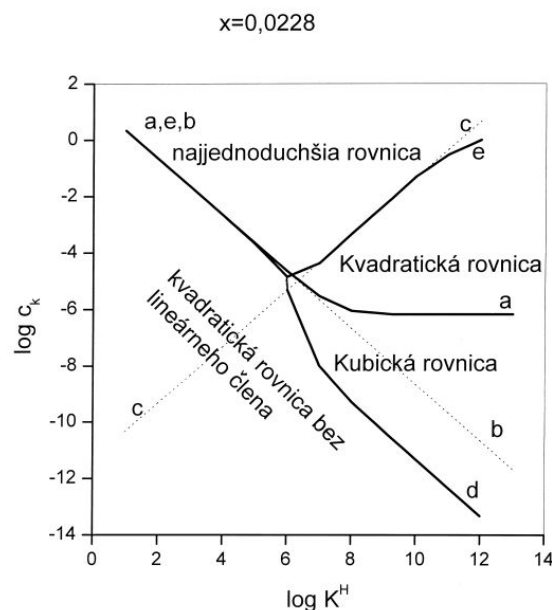
Ak môžeme zanedbať $[OH^-]$ voči c_{NH_3} , ale $[H^+]$ oproti $[OH^-]$ zanedbať nemôžeme, dostaneme kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena s riešením:

$$[H^+] = \sqrt{\frac{K_V}{K_{NH_3}^H c_{NH_3} + 1}} \quad (6)$$

Ak môžeme zanedbať $[H^+]$ a súčasne $[OH^-]$ oproti analytickej koncentrácii amoniaku, dostaneme najjednoduchší vzťah:

$$[H^+] = \sqrt{\frac{K_V}{K_{NH_3}^H c_{NH_3}}} \quad (7)$$

Z uvedeného vyplýva, že nie je jednoduché rozhodnúť sa, aký vzťah pri výpočte použiť. Je zrejme, že uvedené druhy aproximácií závisia od analytickej koncentrácie slabej jednosýtnej zásady a súčasne aj od jej sily reprezentovanej príslušnou protonizačnou konštantou obdobne ako tomu bolo pri slabých jednosýtnych kyselinách¹. Vypočítať kritickú koncentráciu (t.j. koncentráciu pod hodnotou ktorej už nemožno použiť zjednodušený vzťah) možno v závislosti od protonizačnej konštanty vypočítať z kritériálnych nerovnic. Ľavá strana nerovnice vždy reprezentuje absolútnu hodnotu rozdielu $[H^+]$ vypočítaného zo vzťahov, ktorých platnosť porovnávame. Pravá strana nerovnice je číselná hodnota chyby $[H^+]$, ktorú ešte pri výpočte tolerujeme. Spravidla je to chyba 2,28 %, čo zodpovedá 0,01 jednotky pH. Vypočítali sme a na obr. 1 znázornili v závislosti od $\log K^H$ kritickú koncentráciu z nasledovných kritériálnych nerovnic:



Obr. 1. Závislosť logaritmu kritickej koncentrácie slabej jednosýtnej zásady od $\log K^H$ a oblasti použitia aproximativných vzťahov vypočítaných pre chybu 0,01 pH; čiara a – vymedzuje oblasť koncentrácie, pri ktorej sa výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov podľa kvadratickej rovnice (5) odchyľuje od exaktnej hodnoty vypočítanej z kubickej rovnice (3) o menej než 2,28 % (chyba určenia pH je 0,01pH), čiara b – tak ako čiara a len výpočet sa uskutočnil podľa najjednoduchšieho vzťahu (7) a kvadratickej rovnice bez lineárneho člena (6), čiara c – výpočet podľa najjednoduchšieho vzťahu (7) a kvadratickej rovnice (5), čiara d – výpočet podľa kvadratickej rovnice bez lineárneho člena (6) a kubickej rovnice (3), čiara e – výpočet podľa najjednoduchšieho vzťahu (7) a kubickej rovnice (3)

čiara a: rozhranie možnosti použitia kvadratickej rovnice od nutnosti použiť kubickú rovnicu

$$\frac{|[H^+]_{rov.5} - [H^+]_{rov.3}|}{[H^+]_{rov.3}} 100 = 2,28 \quad (8)$$

čiara b: rozhranie možnosti použitia najjednoduchšej rovnice od nutnosti použitia kvadratickej rovnice bez lineárneho člena:

$$\frac{|[H^+]_{rov.7} - [H^+]_{rov.6}|}{[H^+]_{rov.6}} 100 = 2,28 \quad (9)$$

čiara c: rozhranie možnosti použitia najjednoduchšej rovnice od nutnosti použitia kvadratickej rovnice:

$$\frac{|[H^+]_{rov.7} - [H^+]_{rov.5}|}{[H^+]_{rov.5}} 100 = 2,28 \quad (10)$$

čiaru d: rozhranie možnosti použitia kvadratickej rovnice bez lineárneho člena od nutnosti použitia kubickej rovnice

$$\frac{[H^+]_{rov.6} - [H^+]_{rov.3}}{[H^+]_{rov.3}} 100 = 2,28 \quad (11)$$

čiaru e: rozhranie možnosti použitia najjednoduchšej rovnice od nutnosti použitia kubickej rovnice

$$\frac{[H^+]_{rov.7} - [H^+]_{rov.3}}{[H^+]_{rov.3}} 100 = 2,28 \quad (12)$$

Vypočítala sa závislosť logaritmu kritického koncentrácie od hodnoty protonizačnej konštanty pre kritérium dané rovnicou (8) (obr. 1, čiara a). Zistilo sa, že pre zásady s hodnotou protonizačnej konštanty väčšou ako 8 kritická koncentrácia má konštantnú hodnotu rádu 10^{-7} M. Pre slabšie zásady kritická koncentrácia lineárne stúpa s poklesom protonizačnej konštanty.

Kritérium z rovnice (9) je analyticky vyjadriteľné takto:

$$c_k = \frac{(1-x)^2}{K^H [1-(1-x)^2]} \quad (13)$$

Pre $x = 0,0228$, čo predstavuje chybu 0,01 pH, možno písať:

$$c_k = 21,182707/K^H \quad (14)$$

Po zlogaritmovaní dostaneme rovnicu priamky:

$$\log c_k = 1,326 + pK^H \quad (15)$$

Ako vidno z obr. 1, čiara b sa pre slabé zásady s $\log K^H < 8$ kryje s čiarou a z rovnice (8). To znamená, že pre uvedené slabé zásady, kubická rovnica nemá zmysel, ale rozhodujeme sa len medzi najjednoduchšou rovnicou a kvadratickou rovnicou bez lineárneho člena, ktorá je exaktným vzťahom pre výpočet pH. Ak je logaritmus protonizačnej konštanty väčší ako 8, kvadratická rovnica bez lineárneho člena sa od kubickej začína odchyľovať a poskytuje nesprávne hodnoty $[H^+]$.

Kritérium z rovnice (10) je tiež analyticky vyjadriteľné pre kritickú koncentráciu

$$c_k = \frac{(1-x)^2}{[1-(1-x)^2]^2} K^H K_V \quad (16)$$

Po zlogaritmovaní a dosadením za $x = 0,0228$ dostaneme rovnicu priamky (čiara c, obr. 1):

$$\log c_k = \log 469,89 + \log K^H - 14 \quad (17)$$

Iteračné riešenie kritéria (11) naznačuje, že kvadratická rovnica bez lineárneho člena sa dá použiť nielen pre veľmi slabé zásady, kde plne nahrádza zložitú kubickú rovnicu, ale aj pre extrémne zriedené roztoky slabých zá-

sad s vyšším K^H . Kritérium z rovnice (12) je parabolické, pri nízkych hodnotách K^H sa kryje s kritériom z rovnice (11) a pri vyšších hodnotách protonizačnej konštanty sa kryje s kritériom z rovnice (10), čo svedčí o tom, že kubická rovnica prechádza najprv na kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena resp. na kvadratickú rovnicu pri silnejších zásadách.

3. Výpočet pH vodných roztokov hydrolyzovaných solí silnej zásady a slabej kyseliny

Učebnicovým príkladom býva hydrolyza octanu sodného. Táto látka hydrolyzuje podľa rovnice



kde vzniknutá kyselina octová disociuje¹. Znamená to, že v roztoku sú nenulové rovnovážne koncentrácie $[CH_3COOH]$, $[H^+]$, $[Na^+]$, $[OH^-]$ a $[CH_3COO^-]$.

Rovnovážna koncentrácia vody sa neuvažuje, lebo voda je v systéme vo veľkom nadbytku a jej zmeny sú preto zanedbateľné. Ďalej sa predpokladá, že soľ je úplne disociovaná. To znamená, že v roztoku neexistujú molekuly nedisociovaného octanu sodného a rovnovážna koncentrácia $[Na^+]$ sa rovná jeho analytickej koncentrácii c_{CH_3COONa} . Z rovnice hydrolyzy je zrejme, že vzniká silná zásada a teda roztok bude mať pH väčšie ako 7. Hodnota pH však nebude až taká vysoká, ako v prípade roztoku silnej zásady, pretože hydrolyzou vzniknutá slabá kyselina zoslabuje účinok vzniknutého NaOH. Zoslabenie je úmerné sile kyseliny (jej hodnote pK).

Systém možno opísať štyrmi nasledovnými rovnicami: 1. Podmienka elektroneutrality roztoku (pre jednocenné častice platí, že súčet koncentrácií katiónov a aniónov je rovnaký), 2. Látková bilancia octanu (súčet koncentrácií častíc obsahujúcich octanový anión sa rovná analytickej koncentrácii octanu sodného), 3. Disociačná konštantá K_{CH_3COOH} vzniknutej kyseliny octovej. 4. Poslednou rovnicou je vzťah pre iónový súčin vody.

Riešenie tejto sústavy 4 rovníc o 4 neznámych vedie ku kubickej rovnici, ktorá je všeobecným vzťahom pre výpočet pH hydrolyzovanej zásaditej soli:

$$[H^+]^3 + (c_{CH_3COONa} + K_{CH_3COOH}) \cdot [H^+]^2 - K_V \cdot [H^+] - K_{CH_3COOH} \cdot K_V = 0 \quad (19)$$

Ak je koncentrácia protónov omnoho menšia ako koncentrácia OH^- , kubická rovnica prejde na kvadratickú rovnicu:

$$c_{CH_3COONa} [H^+]^2 - K_V \cdot [H^+] - K_{CH_3COOH} \cdot K_V = 0 \quad (20)$$

ktorú možno riešiť napr. pomocou diskriminantu. Riešenie má tvar:

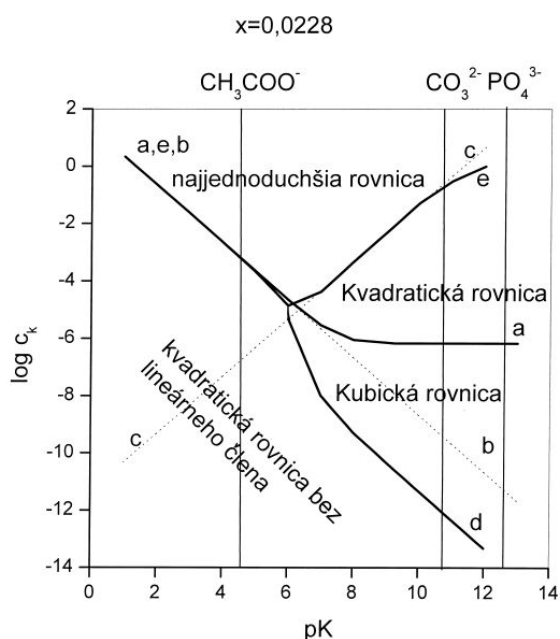
$$[H^+] = \frac{K_V + \sqrt{K_V + 4c_{CH_3COONa}K_{CH_3COOH}K_V}}{2c_{CH_3COONa}} \quad (21)$$

Ak môžeme zanedbať $K_V/[H^+]$ a teda aj $[H^+]$ oproti c_{CH_3COONa} , ale $K_V/[H^+]$ oproti $[H^+]$ nemožno zanedbať, dostaneme kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena. Jej riešenie je

$$[H^+] = \sqrt{\frac{K_{CH_3COOH}K_V}{c_{CH_3COONa} + K_{CH_3COOH}}} \quad (22)$$

Najjednoduchším prípadom pri praktických výpočtoch je, že okrem zanedbania rovnovážnej koncentrácie protónov oproti rovnovážnej koncentrácii hydroxidových aniónov môžeme zanedbať aj rovnovážnu koncentráciu hydroxidových aniónov oproti analytickej koncentrácii octanu sodného c_{CH_3COONa} . Potom dostaneme najjednoduchší vzťah:

$$[H^+] = \sqrt{\frac{K_{CH_3COOH}K_V}{c_{CH_3COONa}}} \quad (23)$$



Obr. 2. Závislosť logaritmu kritickéj koncentrácie hydrolyzovanej soli slabej jednosýtnej kyseliny a silnej zásady (zásaditej soli) od pK slabej kyseliny uvoľnenej hydrolyzou a oblasti použitia aproximatívnych vzťahov vypočítaných pre chybu 0,01 pH; čiara a – vymedzuje oblasť koncentrácie, pri ktorej sa výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov podľa kvadratickej rovnice (21) odchyľuje od exaktnej hodnoty vypočítanej z kubickej rovnice (19) o menej než 2,28 % (chyba určenia pH je 0,01 pH), čiara b – tak ako čiara a, len výpočet sa uskutočnil podľa najjednoduchšieho vzťahu (23) a kvadratickej rovnice bez lineárneho člena (21), čiara c – výpočet podľa najjednoduchšieho vzťahu (23) a kvadratickej rovnice (21), čiara d – výpočet podľa kvadratickej rovnice bez lineárneho člena (22) a kubickej rovnice (19), čiara e – výpočet podľa najjednoduchšieho vzťahu (23) a kubickej rovnice (19). Priesečníky zvislých čiar s čiarami a, b, c, d, e vymedzujú kritické koncentrácie pre octany, uhličitaný a fosforečnaný silných zásad

Podobne ako pri slabých zásadách máme aj tu na výber až štyri možnosti, podľa akého vzťahu počítať pH. Aj v prípade solí slabých kyselín a silných zásad sa dajú stanoviť kritériá použitia aproximatívnych vzťahov. Budú také isté ako v prípade slabých zásad, len sa zmení číslo príslušnej rovnice. Kritériá, kde sa vyskytuje riešenie kubickej rovnice, sa dajú vypočítať iteratívne. Ostatné sú priamky vyjadriteľné analyticky, napr. kritická koncentrácia pre rozhodnutie, kedy použiť kvadratickú rovnicu, alebo najjednoduchší vzťah sa vypočíta podľa vzťahu:

$$c_k = \frac{(1-x)^2 K_V}{[1-(1-x)^2]^2 K_K} \quad (24)$$

Kritická koncentrácia pre rozhodnutie, kedy použiť najjednoduchší vzťah, alebo kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena, sa vypočíta podľa rovnice:

$$c_k = \frac{(1-x)^2 K_K}{[1-(1-x)^2]} \quad (25)$$

Tieto čiary majú opačný priebeh ako v prípade slabých jednosýtnych zásad, avšak závislosť $\log c_k$ od pK je pre $x = 0,0228$ tvarovo rovnaká ako vidieť z obr. 2. Znamená to, že soľ má tým viac zásaditý charakter, čím slabšia (vyššie pK) je kyselina, ktorá vzniká pri jej hydrolyze. pH silno zásaditých sodných solí ako napr. fosforečnan, peroxid, sulfid, arzenitan, uhličitan, kyanid sa musí počítať podľa kvadratickej rovnice už od koncentrácií rádu $0,1 \text{ mol l}^{-1}$. Naopak pre slabozásadité sodné soli ako napr. dusitan, rodanid, siričitan, štaveľan, octan, mravčan, benzoan sa treba rozhodovať iba medzi najjednoduchšou rovnicou alebo kvadratickou rovnicou bez lineárneho člena, ktorá je pre tieto soli exaktným vzťahom.

4. Výpočet pH vodných roztokov hydrolyzovaných solí slabej zásady a silnej kyseliny

Za klasický prípad sa považuje vodný roztok chloridu amónneho. Chlorid amónny hydrolyzuje podľa rovnice:



kde vzniká amoniak, ktorý protonizuje podľa rovnice (2). Znamená to, že v roztoku sú nenulové rovnovážne koncentrácie týchto častíc: $[NH_3]$, $[H^+]$, $[NH_4^+]$, $[OH^-]$ a $[Cl^-]$. Rovnovážna koncentrácia vody sa pri opise rovnováhy zahŕňa do rovnovážnej konštanty, lebo voda je v systéme vo veľkom nadbytku a zmeny jej koncentrácie sú zanedbateľné. Ďalej predpokladáme, že soľ je úplne disociovaná. To znamená, že v roztoku neexistujú molekuly nedisociovaného chloridu amónneho a rovnovážna koncentrácia Cl^- sa rovná jeho analytickej koncentrácii c_{NH_4Cl} .

Systém možno opísať štyrmi rovnicami: 1. Podmienka elektroneutrality roztoku (pre jednocenné častice platí: súčet koncentrácií katiónov a aniónov je rovnaký), 2. Látková bilancia chloridu amónneho, 3. protonizačná konštanta $K_{\text{NH}_3}^{\text{H}}$ vzniknutého amoniaku (rovnica 2) a tak ako v predchádzajúcich prípadoch 4. vzťah pre autoprotolýzu vody. Riešenie sústavy 4 rovnic o 4 neznámych vedie znova ku kubickej rovnici:

(27)

$$K_{\text{NH}_3}^{\text{H}} [\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^2 - (K_{\text{V}} K_{\text{NH}_3}^{\text{H}} + c_{\text{NH}_4\text{Cl}}) [\text{H}^+] - K_{\text{V}} = 0$$

Táto rovnica je exaktným vzťahom pre výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov pre roztok soli slabej zásady a silnej kyseliny. Jej riešenie je dosiahnuteľné len pomocou iteračných algoritmov, preto sa snažíme použiť aproximácie, ktoré závisia nielen od analytickej koncentrácie soli, ale aj od sily slabej zásady, ktorá vzniká hydrolyzou.

Ak je koncentrácia $[\text{OH}^-]$ omnoho menšia ako koncentrácia $[\text{H}^+]$ vzťah (27) prejde na kvadratickú rovnicu:

$$K_{\text{NH}_3}^{\text{H}} [\text{H}^+]^2 + [\text{H}^+] - c_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 0 \quad (28)$$

ktorej riešenie je:

$$[\text{H}^+] = \frac{-1 + \sqrt{1 + 4K_{\text{NH}_3}^{\text{H}} c_{\text{NH}_4\text{Cl}}}}{2K_{\text{NH}_3}^{\text{H}}} \quad (29)$$

Ak popri prvom predpoklade možno predpokladať, že aj $[\text{H}^+] \ll c_{\text{NH}_4\text{Cl}}$ vzťah (27) prejde na najjednoduchší vzťah:

$$[\text{H}^+] = \sqrt{\frac{c_{\text{NH}_4\text{Cl}}}{K_{\text{NH}_3}^{\text{H}}}} \quad (30)$$

Pri soliach silnej kyseliny a slabej zásady s vyšším $\log K^{\text{H}}$ možno zanedbať $[\text{H}^+]$ oproti $c_{\text{NH}_4\text{Cl}}$, ale $[\text{H}^+]$ oproti $K_{\text{V}}/[\text{H}^+]$ nemožno zanedbať, vzťah (27) sa zmení na kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena s riešením:

$$[\text{H}^+] = \sqrt{\frac{c_{\text{s}} - K_{\text{V}} K_{\text{NH}_3}^{\text{H}}}{K_{\text{NH}_3}^{\text{H}}}} \quad (31)$$

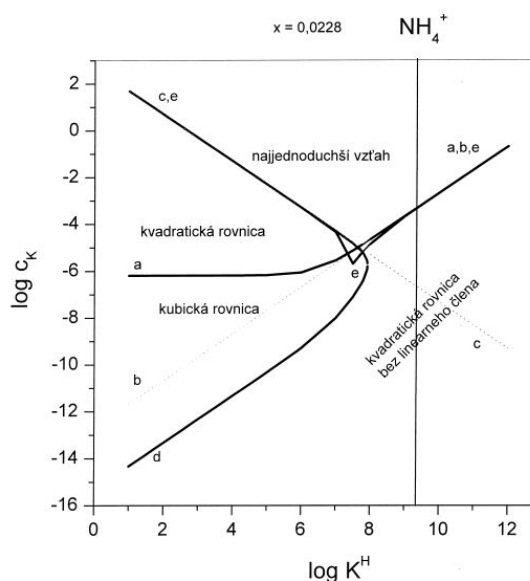
Vypočítali sa kritické koncentrácie podľa príslušných kritérií vyjadrených rovnicami 8–12 s tým rozdielom, že $[\text{H}^+]$ sa vypočítala podľa vzťahov odvodených v časti 4. Kritická koncentrácia, kedy použiť kvadratickú rovnicu alebo najjednoduchší vzťah, sa vypočíta podľa vzťahu:

$$c_{\text{k}} = \frac{(1-x)^2}{[1-(1-x)^2]^2} K^{\text{H}} \quad (32)$$

čo je v logaritmických súradniciach $\log c_{\text{k}}$ a $\log K^{\text{H}}$ pre $x = 0,0228$ rovnica priamky:

$$\log c_{\text{k}} = \log 469,8898 - \log K^{\text{H}} \quad (33)$$

Kritická koncentrácia, kedy použiť najjednoduchší vzťah, alebo kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena sa



Obr. 3. Závislosť logaritmu kritického koncentrácie hydrolyzovanej soli slabej jednosýtnej zásady a silnej kyseliny (kyslej soli) od $\log K^{\text{H}}$ slabej zásady uvoľnenej hydrolyzou a oblasti použitia aproximatívnych vzťahov vypočítaných pre chybu 0,01 pH; čiara a – vymedzuje oblasť koncentrácie, pri ktorej sa výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov podľa kvadratickej rovnice (29) odchyľuje od exaktnej hodnoty vypočítanej z kubickej rovnice (27) o menej než 2,28 % (chyba určenia pH je 0,01 pH), čiara b – tak ako čiara a, len výpočet sa uskutočnil podľa najjednoduchšieho vzťahu (30) a kvadratickej rovnice bez lineárneho člena (31), čiara c – výpočet podľa najjednoduchšieho vzťahu (30) a kvadratickej rovnice (29), čiara d – výpočet podľa kvadratickej rovnice bez lineárneho člena (31) a kubickej rovnice (27), čiara e – výpočet podľa najjednoduchšieho vzťahu (30) a kubickej rovnice (27). Zvislá čiara ukazuje oblasti použiteľnosti vzťahov pre amónne soli

vypočíta podľa rovnice:

$$c_{\text{k}} = \frac{(1-x)^2}{[1-(1-x)^2]} K_{\text{V}} K^{\text{H}} \quad (34)$$

V logaritmických súradniciach a pre $x = 0,0228$ je to rovnica stúpajúcej priamky s tvarom:

$$\log c_{\text{s}} = \log 21,1827 - 14 + \log K^{\text{H}} \quad (35)$$

Ako vidno s obr. 3, ostatné kritériá majú rovnaký tvar ako pri slabých jednosýtnych kyselinách¹ s tým rozdielom, že čím je slabá zásada vznikajúca hydrolyzou silnejšia, tým je soľ slabšia a vtedy odpadá použitie kubickej rovnice. Plne ju nahrádza kvadratická rovnica bez lineárneho člena. Ak vzniká veľmi slabá zásada, je treba pH počítať podľa kvadratickej rovnice, pretože kritická koncentrácia, kedy najjednoduchší vzťah prechádza na kvadratickú rovnicu, je nereálne vysoká.

5. Záver

V tomto článku sme opísali kritériá použitia aproximatívnych vzťahov pri výpočte jednoduchých protolytických rovnováh v čistej vode. Ide o tri druhy protolytov: slabé jednosýtne zásady, hydrolyzované soli slabej jednosýtnej kyseliny a silnej zásady a hydrolyzované soli slabej jednosýtnej kyseliny a silnej kyseliny. Exaktným vzťahom pre výpočet pH je zložitá kubická rovnica, ktorej riešenie je prístupné len pomocou výpočtovej techniky. Táto rovnica vplyvom zjednodušujúcich predpokladov prechádza na kvadratickú rovnicu, kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena a najjednoduchší vzťah. To, aký vzťah použiť, závisí nielen od koncentrácie príslušného protolytu, ale aj od sily daného protolytu resp. od sily slabého protolytu, ktorý vzniká hydrolyzou. Vypočítali sme kritické koncentrácie, t.j. koncentrácie, pri ktorých pre výpočet pH ešte možno použiť jednoduchší vzťah, a to pre tolerovateľnú chybu $[H^+]$ 2,28 %, čo predstavuje odchýlku 0,01 pH v závislosti od pK resp od $\log K^H$.

Z týchto závislostí je zrejmé, že pre slabé zásady ($\log K^H < 6$) je exaktným vzťahom kvadratická rovnica bez lineárneho člena a rozhodujeme sa len medzi touto rovnicou a najjednoduchším vzťahom. Kritická koncentrácia je veľmi vysoká pre zásady s veľmi malou hodnotou protonizačnej konštanty. Vtedy najjednoduchší vzťah nemožno použiť. Takisto najjednoduchší vzťah nemožno použiť v prípade slabých zásad s vysokou hodnotou protonizačnej konštanty. V tomto prípade používame kvadratickú rovnicu. Ak je koncentrácia nižšia ako $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, používame kubickú rovnicu. Pre extrémne zriedené roztoky kubická rovnica prechádza na kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena.

V prípade zásaditých solí sa rozhodujeme len medzi kvadratickou rovnicou bez lineárneho člena a najjednoduchším vzťahom vtedy, ak kyselina vznikajúca pri hydrolyze má pK nižšie ako 6. Ak je kyselina slabšia (vyššie pK), rozhodujeme sa medzi najjednoduchším vzťahom a kvadratickou rovnicou. Od pK > 10 je kritická koncentrácia vysoká $c_k > 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, čo znamená, že vodné roztoky alkalických uhličitanov, fosforečnanov, sulfidov atď. musíme počítať podľa kvadratickej rovnice. Tento fakt sa v literatúre^{2–4} nediskutuje, preto si dovoľujeme touto cestou poukázať na význam aproximácií pri výučbe chemických rovnováh v roztokoch. Ak je koncentrácia soli rádu $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, uplatňuje sa kubická rovnica, ktorá pri

extrémne zriedených roztokoch prechádza tiež na kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena.

Pri amónnych soliach netreba uvažovať kubickú rovnicu, pretože $\log K^H = 9,24$ čo spadá do oblasti najjednoduchšej rovnice a kvadratickej rovnice bez lineárneho člena. Ak je slabá zásada vznikajúca pri hydrolyze veľmi slabá, postupujeme obdobne ako pri kyslých soliach pK > 10.

Veríme, že táto práca môže byť užitočnou a názornou didaktickou pomôckou pri objasňovaní protolytických rovnováh pre záujemcov o túto problematiku.

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0057-06.

LITERATÚRA

1. Tomčík P., Bučková M., Bustin D.: Chem. Listy 96, 162 (2002).
2. Garaj J., Hladký Z., Labuda J.: *Analytická chémia I*, Vydavateľstvo STU, Bratislava 1996.
3. Šúcha L., Kotrlý S.: *Teoretické základy analytickej chémie*. SNTL Alfa, Praha 1971.
4. Tarapčík P., Čakrt M., Hladký Z., Beinrohr E., Polonský J., Krupčík J., Rievaj M., Bustin D., Mocák J., Labuda J.: *Zbierka príkladov z analytickej chémie*, Vydavateľstvo STU, Bratislava 1995.

P. Tomčík, V. Klibiková, and D. Bustin (*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic*): **Criteria for Using Approximative Relations for the Calculation of Simple Protolytic Equilibria. Weak Bases and Hydrolyzed Salts**

The criteria were derived for simple protolytic equilibria of weak bases and hydrolyzed salts in aqueous solutions. The approximative formulae (simpler equations) can be used if the analytical concentration of a protolyte is higher than the limiting (critical) concentration calculated from the derived criterial equation. The concentration ranges in which it is appropriate to use various mathematical types of equations or the simplest formula are calculated and discussed.

RECENZE

**Perry G. Wang (ed.):
High-Throughput Analysis
in the Pharmaceutical Industry**

Vydal CRC Press and Taylor & Francis Group 2009.
413 str.
ISBN 978-1-4200-5953-3

Přímým důsledkem využívání kombinatorické chemie při vývoji nových léčiv je nárůst počtu potenciálních léčivých látek postoupivších do preklinického testování z několika desítek sloučenin na tisíce ročně. Jak ale zvládnout analýzu tohoto obrovského množství látek (a to včetně jejich metabolitů), když běžné analytické techniky by vyžadovaly stovky přístrojů i analytiků? Odpověď lze nalézt ve výborné monografii publikované pod vedením Dr. Perryho G. Wang, předního odborníka v analýze léčiv a jejich metabolitů v biologických matricích metodami kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Čtivě psaná monografie se zaměřuje na poměrně novou oblast takzvané vysokovýkonné analýzy, jejímž cílem je právě zvládnutí obrovského počtu analýz za zachování vysokého analytického standardu. Zvýšení produktivity analytického procesu lze dosáhnout pomocí automatizace přípravy vzorků a následné automatické analýzy pomocí separačních technik ve spojení převážně s hmotnostní detekcí. Jednotlivé kapitoly knihy přináší nejen důkladný popis používané instrumentace, ale i strategií pro optimalizaci vysokovýkonné analýzy. Autoři věnují pozornost i validacím analýz. V kapitolách zaměřených na přípravu vzorků jsou, kromě důkladného výčtu interferentů v biologických vzorcích (zejména plazmě a moči) a jejich vlivu na analytický proces, popsány různé způsoby extrakčních a separačních technik pro oddělení analytů od matric, včetně on-line přístupů. Ze separačních technik používaných k

analýze jsou vedle klasické HPLC diskutovány i UPLC, mikroparalelní kapalinová chromatografie, kapilární a nano-HPLC, které snižují časové i ekonomické náklady, což je nezastupitelný klad při obrovských počtech analýz ve farmaceutickém průmyslu. Z ostatních separačních technik jsou k řešení vysokovýkonných analýz využívány i superkritická fluidní chromatografie a rychlá plynová chromatografie. Zajímavým příspěvkem ke zvýšení výkonu analytických zařízení – který může inspirovat i v jiných oblastech než je farmaceutická analýza – je využití skutečnosti, že detektor (v tomto případě drahý hmotnostní spektrometr) má časové prostoje, během nichž pracuje na prázdno. Sdílením hmotnostního detektoru mezi několika HPLC systémy tak lze za snížení nákladů docílit zvýšení efektivity analýz. Kromě metodických a instrumentálních aspektů vysokovýkonné analýzy jsou vzhledem k zaměření publikace diskutovány zejména její praktická použití na analýzy potenciálních farmak a jejich metabolitů (získaných ať již *in vitro* či *in vivo*) a v terapeutickém monitoringu léčiv. Jedna z částí knihy je věnována i stanovení základních fyzikálně-chemických parametrů nezbytných pro farmakologii (rozpuštěnost, rozdělovací koeficient oktanol-voda). Všechny probírané aspekty a aplikace vysokovýkonné analýzy jsou zároveň ilustrovány na konkrétních praktických příkladech.

Popsaná monografie je pátým svazkem řady *Critical Reviews in Combinatorial Chemistry*. Co do technického provedení a sazby nelze knize nic podstatného vytknout, snad jen nejednotné používání citací či nedostatek kontrastu několika obrázků; drobnou chybu obrázku na s. 242 vyřešilo nakladatelství vložení opravného lístku. Kniha se jistě stane vítaným zdrojem informací a inspirace pro všechny chemiky pracující v oblasti farmaceutické, lékařské, kombinatorické a analytické chemie.

Karel Nesměrák

61. ZJAZD CHEMIKOV

7. - 11. september 2009

Vysoké Tatry, Tatranské Matliare

Vážení priatelia,

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

Organizačný výbor

Dušan Velič - predseda

Monika Aranyosiová – výkonný tajomník

Miroslav Michalka – technická podpora

Zuzana Hloušková - hospodár

Milan Drábik – vedecký tajomník

Pavel Drašar – vedecký tajomník

Programový výbor

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

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

Ing. Miloš Revús (SSPCH, BA)

RNDr. Dalma Gyepesová, CSc. (SChS)

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

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

Ing. Mária Omastová, PhD. (SChS)

Ing. Marián Janek, PhD. (SChS)

RNDr. Jozef Tatiery, PhD. (SChS)

Mgr. Katarína Javorová (SChS)

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

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

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

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

Ing. Milan Vrška, CSc. (STU, BA)

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

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

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

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

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

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

Ing. Ján Hirsch, DrSc. (SAV, BA)

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

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

Doc. Ing. Ján Reguli, PhD. (TU, TT)

Doc. RNDr. Ján Benko, CSc. (UK, BA)

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

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

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

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

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

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

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

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

Ing. Elena Kulichová (Nováky)

Sekcie:

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

Konferenčný poplatok:

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

* ASChFS, AČChS, SChS

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

Termíny:

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

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

Formy prezentácie:

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

Prednáška

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

Abstrakt v časopise ChemZi 5/9 2009

Publikácia v nasledujúcich číslach ChemZi

Kontakt:

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

e-mail: zjazd.chemikov@gmail.com

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

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	459	EDITORIAL	459
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Kationické antimikrobiální peptidy	460	Antimicrobial Cationic Peptides	460
T. Neubauerová, M. Macková, T. Macek a B. Koutek		T. Neubauerová, M. Macková, T. Macek, and B. Koutek	
Použití diamantových filmových elektrod dopo- vaných borem pro stanovení organických látek	469	The Use of Boron-Doped Diamond Film Electrodes for Detection of Organic Compounds	469
J. Musilová, J. Barek a K. Pecková		J. Musilová, J. Barek, and K. Pecková	
Perspektivy produkce butanolu ze škrobnatých a celulosových materiálů	479	Prospects of Butanol Production from Starch and Cellulose Materials	479
J. Lipovský, P. Patáková, M. Rychtera, H. Čížková a K. Melzoch		J. Lipovský, P. Patáková, M. Rychtera, H. Čížková, and K. Melzoch	
Perspektivy automobilů poháněných vodíkem	484	Prospects of Hydrogen-Fuelled Cars	484
D. Vojtěch		D. Vojtěch	
Lipoxygenázy a ich význam v biochemických pro- cesoch v rastlinných organizmoch	487	Lipoxygenases and Their Significance in Biochemical Processes in Plant Organisms	487
I. Holková, L. Bezáková, M. Vanko, F. Bilka a M. Obložinský		I. Holková, L. Bezáková, M. Vanko, F. Bilka, and M. Obložinský	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Určování mikrostrukturálních deskriptorů z digitál- ních snímků pórovitých látek	496	Determination of Microstructure Descriptors from Digital Images of Porous Media	496
V. Hejtmánek, P. Čapek, L. Brabec, A. Zikánová a M. Kočířík		V. Hejtmánek, P. Čapek, L. Brabec, A. Zikánová, and M. Kočířík	
Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře <i>Silybum marianum</i> přidavkem elicitoru paraquat	503	Affecting Production of Secondary Metabolites in <i>Silybum marianum</i> Cell Culture by Paraquat Elicitor Treatment	503
L. Tůmová a J. Tůma		L. Tůmová and J. Tůma	
Katalyzátor pro syntézu isopropoxidu hlinitého	511	A New Catalyst for the Synthesis of Aluminum Isopropoxide	511
M. Richter		M. Richter	
VÝUKA CHEMIE		EDUCATION IN CHEMISTRY	
Kritéria použití aproximativních vztahov pri výpočte jednoduchých protolytických rovnováh. Slabé zásady a hydrolyzované soli	514	Criteria for Using Approximative Relations for the Calculation of Simple Protolytic Equilibria. Weak Bases and Hydrolyzed Salts	514
P. Tomčík, V. Klbiková a D. Bustin		P. Tomčík, V. Klbiková, and D. Bustin	
RECENZE	520	BOOK REVIEWS	520

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 103 (2009), čís./no. 6 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 133, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 119 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/ CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2009 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plné předplatné 2009 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBÓN & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2008 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: D. Hnyk • Dáno do tisku 27.5.2009.