

Mezioborová konference mladých – pokusný projekt?

V polovině května proběhne první ročník konference nazvané Mezioborové setkání mladých chemiků a biologů. Abstrakta přihlášených prací jsou součástí tohoto čísla. Konference je pořádána ve spolupráci České společnosti chemické a Společnosti pro biochemii a molekulární biologii, které poskytly odborné garance s firmou Sigma-Aldrich s.r.o. Někoho možná napadne otázka: má smysl pořádat setkání vědců jejichž společným rysem jsou věk do pětatřiceti let a zájem zkoumat molekuly, které nás utvářejí či obklopují? Názory se mohou různit hned na dva aspekty takové akce: vymezení věku a na mezioborovost.

Kdo je mladý vědec? Většinou je za něj považován vědec do pětatřiceti. Pětatřicet je průměrný věk, kdy si člověk odbyl takzvané post-doc pobyty a zakládá vlastní laboratoř, rozjíždí naplno vlastní projekty. Co mu často chybí, jsou kontakty. Setkal jsem se s názorem, že pořádat setkání pouze mladých nemá smysl, protože se nebudou mít od koho učit přednášet, nebudou poslouchat diskuse na úrovni a tak podobně. Jsem přesvědčen, že konferencí, kde jsou mladí jen jako posluchači moudrosti starších kolegů, je dostatek. Naopak byl jsem svědkem, že v přítomnosti šéfů a jejich kamarádů se ti mladší vždycky drží trochu zpátky, nepoloží „hloupou“ otázku. A právě otázkami, i když na první pohled hloupými, se mohou nejvíc naučit. Pokud něčemu nerozumím a bojím se zeptat, aby si šéf nemyslel, že jsem hlupák, pak sedím na konferenci téměř zbytečně. Proto jsem si myslím, že takováto „mladá“ konference bude mít smysl.

Pak je tu druhý faktor, který je ještě ošidnější – meziobo-

rovost, interdisciplinárnost. Snaha o nalezení společného jazyka mezi různými obory je často sysifovská práce. Je to odvážný pokus a hrozí nebezpečí, že vždycky polovina účastníků se bude nudit. Ale na druhou stranu je tu naděje, že právě mladí jsou otevřenější poslechnout si přednášku z jiného oboru a že takováto informace pomůže vzniku nového řešení jejich vědeckého problému.

Pozitiva, která jak doufáme, že z této akce vyplynou, by se dala shrnout do následujících bodů. Neustále sílí hlasy pro propojení výzkumu na akademii a na univerzitách. Setkání mladých lidí, kteří na těchto institucích působí, může tomuto propojení pomoci. Tomu neformálnímu, jak se v politice říká, „zespoda“. Zcela poprávu se také volá po hledání a podpoře elit v základním výzkumu – velmi přísně vybírané práce pro účast na konferenci (bez konkurence vědeckých celebrit) tomu mohou napomoci. Pochopení principů práce ostatních oborů je základem plodné mezioborové spolupráce, a tato konference k tomu dává dobrý prostor. A nakonec – ať si to přiznáme nebo ne – existuje koncentrace vědy a konferencí do hlavního města. Účast je pro řadu mladých ekonomicky nedostupná. Fakt, že konference je pro účastníky bezplatná, umožnil, aby byli zastoupeni mladí vědci ze všech koutů republiky.

To jsou zhruba cíle, které si toto setkání klade. Jak se to povede, to se dozvíte v některém z příštích čísel, ale už teď můžeme říci – držme palce!

Martin Fusek

VYSOKOÚČINNÉ SEPARAČNÍ METODY PŘI ANALÝZE BENZENKARBOXYLOVÝCH KYSELIN

MILAN WURST^a, VĚRA PACÁKOVÁ^b
a KAREL ŠTULÍK^b

^aMikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Václavská 1083, 142 20 Praha 4, ^bKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, e-mail: pacakova@natur.cuni.cz

Došlo dne 5.X.2000

Klíčová slova: benzenkarboxylové kyseliny, GC, HPLC, kapilární elektroforéza

Obsah

1. Úvod
2. Metody analýzy benzenkarboxylových kyselin
 - 2.1. Plynová chromatografie
 - 2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
 - 2.3. Kapilární elektroforéza
 - 2.4. Chirální separace
3. Závěr

1. Úvod

Rostlinná oblast biosféry je zdrojem nejrůznějších aromatických sloučenin, které jsou složkami rostlinných barviv, květů a plodů i jiných částí rostlin (lignin), vonných olejů a v neposlední řadě jsou vytvářeny rostlinami na obranu před různými škůdci (hmyz, mikroorganismy). Aromatické látky jsou produkovány nejen rostlinami, ale i některými mikroorganismy (houby, bakterie). Naopak živočišné organismy jsou odkázány na příjem těchto látek potravou, např. ve formě aromatických aminokyselin. Z toho vyplývá, že výskyt aromatických sloučenin a jejich metabolitů v živočišném organismu je vždy důsledkem přísunu zvenčí.

V rostlinách, houbách a mikroorganismech vznikají aromatické látky jednak šikimátovou dráhou jako produkt cukerného metabolismu, jednak oligoketidovou dráhou, tj. kondenzací acetylátových jednotek, kdy se vytvářejí převážně tzv. sekundární metabolity. Aromatické látky, především fenolové kyseliny, vznikají též rozkladem zbytků rostlin v půdě; při vyšších koncentracích mohou být autotoxické a mít tak negativní vliv na úrodu kulturních plodin. Některé benzenkarboxylové kyseliny (BKK), jako jsou např. salicylová, katalpová, gentisová, protocatechová, kumarová, ferulová, sinapová a kávová kyselina, vznikají při biosyntéze a látkové přeměně aromatických aminokyselin. Fenolické karboxylové kyseliny, které používá rostlina jako ochranu před houbami a plísněmi, jsou užitečné též v medicíně. Některé deriváty jsou účinné pro

snížení hladiny lipidů a cholesterolu a jsou aktivní i antimikrobiálně a antivirově. Jsou to např. deriváty 3-fenylpropanové kyseliny, jako je skořicová kyselina a její složitější deriváty, např. kumariny. Značný význam pro lékařskou diagnostiku má stanovení obsahu jednoduchých aromatických kyselin a jejich derivátů v tělních tekutinách, kde se vyskytují jako metabolity léčiv a jedů i jako důsledek patologických metabolických procesů v organismu při některých onemocněních (fenyloctová, mandlová, 4-hydroxy-3-methoxymandlová, homovanilová, vanilová kyselina).

Jednoduché aromatické kyseliny v rostlinách mají často terapeutické účinky a široce se používají ve fytoterapii jak vnitřní (čaje), tak i vnější (obklady, koupele, masti). Po objevu v přírodním materiálu bylo možné tyto sloučeniny i jejich deriváty syntetizovat pro použití ve farmakologii. Salicylová a benzoová kyselina a jejich deriváty se uplatňují v kožním lékařství jako antiflogistika, analgetika, antipyretika a antirevmatika. Podobné terapeutické účinky mají deriváty kyselin 3-fenylpropanové (ibuprofen, fenoprofen, ketoprofen, naproxen a pod.), fenyloctové (diclofenac, aceclofenac) a anthranilové (2-aminobenzoové). 4-Aminosalicylová kyselina je účinnou látkou pro léčbu tuberkulózy. Další deriváty benzoové kyseliny (kokain, prokain, hexylkain aj.) se používají ve stomatologii, očním a krčním lékařství jako anestetika.

Jednoduché aromatické karboxylové kyseliny mají význam i v jiných oborech, včetně průmyslového využití. V potravinářství se hojně používá sodná sůl benzoové kyseliny jako konzervační přísada pro inhibici růstu mikroorganismů (kvasinek a plísní). Široce jsou používány polyestery aromatických karboxylových kyselin a polyhydroxyalkoholů při výrobě plastů, syntetických vláken a barvářských pryskyřic. Estery fenyloctové, 3-fenylpropanové, skořicové, anthranilové a dalších kyselin jsou součástí přírodních i syntetických vonných a chuťových látek.

2. Metody analýzy benzenkarboxylových kyselin

Stanovení směsí BKK jako složek komplexních biologických materiálů vyžaduje vysoce účinné, selektivní a citlivé analytické metody¹⁻³. Tyto požadavky splňuje plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE). Volba separačního systému se odvíjí od vlastností BKK, což jsou slabé kyseliny, které obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní funkční skupiny a jejichž disociaci lze ovlivnit volbou pH. Vzhledem ke svému polárnímú charakteru jsou obvykle málo těkavé.

Významné místo, zejména ve farmaceutické analýze, zaujímají separace optických izomerů BKK, protože biologická aktivita je převážně vázána na jeden enantiomer. K separaci enantiomerů se využívají všechny níže diskutované vysokoúčinné separační metody.

Struktura, systematické a triviální názvy vybraných BKK jsou uvedeny v tab. I.

Tabulka I

Struktura, systematické a triviální názvy benzenkarboxylových kyselin (R¹–R⁶ – substituenty na benzenovém jádře)

Č.	Systematický název	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
1	benzoová	COOH	H	H	H	H	H
2	2-hydroxy-(salicylová)	COOH	OH	H	H	H	H
3	3-hydroxy-	COOH	H	OH	H	H	H
4	4-hydroxy-(katalpová)	COOH	H	H	OH	H	H
5	2,3-dihydroxy-(pyrokatechová)	COOH	OH	OH	H	H	H
6	2,4-dihydroxy-(β-resorcylová)	COOH	OH	H	OH	H	H
7	2,5-dihydroxy-(gentisová)	COOH	OH	H	H	OH	H
8	2,6-dihydroxy-(γ-resorcylová)	COOH	OH	H	H	H	OH
9	3,4-dihydroxy-(protokatechová)	COOH	H	OH	OH	H	H
10	3,5-dihydroxy-(α-resorcylová)	COOH	H	OH	H	OH	H
11	2,3,4-trihydroxy-	COOH	OH	OH	OH	H	H
12	3,4,5-trihydroxy-(gallová)	COOH	H	OH	OH	OH	H
13	2-methoxy-(<i>o</i> -anisová)	COOH	OCH ₃	H	H	H	H
14	3-methoxy-(<i>m</i> -anisová)	COOH	H	OCH ₃	H	H	H
15	4-methoxy-(<i>p</i> -anisová)	COOH	H	H	OCH ₃	H	H
16	2,3-dimethoxy-	COOH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H
17	2,6-dimethoxy-	COOH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
18	3,4-dimethoxy- (veratrová)	COOH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
19	3,5-dimethoxy-	COOH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H
20	4-hydroxy-3-methoxy- (vanilová)	COOH	H	OCH ₃	OH	H	H
21	4-hydroxy-3,5-dimethoxy- (syringová)	COOH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
22	fenyloctová	CH ₂ COOH	H	H	H	H	H
23	4-hydroxyfenyloctová	CH ₂ COOH	H	H	OH	H	H
24	2,5-dihydroxyfenyloctová (homogentisová)	CH ₂ COOH	OH	H	H	OH	H
25	4-hydroxy-3-methoxyfenyloctová (homovanilová)	CH ₂ COOH	H	OCH ₃	OH	H	H
26	3,4-dimethoxyfenyloctová (homoveratrová)	CH ₂ COOH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
27	fenyl(hydroxy)octová (mandlová)	CH(OH)-COOH	H	H	H	H	H
28	hydroxy(2-methoxyfenyl)octová (<i>o</i> -methoxymandlová)	CH(OH)-COOH	OCH ₃	H	H	H	H
29	hydroxy(3-methoxyfenyl)octová (<i>m</i> -methoxymandlová)	CH(OH)-COOH	H	OCH ₃	H	H	H
30	hydroxy(4-methoxyfenyl)octová (<i>p</i> -methoxymandlová)	CH(OH)-COOH	H	H	OCH ₃	H	H
31	hydroxy(4-acetoxifenyl)octová (<i>p</i> -acetoxymandlová)	CH(OH)-COOH	H	H	OCOCH ₃	H	H
32	3-fenylpropenová (skořicová)	CH=CHCOOH	H	H	H	H	H
33	3-(2-hydroxyfenyl)propenová (<i>o</i> -kumarová)	CH=CHCOOH	OH	H	H	H	H
34	3-(3-hydroxyfenyl)propenová (<i>m</i> -kumarová)	CH=CHCOOH	H	H	OH	H	H
35	3-(4-hydroxyfenyl)propenová (<i>p</i> -kumarová, <i>p</i> -hydroxyskořicová)	CH=CHCOOH	H	H	OH	H	H
36	3-(3,4-dihydroxyfenyl)propenová (kávová, 3,4-dihydroxy skořicová)	CH=CHCOOH	H	OH	OH	H	H
37	3-(4-hydroxy-3-methoxy-fenyl)propenová (ferulová, 4-hydroxy-3-methoxyskořicová)	CH=CHCOOH	H	OCH ₃	OH	H	H
38	3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)propenová (sinapová, 4-hydroxy-3,5-dimethoxyskořicová)	CH=CHCOOH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
39	3-(2-hydroxyfenyl)propanová (melilotová)	CH ₂ CH ₂ COOH	OH	H	H	H	H
40	2-amino-3-fenylpropanová (fenylalanin)	CH ₂ CH(NH ₂)-COOH	H	H	H	H	H
41	2-amino-3-(4-hydroxy-fenyl)propanová (tyrosin)	CH ₂ CH(NH ₂)-COOH	H	H	OH	H	H
42	2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propanová (DOPA)	CH ₂ CH(NH ₂)-COOH	H	OH	OH	H	H
43	2-aminobenzoová (anthranilová)	COOH	NH ₂	H	H	H	H
44	4-aminobenzoová	COOH	H	H	NH ₂	H	H
45	2-amino-3-hydroxybenzoová (3-hydroxyanthranilová)	COOH	NH ₂	OH	H	H	H
46	3-fenyl-2-oxopropanová (fenylpyrohroznová)	CH ₂ COCOOH	H	H	H	H	H

2.1. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je velmi účinná separační metoda, vhodná zejména pro stanovení těkavých látek. Přestože benzenkarboxylové kyseliny jsou málo těkavé a tepelně nestálé, je GC široce používána pro jejich analýzu. Je však nezbytné je před vlastní GC analýzou převést na stabilnější a těkavější deriváty. Využívají se funkční karboxy-, hydroxy-, eventuálně aminoskupiny na benzenovém jádře, které obsahují aktivní vodík. Nejčastěji se připravují alkyl-, acetyl-, alkoxy nebo trimethylsilyl (TMS) deriváty. Použití silylačních metod je nejobecnější, neboť silylační činidla reagují současně s různými funkčními skupinami BKK. K přípravě TMS derivátů byla použita řada silylačních činidel a jejich kombinace, např. trimethylchlorosilan (TMCS), dimethyldichlorsilan (DMCS) nebo hexamethyldisilazan (HMDS). Silná silylační činidla, jako jsou *N,N'*-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA), *N,N'*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), *N*-(trimethylsilyl)imidazol (TMSI) a *N*-(trimethylsilyl)diethylamin (TMSDA) jsou vhodná pro vícenásobnou silylaci, např. pro aminokyseliny a složitější aromatické látky. TMSDA se používá pro málo reaktivní sloučeniny.

BKK se dále derivatizují na alkylestery, které jsou méně polární a těkavější. Methylestery (ME) se připravují reakcí s diazomethanem nebo reakcí stříbrných solí karboxylových kyselin s methyljodidem. Reakce s diazomethanem je velmi rychlá, avšak diazomethan je toxický. Reakce s methyljodidem je sice pomalá, avšak probíhá s vysokou výtežností. Velmi účinná je esterifikace pomocí methyl- a ethylchlormravenčanů (MCF, ECF) za vzniku methyl- nebo ethylderivátů.

Jinou formou derivatizace je pyrolyza, kdy se analyzovaná látka reprodukovatelně rozloží na těkavější produkty v pyrolyzátoru, přímo připojeném k plynovému chromatografu, v němž se produkty separují (metoda Py-GC).

K separaci derivátů BKK se používají nepolární i středně polární stacionární fáze. Nejběžnější je plamenová ionizační detekce (FID), pro halogenderiváty BKK je vhodný detektor elektronového záchytu (ECD). Plynově chromatografická analýza BKK nabyla na významu zejména po zavedení kapilárních kolon a jejich spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS). Metoda GC-MS patří k nejvýznamnějším současným analytickým metodám, neboť se vyznačuje vysokou separační účinností spojenou s citlivou detekcí s velkou vypovídací schopností, která usnadňuje identifikaci neznámých látek.

Některé příklady použití GC k dělení a stanovení směsí BKK v různých maticích jsou uvedeny v tab. II (cit.^{1,2,4-15}).

2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se široce používá pro analýzu BKK zejména proto, že nevyžaduje, aby analyty byly těkavé a tepelně stálé a tedy umožňuje jejich přímé stanovení bez předchozí derivatizace. Využívají se různé stacionární fáze. Disociaci BKK lze buď podpořit a pak využít iontově výměnnou chromatografii (IEC) nebo iontově párovou chromatografii (IPC), nebo naopak potlačit a použít chromatografii na reverzních stacionárních fázích (RPC). Nejběžnější jsou chemicky vázané reverzní fáze, které vykazují lepší selektivitu vůči mírně polárním sloučeninám a většinou umožňují i vyšší účinnost separace než adsorbenty a měniče iontů.

Volba mobilní fáze a její pH závisí na použité stacionární fázi. V RPC závisí retence jednosytné kyseliny HA na pH a na disociační konstantě K_a :

$$k = k_0 (1 - F^-) + k_{-1} F^-$$

kde $F^- = 1 / \{1 + ([H^+]/K_a)\}$, k_0 a k_{-1} jsou retenční poměry neionizované a ionizované formy a F^- je frakce ionizovaných molekul.

Mobilní fáze v RPC jsou nejčastěji vodné roztoky pufrů v kombinaci s organickými modifikátory, jako jsou methanol (MeOH) nebo acetonitril (ACN). Pufr by měl potlačit disociaci kyseliny a mít dostatečnou pufrací kapacitu. Zvýšení koncentrace pufru způsobí sice zvýšení pufrací kapacity, ale také může vyvolat vysolovací efekt. Hodnota pH mobilní fáze by se v případě fází na bázi silikagelu měla pohybovat v rozmezí pH 2–8. Tomuto požadavku vyhovují např. pufrы fosfátový (pH 2,1–3,1 a 6,2–8,2), acetátový (pH 3,8–5,8), citrátový (pH 2,1–6,4), uhličitanový (pH 3,8–4,8) a některé další, přičemž nejběžnější jsou fosfátový a acetátový pufr nebo jejich kombinace. Další důležitou vlastností vybraného pufru je jeho rozpustnost v mobilní fázi. Anorganické pufrы (např. fosfátové) jsou špatně rozpustné v mobilních fázích, které obsahují vysokou koncentraci organického modifikátoru. Mobilní fáze methanol–voda poskytuje lepší rozpustnost, a proto je methanolu při volbě organického rozpouštědla dávána většinou přednost.

HPLC iontů bývá obtížnější než separace neutrálních látek. Používají se buď IEC nebo IPC s reverzní stacionární fází a s mobilní fází obsahující iontově párové činidlo, nejčastěji kvartérní amoniouvé bázi nebo její sole, jako jsou dodecyltrimethylamonium-bromid (DTAB), tetrabutylamonium-bromid (TBAB) nebo jodid (TBAJ), tetraethylamonium-bromid (TEAB) nebo jodid (TEAJ) a pod. Pro separaci organických kyselin se používají jak slabé, tak silné měniče aniontů. Jako mobilní fáze slouží voda, zředěné roztoky kyselin a některých pufrů. Zajímavou stacionární fází je amorfní oxid zirkoničitý, který se chová jako slabý měnič aniontů. BKK se dělí jak izokraticky, tak s gradientovou elucí. IEC aromatických kyselin se v současné době používá jen zřídka a většinou se nahrazuje metodou IPC, která je účinnější. Přesto jsou však případy, kdy metoda IEC je výhodnější, např. při použití hmotnostní detekce, kdy mobilní fáze musí být dostatečně těkavá a obsahovat málo solí.

Adsorpční chromatografie se nepoužívá příliš často vzhledem k tomu, že není příliš účinná. Jako mobilní fáze při ní slouží směsi rozpouštědel o různé polaritě.

Vzhledem k tomu, že aromatický kruh silně absorbuje ultrafialové záření, je zdaleka nejběžnější UV spektrofotometrická detekce, v současné době hlavně s diodovým polem (DAD). Dále se uplatňuje selektivní a vysoce citlivá fluorescenční (FD) nebo elektrochemická (voltametrická) detekce (ED), resp. pulsní amperometrická detekce (PAD). Metoda HPLC-MS dovoluje identifikovat a kvantifikovat velmi malá množství stanovovaných látek (méně než 6 pg).

Při analýze přírodních materiálů často předchází separačním metodám, jako jsou GC a HPLC, extrakce na tuhé fázi (SPE), protože matrice vzorků (např. vosků, olejů atd.) může poškozovat analytické kolony a rušit chromatografická stanovení a mnohdy je rovněž zapotřebí vzorky zakonzentrovat. Jako tuhé extrakční fáze se často kombinují různé materiály, např. reverzní fáze s iontově výměnnou.

Tabulka II
 GC některých benzenkarboxylových kyselin

Analyt	Derivát	Stacionární fáze	Teplota [°C]	Detekce	Poznámka	Cit.
Gentisová, 6-methylsalicylová, 3-hydroxybenzoová kyselina	TMS	10 % QF-1/Gas-Chrom Q	120–200	FID	metabolity patulinu, stanovení	5
Přírodní netěkavé fenolické látky	TMS	1,5 % SE-30 + 1,5 % SE-52/Chromosorb W, AW, DMCS	80–210 210–300	FID	rostlinný extrakt, identifikace i stanovení	4
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	1 % OV-1/Chromosorb W, AW, DMCS	100–200	MS	sedimenty řek, jezera a moře, identifikace	6
Aromatické karboxylové kyseliny	TMS	2,5 % SE-52 + 2,5 % MPHT/Chromosorb G, AW, DMCS	120–160 2 °C/min	FID	metabolity houby <i>Oudemasiela mucida</i> , stanovení, dělení	1
Fenolické karboxylové kyseliny	různé	OV-1/kapilární kolona	100–250 160	FID ECD	studium derivatizace	7
Deriváty benzenkarboxylových kyselin	TMS	1 % SE-52, OV-1, MPHT, OV-17/Chromosorb G, AW, DMCS	100–250 2 °C/min	FID	mikrobiální metabolity stanovení, srovnání s HPLC	2
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	SE-52/kapilární kolona	80–260	MS	<i>Lysimachia nummularia</i> , <i>Lysimachia vulgaris</i> , identifikace, stanovení	8
Metabolity 1,4-diethylbenzenu	TMS ME	OV-1/kapilární kolona	35–55– –250	MS	kryší moč, identifikace	9
Benzoová kyselina	–	QF-1/kapilární kolona	200	FID	kůže	10
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	SE-54/kapilární kolona	80–280 300	FID ECD	propolis, identifikace	11
Fenolické karboxylové kyseliny	MCF	ECF SP-SIL-5CB/kapilární kolona	gradient teploty	FID	studium derivatizace	12
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	SPB-1/kapilární kolona	138–150	FID	rostlinné pletivo, půdy, stanovení	13
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	poly[fenyl(methyl)siloxan]/kapilární kolona	80–320 MS	FID	pšenice, trávy, identifikace	14
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	poly[fenyl(methyl)siloxan]/kapilární kolona	40–290	MS	analýza tanninu, rostlinné pletivo	15

 Tabulka III
 Příklady aplikací HPLC

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Poznámky	Cit.
Ferulová kyselina	Hypersil ODS	12 % MeOH-citrátový pufr, pH 5,4	DAD, FD	mletá pšenice	16
Fenolické karboxylové kyseliny a další látky	C18	gradient 2–100 % ACN ve vodě, pH 2,6	UV	červené víno	17
Benzenkarboxylové kyseliny	SIX C18, SGX C18	EtOH + 1 % CH ₃ COOH 5:95, 10:90, 20:80 i gradient	UV	kultivační medium srovnání s GC	2
Fenolické karboxylové kyseliny	Viospher C6	12 % MeOH v 0,1 % HClO ₄	ED	metabolismus ligninu a celulosy, pšeničná sláma	18
Benzenkarboxylové kyseliny	RP 18	MeOH + HCOOH + voda	UV	<i>Genus althaea</i> , identifikace	19
Salicylová kyselina a produkty hydroxylace	ODS	0,03 M acetát-citrátový pufr, pH 3,6	ED	měření hydroxylových radikálů v srdci	20
Benzoová a hippurová kyselina	Ultraspher ODS	ACN–H ₂ O–CH ₃ COOH (12 + 38 + 0,25)	UV	metabolity benzylalkoholu v plazmě	21

Tabulka III – pokračování

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Poznámky	Cit.
Benzoová kyselina	Econospher C18	ACN–0,02 % H ₃ PO ₄ izokrat. + gradient	UV	podzemní vody, biodegradace toluenu	22
Thiofenkarboxylová a benzoová kyselina	RP18	30 % MeOH v 0,01 M fosfát	UV	biologické vzorky, metabolismus	23
Benzoová kyselina	Spherisorb C18	8 % MeOH ve fosfát. pufru, pH 6,7	UV	konzervační prostředky	24
Benzoová kyselina	NovaPak C18	ACN + fosfátový pufr, pH 3,9	UV	aditiva v potravinách, porovnání CZE a HPLC	25
Fenolické karboxylové kyseliny anthokyaninů	SuperPak C18	MeOH–H ₂ O–1 % HCOOH gradientová eluce	PAD	okvětní lístky grejpů	26
Fenolické glykosidy	C18	10 % ACN v 2 % CH ₃ COOH	UV	semipreparativní izolace látek v mouce	27
Benzoová kyselina a její konjugáty	C8	MeOH + 0,2 % CH ₃ COOH	IS-MS	játra krysy, vztah mezi strukturou a metabolismem	28
Benzenkarboxylové kyseliny	Spherisorb ODS	8 % MeOH v octanovém pufru	UV	obsah žaludku přezvýkavců	29
Fenolické karboxylové kyseliny	Adsorbospher C18	ACN–H ₂ O–H ₃ PO ₄ , gradientová eluce	DAD	ječmenový slad, antioxidační vlastnosti	30
Skořicová a benzoová kyselina	Nucleosil C18	ACN–H ₂ O–CH ₃ COOH	DAD	vinný mošt, kvašení	31
Fenolické karboxylové kyseliny	Hypersil ODS	MeOH–H ₂ O–CH ₃ COOH (25 + 75 + 1)	UV	rostlinný materiál <i>Echinacea sp.</i> , SPE, výměna iontů	32
Substituované benzoové kyseliny	Spherisorb ODS	H ₂ O–ACN–MeOH–CH ₃ COOH (88 + 10 + 2)	DAD	flavonový metabolismus, tělní tekutiny, <i>Ginkgo biloba</i>	33,34
Salicylová, acetylsalicylová kyselina	RP18	ACN–pufr, pH 6, TBA	UV	IPC, studie separace BKK	35
Aspirin, antipyrin, fenobarbital	Bondapak C8	ACN–fosfátový pufr, pH 3 a 6, TBAJ	UV	IPC, TBA studie, léčiva	36
<i>p</i> -Aminosalicylová kyselina	RP 18	MeOH–fosfátový pufr, pH 7,7, TBAH	UV	IPC	37
Fenolické karboxylové kyseliny	fenyl	MeOH–voda–0,01 % CH ₃ COOH TEAJ	ESI-MS	IPC, vlákniny v potravinách	38

Přehled vybraných aplikací HPLC je uveden v tab. III (cit. ^{2,16–38}).

2.3. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) v poslední době nalezla široké uplatnění v analytické chemii, neboť je vhodná pro separaci mnoha typů sloučenin, včetně BKK. Poskytuje dobrou separaci v relativně krátkém čase, nevyžaduje složitou přípravu vzorku a spotřebuje jen omezené množství činidel, takže cena analýzy je většinou nižší než u chromatografických metod. Také proto se tato metoda široce používá pro analýzu komplexních směsí a separaci organických kyselin pocházejících z rostlinných a mikrobiálních materiálů. Ve srovnání s chromatografií však CE má určitá omezení: vzhledem k nízkým dávkovaným množstvím (řádově nl) je nutné používat citlivé detektory a spolehlivost výsledků bývá horší než v HPLC.

Pro separaci nabitých látek se používá kapilární zónová elektroforéza (CZE). Tato metoda umožňuje nejen identifikaci a kvantifikaci složek vzorku, ale také stanovení fyzikálně-chemických vlastností sloučenin, např. disociačních konstant BKK.

Separaci BKK můžeme ovlivnit řadou faktorů, jako je pH, typ a koncentrace pufru a použité separační napětí. Podobně jako v HPLC i zde je dominantní vliv pH. V alkalickém prostředí se BKK stanovují jako anionty. Dalším z faktorů, které ovlivňují separaci, jsou organická rozpouštědla, jež se používají jako modifikátory v nosných elektrolytech. Tato rozpouštědla ovlivňují pohyblivost analytů snížením polaritativy pufru, mohou zlepšit selektivitu, a tím zvýšit pravděpodobnost jejich identifikace. Mají však také vliv na povahu povrchu křemenné kapiláry a ovlivňují tak pK_a ionizovaných silanolových skupin na stěně kapiláry a molekul solutu. Kromě toho ještě mohou změnit gradient elektrického pole změnou vodivosti elektrolytu.

K separaci neutrálních látek (např. při potlačení disociace BKK v kyselém prostředí) se hodí micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC), při které se do nosného elektrolytu přidávají ionické tenzidy vytvářející v roztoku nabitě micely, které interagují s neutrálními látkami a migrují charakteristickými rychlostmi. Nejčastěji se používá dodecylsulfát sodný (SDS). MEKC na bázi cetyltrimethylamonium-bromidu (CTAB) byla použita pro separaci BKK ve vzorcích rostlinných materiálů a byla shledána dostatečně účinnou a ne-

Tabulka IV
 Příklady aplikací CZE a MEKC

Analyt	Matrice	Předběžná úprava vzorku	Separáčnı́ způsob: elektrolyt	Separáčnı́ a detekčnı́ podmínky	Cit.
Homovanilová, vanilylmandlová, homogentisová kyselina	moč	přímé dávkování	CZE: 300 mM borátový pufr, pH 8,5	$L_T = 64,5$ cm, $L_D = 56$ cm, 50 μ m, 30 kV, 200 nm	39
Hippurová, <i>p</i> -hydroxyhippurová kyselina	sérum	ultrafiltrace a ředění	CZE: 10 mM acetátový pufr, pH 3,8 nebo 10 mM MES, pH 6,1	$L_D = 15$ cm při pH 3,8 nebo 25 cm při pH 6,1, 200 μ m, PTFE, 254 nm	40
Hippurová kyselina	sérum	ultrafiltrace	CZE: 150 mM borátový pufr, pH 9,0	$L_T = 64$ cm, $L_D = 55,8$ cm, 50 μ m, 22 kV, 25 $^{\circ}$ C, 210 nm	41
Hippurová kyselina	sérum	ultrafiltrace	CZE: 150 mM borátový pufr, pH 9,0; MEKC: 20 mM borát, 80 mM SDS, pH 9,0	$L_T = 80,5$ cm, $L_D = 72$ cm, 50 μ m, 24 kV (CZE) nebo 22 kV (MEKC), 25 $^{\circ}$ C, 210 nm	42
Hippurová, <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -methylhippurová kyselina	moč	srážení bílkovin acetonem a ultrafiltrace	MEKC: 20 mM fosfátový pufr, pH 8,0; 10 mM DTAB, 4 M močovina	$L_T = 67$ cm, $L_D = 47$ cm, 50 μ m, -22 kV, 30 $^{\circ}$ C, 224 nm	43
Hippurová kyselina, tryptofan	moč	přímé dávkování	MEKC: 30 mM borát, pH 10, 75 mM SDS, 10 mM β -CD	$L_T = 44$ cm, $L_D = 37$ cm, 75 μ m, 20 kV, 195 nm	44
Salicylová kyselina	sérum moč	přímé dávkování, ředění (moč), ultrafiltrace (sérum)	MEKC: 75 mM SDS, borátový-fosfátový pufr, pH 9,1; CZE: 33 mM fosfát, pH 8,3	$L_T = 90$ cm, $L_D = 70$ cm, 75 μ m, 20 kV, DAD 195 až 320 nm	45
Salicylová kyselina	sérum	promytı́ a následné přímé dávkování	MEKC: 60 mM borát, pH 10, 200 mM SDS	$L_T = 42,5$ cm, $L_D = 34,5$ cm, 50 μ m, 10 kV, 25 $^{\circ}$ C, 200 nm	46
Naproxen, salicylová kyselina	sérum moč	přímé dávkování nebo ředění (moč)	MEKC: borátový-fosfátový pufr, pH 9,2; 75 mM SDS	$L_T = 70$ cm, $L_D = 50$ cm, 75 μ m, 20 kV, absorbance při 220 nm, fluorescence (ex = 220 nm, em = 340 nm)	47
Naproxen	sérum	přímé dávkování ultrafiltrace	MEKC: borátový-fosfátový pufr, pH 9,1; 75–200 mM SDS	$L_T = 65$ cm, $L_D = 75$ cm, 75 μ m, 25 kV, 35 $^{\circ}$ C, 215 nebo 240 nm	48
(4-Fluorbenzoyl)propanová kyselina, (4-fluorofenyl)octová kyselina	moč	SPE	CZE: 50 mM octan amonny, 10 % metanol, 1 % ledová kys. octová, pH 4,1	$L_D = 65$ cm, 50 μ m, 30 kV, 25 $^{\circ}$ C, 214 nm	49
D,L-mandlová kyselina	–	–	CZE: 40 mM γ -CD, 50 mM fosfát, pH 7,0	$L_T = 50$ cm, $L_D = 45,4$ cm, 50 μ m, 20 kV, 20 $^{\circ}$ C, 206 nm	50
D,L-tryptofan a D,L-DOPA	–	–	CZE: 30 mM crown-6-tetra-karboxylová kyselina, pH 2,2	254 nm	51

nákladnou. Ve srovnání s CZE se MEKC vyznačuje vyšší selektivitou. Aplikace kapilární elektrochromatografie (CEC), při níž je kapilára naplněna některou ze stacionárních fází používaných v HPLC, avšak pohyb mobilní fáze je elektroosmotický, nikoli mechanický, lze rovněž nalézt v odborné literatuře. Mezi nejběžnější detekci v CE patří UV spektrofotometrická detekce. Často se využívá fluorescence buzená laserem. Velice významná je i kombinace CE s hmotnostní spektrometrií (CE-MS) nebo s voltametrickou detekcí.

Příklady použití CZE a MEKC pro analýzu BKK jsou uvedeny v tab. IV (cit. ³⁹⁻⁵¹).

2.4. Chirálnı́ separace

Chirálnı́ separace jsou velmi důležitě, neboť enantiomery

se liší biologickou aktivitou. Pro chirální separace lze využít tři postupy. *a*) Derivatizací převést optické izomery na diastereoizomery a následně je separovat na opticky neaktivní stacionární fázi v HPLC nebo v neaktivním nosném elektrolytu v CE, *b*) použít chirální mobilní fáze v kombinaci s opticky neaktivní stacionární fází pro HPLC či přidat chirální činidlo do nosného elektrolytu v CE, *c*) k separaci využít chirální stacionární fázi, a to jak v GC, tak v HPLC a v elektrochromatografii.

Metoda *a*) se využívá v HPLC a CE v případech, kdy látky vykazují nízkou absorbanci v UV oblasti (např. u nízkomolekulárních alifatických kyselin). Příprava derivátů je poměrně komplikovaná a pro BKK se používá jen ojediněle.

Postup *b*) je velmi jednoduchý a snadný. Využívá se jak v HPLC, tak v CE. Jako chirální selektory se nejčastěji použí-

Tabulka V
Příklady chirálních aplikací v HPLC

Analyty	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Cit.
Hydroxy- a methoxybenzenkarboxylové a indolkarboxylové kyseliny	Separon SiC18	β -CD v MeOH–0,01 M fosfátový pufr	UV	52
Benzenkarboxylové kyseliny	Cyclobond I (β -CD)	MeOH–0,01 M fosfát, pH 2,2–6,5	UV nepř	53
MethylDOPA	ODS	HSA	UV	54
DOPA	ODS	L-prolin + ion kovu	ECD	55
DOPA	ODS	L-fenylalanin + ion kovu	UV	56
		(<i>R</i>)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylpropan–1,2-diamin + ion kovu		
Benzenkarboxylové kyseliny	diol	chinin	UV nepř	57
Mandlová a tropová kyselina, baklofen	β -CD	0,1 M fosfát, pH 4,2 nebo 6,2–ACN (65 + 35)	UV	58
Aromatické karboxylové kyseliny	β -CD	0,1 M fosfát, pH 4,2–ACN (65 + 35)		59
Citronellová, benzenkarboxylové kyseliny	ergolinový derivát	0,05 M acetát-methanol	UV	60
Mandlová, fenylctová a další kyseliny	polysacharid	hexan–propanol-2–TFA (80 + 20 + 1)		61
Levodopa, methylDOPA, karbidopa	glykopeptid (teikoplanin)	MeOH–voda, trimethylamin, CH ₃ COOH	UV	62

vají cykloextriny (CD), které vytvářejí s analyty, zejména s BKK, které obsahují hydroxy a amino skupiny, inkluzní sloučeniny. CD jsou cyklické oligosacharidy vystavěné z D-(+)-glukopyranosových jednotek, které jsou vázány α -(1→4)-vazbami. Přírodní CD (α -, β - a γ -) sice řeší mnoho separačních problémů, avšak selektivitu a rozsah použití lze značně zvýšit použitím syntetických derivátů CD, neboť jsou lépe rozpustné ve vodě než přírodní CD. Kromě CD se používají jako chirální selektory též lidský sérový albumin, chinin, různé aminokyseliny v kombinaci s ionty kovů a řada dalších látek. Kapilární elektroforéza s CD se rovněž používá pro separaci izomerních BKK, tj. monokarboxylových (benzoová kyselina), dikarboxylových (ftalová, tereftalová a isoftalová kyselina) a trikarboxylových (trimesinová, hemimelitová a trimelitová kyselina) kyselin. K potlačení adsorpce cykloextrinů na stěnu kapiláry, která vede ke zhoršení účinnosti separace, se stěny kapiláry modifikují polymerními filmy. Podobně jako v HPLC se v CE jako chirálních selektorů používá celá řada dalších látek, např. hovězí sérový albumin, různá antibiotika a pod.

Nevýhodou použití metody *b*) v HPLC je vysoká spotřeba chirálních selektorů, které jsou vesměs velmi drahé. Tato nevýhoda odpadá v CE, kde potřebné množství nosného elektrolytu je nízké.

Metoda *c*) je v současné době nejběžnější v HPLC a GC. Využívá chirálních chemicky vázaných stacionárních fází (CSP), čímž odpadá hlavní nevýhoda metody *b*). Mezi nejběžnější patří chirální fáze s cykloextrinem a jeho deriváty. Dále se využívají chemicky vázané opticky aktivní deriváty aminokyselin. Pro separaci izomerů derivátů BKK byly testovány též CSP na bázi ergotalkaloidů, lidského sérového albuminu, polysacharidů, glykopeptidů (např. teikoplanin) atd. V plynové chromatografii lze využít pouze metodu *c*), separaci na chirální stacionární fázi. Komerčně dostupné fáze pro GC jsou založeny na derivátech CD (např. dimethyl-, permethyl-, propionyl-, butyryl-, dipentyl- a (hydroxypropyl)-CD) a L-valinu (pro separaci enantiomerů aminokyselin). Před vlastní GC separací je nutné BKK derivatizovat.

Příklady chirálních separací metodou HPLC jsou uvedeny v tab. V (cit.^{52–62}), metody CE jsou zahrnuty v tab. IV.

3. Závěr

Všechny diskutované separační metody, GC, HPLC a CE, umožňují účinnou separaci BKK v poměrně krátkém čase. HPLC a CE navíc nevyžadují složitou přípravu vzorku. GC je vhodná pro dostatečně těkavé a tepelně stálé látky, a proto lze BKK analyzovat touto metodou až po jejich derivatizaci. Z tohoto hlediska je pro analýzu aromatických karboxylových kyselin vhodnější HPLC nebo CE. GC však přesto má své výhody ve vysoké účinnosti dělení, vysoké citlivosti detekce, instrumentální jednoduchosti a nižší nákladnosti. HPLC nabízí široké spektrum možností při volbě separačního systému, dobrou selektivitu a spolehlivost výsledků, je však časově i finančně náročnější. Kapilární elektroforéza je nejrychlejší a nejlevnější, je však prozatím méně spolehlivá. Analytická výkonnost se podstatně zvýší, jsou-li GC, HPLC či CE kombinovány s hmotnostní detekcí, přičemž z technického i finančního hlediska je nejvýhodnější GC-MS, následována CE-MS a konečně HPLC-MS.

LITERATURA

1. Wurst M., Jurková M., Zonchová Z., Komers R.: J. Chromatogr. 291, 145 (1984).
2. Jurková M., Wurst M.: J. Chromatogr. 446, 117 (1988).
3. Waksmondzka-Hajnos M.: J. Chromatogr., B 717, 93 (1998).
4. Vande Castele K., de Pooter H., van Sumere C. F.: J. Chromatogr. 121, 49 (1976).
5. Ehman J., Gaucher G. M.: J. Chromatogr. 132, 17 (1977).
6. Matsumoto G., Hanya T.: J. Chromatogr. 193, 89 (1980).
7. Lehtonen K., Ketola M.: J. Chromatogr. 370, 465 (1986).

8. Luczak S., Swiatek L., Daniewski M.: *Acta Pol. Pharm.* 46, 381 (1989).
9. Linhart I., Novak J.: *J. Chromatogr.* 530, 284 (1990).
10. Reifenrath W. G., Hawkins G. S., Kurtz M. S.: *J. Pharm. Sci.* 80, 526 (1991).
11. Christov R., Bankova V.: *J. Chromatogr.* 623, 182 (1992).
12. Hušek P.: *Chromatographia* 34, 621 (1992).
13. Heimler D., Pieroni A.: *Chromatographia* 38, 475 (1994).
14. Packert M., Steinhart H.: *J. Chromatogr. Sci.* 33, 631 (1995).
15. Mejanelle P., Bleton J., Goursaud S., Tchaplá G. A.: *J. Chromatogr.*, A 767, 177 (1997).
16. Pussayanawin V., Wetzel D. L.: *J. Chromatogr.* 391, 243 (1987).
17. Oszmianski J., Ramos T., Bourzeix M.: *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 259 (1988).
18. Galletti G. C., Piccaglia R., Conciallini V.: *J. Chromatogr.* 507, 439 (1990).
19. Gudej J., Bieganowska J.: *J. Liq. Chromatogr.* 13, 4081 (1990).
20. Das D. K., Cordis G. A., Rao P. S., Liu X. K., Maity S.: *J. Chromatogr.* 536, 273 (1991).
21. Tan H. S., Manning M. A., Hahn M. K., Tan H. G., Kotagal U. R.: *J. Chromatogr.* 568, 145 (1991).
22. Chamkasem N., Hill K. D., Sewell G. W.: *J. Chromatogr.* 587, 185 (1991).
23. Lucarelli C., Pelloso R., Brunno G., La-Rosa C., Belliardo F.: *J. Chromatogr.* 573, 150 (1992).
24. Hannisdal A.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 194, 517 (1992).
25. Jimidar M., Hamoir T. P., Foriers A., Massart D. L.: *J. Chromatogr.* 636, 179 (1993).
26. Gao L., Mazza G.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 118 (1994).
27. Amarowicz R., Shahidi F.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 551 (1994).
28. Kasuya F., Igarashi K., Fukui M.: *J. Chromatogr.*, A 684, 93 (1994).
29. Amin M. R., Tomita Y., Onodera R.: *J. Chromatogr.*, B 663, 201 (1995).
30. Maillard M. N., Berset C.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 1789 (1995).
31. Betessaura C., Andreslacueve C., Lamuelaraventos R. M.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 3040 (1996).
32. Glowniak K., Zgórká G., Kozyra M.: *J. Chromatogr.*, A 730, 25 (1996).
33. Pietta P. G., Gardena C., Mauri P. L., Maffei-Facino R., Carini M.: *J. Chromatogr.* 673, 75 (1995).
34. Pietta P. G., Gardena C., Mauri P. L.: *J. Chromatogr.*, B 693, 249 (1997).
35. Tilly-Melin A., Askemark Y., Wahlund K. G., Schill G.: *Anal. Chem.* 51, 976 (1979).
36. Tilly-Melin A., Ljungcrantz M., Schill G.: *J. Chromatogr.* 185, 225 (1979).
37. Martin C. J., Saxena S. J.: *J. Chromatogr. Sci.* 18, 1459 (1980).
38. Gioacchini A. M., Roda A., Galletti G. C., Bocchini P., Manetta A. Ch., Baraldini M.: *J. Chromatogr.*, A 730, 31 (1996).
39. Englstoen K. B. P., Jellum E.: *Electrophoresis* 18, 1857 (1997).
40. Schoots A. C., Verheggen T. P. E. M., De Vries P. M. J. M., Everaerts F. M.: *Clin. Chem.* 36, 435 (1990).
41. Petucci C. J., Kantes H. L., Strein T. G., Veening H.: *J. Chromatogr.*, B 668, 241 (1995).
42. Tran T. C., Huq T. A., Kantes H. L., Crane J. N., Strein T. G.: *J. Chromatogr.*, B 690, 35 (1997).
43. Lee K.-J., Lee J. J., Moon D. C.: *Electrophoresis* 15, 98 (1994).
44. Alfazema L. N., Hows M. E. P., Howells S., Perrett D.: *Electrophoresis* 18, 1847 (1997).
45. Caslavská J., Lienhard S., Thormann W.: *J. Chromatogr.* 638, 335 (1993).
46. Kunkel A., Günter S., Wätzig H.: *J. Chromatogr.*, A 768, 125 (1997).
47. Caslavská J., Gassmann E., Thormann W.: *J. Chromatogr.*, A 709, 147 (1995).
48. Schmutz A., Thormann W.: *Electrophoresis* 15, 51 (1994).
49. Tomlinson A. J., Benson L. M., Johnson K. L., Naylor S.: *Electrophoresis* 15, 62 (1994).
50. Valkó I. E., Billiet H. A. H., Frank J., Luyben K. Ch. A. M.: *Chromatographia* 38, 730 (1994).
51. Maman O., Marseille F., Guillet B., Disnar J.-R., Morin P.: *J. Chromatogr.*, A 755, 89 (1996).
52. Bažant L., Wurst M., Smolková-Keulemansová E.: *J. Chromatogr.* 445, 337 (1988).
53. Petterson C., Schell G.: *J. Liq. Chromatogr.* 9, 269 (1986).
54. Oerlich E., Preusch H., Wilhelm E.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 3, 269 (1980).
55. Aso Y., Yoshioko S., Shibazaki T., Uchiyama M.: *Bunseki Kagaku* 35, 314 (1986).
56. Kurganov A., Darankov V.: *J. Chromatogr.* 218, 559 (1981).
57. Petterson C., No K.: *J. Chromatogr.* 282, 671 (1983).
58. Feitsma K. G., Bosman J., Drenth B. F. H., De Zeeuw R. A.: *J. Chromatogr.* 333, 59 (1985).
59. Feitsma K. G., Drenth B. F. H., De Zeeuw R. A.: *J. High Resol. Chromatogr.* 7, 147 (1984).
60. Sinibaldi M., Flieger M., Cvak L., Messina A., Pichini A.: *J. Chromatogr.* 666, 471 (1994).
61. Okamoto Y., Aburatani R., Kanda Y., Hatada K.: *Chem. Lett.* 1988, 1125.
62. Doležalová M., Tkaczyková M.: *Chirality* 11, 394 (1999).

M. Wurst^a, V. Pacáková^b, and K. Štulík^b (^a*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^b*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Charles University, Prague*): **High-Performance Separation Methods in Analysis of Benzenecarboxylic Acids**

High-performance separation methods applied to the analysis of benzenecarboxylic acids are critically reviewed. Special attention is paid to gas and liquid chromatography and capillary electrophoresis. Numerous examples of applications are summarized in tables.

MEERWEINOVA-PONNDORFOVA-VERLEYOVA REDUKCE A OPPENAUEROVA OXIDACE KATALYZOVANÉ HETEROGENNÍMI KATALYZÁTORY

MICHAELA BARTOŠOVÁ^a, LIBOR ČERVENÝ^a
a BLANKA WICHTERLOVÁ^b

^aÚstav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 6, 166 28 Praha 6, ^bÚstav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Akademie věd České republiky, Doléjškova 3, 182 23 Praha 8

Došlo dne 7.IX.2000

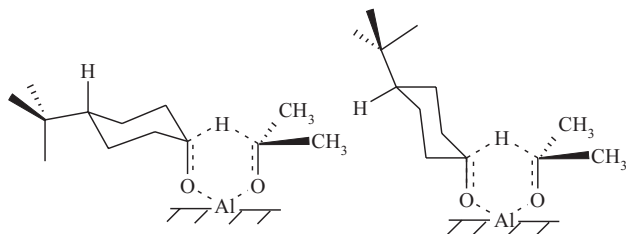
Klíčová slova: Meerweinova-Ponndorfova-Verleyova redukce, Oppenauerova oxidace

Obsah

1. Úvod
2. Meerweinova-Ponndorfova-Verleyova redukce a Oppenauerova oxidace
 - 2.1. Vedlejší produkty MPVO reakcí
 - 2.2. Heterogenně katalyzované MPVO reakce
 - 2.2.1. MPVO reakce katalyzované amorfními kovovými oxidy
 - 2.2.2. MPVO reakce katalyzované zeolitickými katalyzátory
 - 2.2.3. Katalytické vlastnosti zeolitu Beta
 - 2.3. Tvarová selektivita MPVO reakcí
3. Závěr

1. Úvod

Meerweinova-Ponndorfova-Verleyova redukce ketonů a aldehydů alkoholy a Oppenauerova oxidace alkoholů ketony (MPVO) jsou reakce katalyzované oxidy kovů, vykazujícími povrchovou bazicitu nebo Lewisovu kyselost. V současné době je pozornost věnována katalyzátorům na bázi zeolitů struktury X s alkalickými kationty a vysokosilikátovým zeolitům struktury Beta na bázi alumosilikátů a titanosilikátů. Vzhledem k tomu, že MPVO reakce v případě katalýzy zeolitickými katalyzátory probíhají uvnitř jejich kanálové struk-



Obr. 1. Tranzitní stav *cis*-4-*tert*-butylcyclohexan-1-olu (vlevo) a *trans*-4-*tert*-butylcyclohexan-1-olu (vpravo) v přímých kanálech zeolitu Beta

tury, je jejich *cis/trans* selektivita ovlivněna vnitřní kanálovou strukturou zeolitu, umožňující tvorbu pouze určité struktury přechodového reakčního komplexu. Zeolitické katalyzátory Beta vykazují např. vysokou *cis*-stereoselektivitu při tvorbě substituovaných alkylcyclohexanolů, závisící na velikosti kanálů Beta zeolitu. Využití MPVO reakcí lze nalézt v oblasti chemických specialit, zejména v průmyslu látek vonných a chuťových a ve farmaceutickém průmyslu. Ceněny jsou především vonné vlastnosti některých *cis*-izomerů, které vznikají ve větší či menší míře vedle *trans*-izomerů.

2. Meerweinova-Ponndorfova-Verleyova redukce a Oppenauerova oxidace

Meerweinovy-Ponndorfovy-Verleyovy redukce a Oppenauerovy oxidace, které jsou vratnými reakcemi k MPV redukcím, probíhají v homogenní fázi za mírných teplotních podmínek při použití Lewisových kyselin jako katalyzátorů¹⁻⁴ (obr. 1). Při reakcích nedochází zpravidla k nežádoucím oxidacím či redukcím jiných funkčních skupin, C=C vazby nebo C–X vazeb, kde X = halogen nebo nitro skupina. MPV reakce probíhá podle schématu 1.

Donory vodíku jsou snadno oxidovatelné sekundární alkoholy (např. propan-2-ol, butan-2-ol, pentan-2-ol nebo hexan-2-ol) a oxidanty jsou jednoduché ketony (např. aceton nebo cyklohexanon). Meerweinovy-Ponndorfovy-Verleyovy redukce a Oppenauerovy oxidace jsou obvykle katalyzovány homogenními katalyzátory, kovovými alkokidy (Al(OiPr)₃), a poslední dobou i heterogenními katalyzátory na bázi oxidů. Aktivními centry jsou bazická centra nebo centra kyselá s Lewisovským charakterem a schopností ligandové výměny.

Meerweinovy-Ponndorfovy-Verleyovy redukce a Oppenauerovy oxidace probíhají přes cyklický šestičlenný tranzitní stav, ve kterém je substrát a reduktant či oxidant koordinován současně k Lewisovskému kovovému centru podle schématu 2.

Tímto centrem je nejčastěji Al³⁺ kation. Reagující alkohol je koordinován jako alkokid. Aktivaci karbonylu koordinací k Al³⁺ je zahájen transport vodíku z alkoholátu na karbonyl⁵. Ion kovu slouží také jako vhodný templát, vázající dva reak-

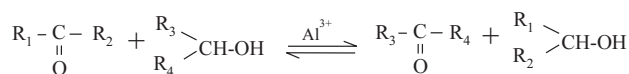


Schéma 1. Průběh Meerweinovy-Ponndorfovy-Verleyovy redukce a Oppenauerovy oxidace

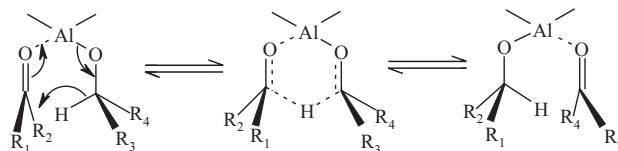


Schéma 2. Koordinace substrátu a reduktantu či oxidantu k Lewisovskému centru

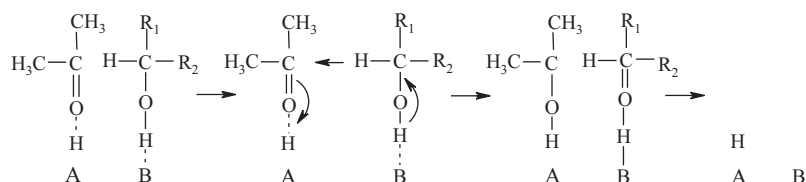


Schéma 3. Koordinace substrátu a reduktantu či oxidantu k bazickému centru

tanty v odpovídající orientaci⁴. Vzniklý alkoxydový produkt může opustit komplex prostřednictvím alkoholýzy, během které je proton odštěpen z objemné molekuly alkoholu.

Jestliže jsou aktivními centry bazická centra, reakce probíhá také přes cyklický tranzitní stav²⁸ podle schématu 3. Dochází k transportu hydridového iontu z uhlíku alkoholátu na molekulu ketonu za vzniku příslušného alkoholátu. S rostoucí elektrofilitou karbonylového uhlíku vzrůstá síla adsorpce na bazických centrech.

2.1. Vedlejší produkty MPVO reakcí

Nejdůležitější vedlejší reakcí je aldolová kondenzace. Uplatňuje se především v případech, kdy jsou substrátem aldehydy nebo se případně aldehydy tvoří během Oppenauerovy oxidace primárních alkoholů. Po kondenzaci většinou následuje dehydratace a vzniklá voda deaktivuje alkoxydový katalyzátor. Pro alkoxydy lanthanu bylo dokázáno, že se výtěžky MPV redukce mohou podstatně zvýšit přítomností NaA zeolitu, který adsorbuje vznikající vodu⁶.

Aldehydy, které nemají α -vodíkový atom (jako benzaldehyd) mohou reagovat Tiščenkovou reakcí^{4,7} poskytující estery. Některé MPV redukce ketonů jsou provázeny dehydratací vzniklých alkoholů, především pokud je vzniklá dvojná vazba stabilizována konjugací⁸.

2.2. Heterogenně katalyzované MPVO reakce

Hlavní výhodou heterogenně katalyzovaných MPVO reakcí je snadné oddělení katalyzátoru od kapalné reakční směsi a v některých případech jejich vysoká *cis*-stereoselektivita. Heterogenní katalyzátory zahrnují amorfní kovové oxidy a krystalické aluminosilikáty. Jejich aktivita se vztahuje k povrchové zásaditosti nebo Lewisově kyselosti těchto materiálů.

2.2.1. MPVO reakce katalyzované amorfními kovovými oxidy

Horner a Kaps⁹ použili modifikovaný γ - Al_2O_3 s povrchově vázanými atomy chloru zvyšujícími Lewisovu kyselost, v kombinaci s malým množstvím $\text{Al}(\text{O}i\text{-Pr})_3$, jako katalyzátoru v MPV redukci benzaldehydu, cyklohexanonu a acetofenu propan-2-olem. Zjistili, že v nepřítomnosti $\text{Al}(\text{O}i\text{-Pr})_3$ reakce neprobíhala. Reakční rychlost se zvyšovala až přidáním silné zásady (např. diisopropylaminu), která pravděpodobně umožnila deprotonaci povrchu aluminu za tvorby isopropoxydových komplexů vázaných na jejím povrchu.

Posner se spolupracovníky¹⁰ studovali γ - Al_2O_3 v MPV redukci nenasycených karbonylových sloučenin propan-2-olem. Zjistili, že $\text{Al}(\text{O}i\text{-Pr})_3$ se tvoří *in situ* během deprotonace propan-2-olu na alumině dehydratované za vysokých teplot

(nad 300 °C). Wismeijer, Kieboom a van Bekkum¹¹ studovali redukcí 4-*tert*-butylcyklohexan-1-onu s přenosem vodíku pomocí propan-2-olu v kapalné fázi při 83 °C, katalyzovanou γ - Al_2O_3 . Také v tomto případě se aktivita katalyzátoru zvyšovala se vzrůstající teplotou aktivace. Gargano se spolupracovníky¹² zkoumali předběžnou úpravu hlinitého katalyzátoru vodíkem při 270 °C. Vzniklá centra umožňovala vést reakci při nižší teplotě a vyšší selektivitě pro tvorbu alkoholu. Stejně tak byly vyšetřovány další oxidy kovů a bylo zjištěno, že La_2O_3 byl nejlepší z hlediska konverze a selektivity tvorby alkoholů.

Kuno a jeho spolupracovníci¹³ použili ZrO_2 jako pevný katalyzátor při Oppenauerově oxidaci primárních a sekundárních alkoholů. Vsádková oxidace byly prováděna při 80 °C v benzenu nebo toluenu s 60-ti ekvivalenty acetonu jako oxidantu. U kontinuálního uspořádání byla reakce prováděna v trubkovém reaktoru s pevným ložem katalyzátoru. Primární alkoholy byly oxidovány *p*-benzochinonem nebo benzofenonem v xylenu jako rozpouštědle při 140 °C. Kaspar se spolupracovníky¹⁴⁻¹⁵ provedli redukcí α,β -nenasycených ketonů na allylické alkoholy s propan-2-olem v plynné fázi na MgO při 250 °C. MgO byl vytvořen při zahřívání $\text{Mg}(\text{OH})_2$ při 350 °C v proudu vzduchu. Úspěšná regenerace katalyzátoru byla uskutečněna stejnou cestou.

Kijeński, Gliński a Reinhercs¹⁶ studovali (de)hydrogenační reakci různých reaktantů (redukcí karbonylových skupin a dehydrogenaci dlouhých rozvětvených alifatických alkoholů), mající odlišné funkční skupiny. Reakce byly prováděny v plynné fázi v rozsahu reakčních teplot 350–450 °C na MgO , aktivovaném při 550 °C nebo 750 °C. Všechny studované (de)hydrogenační reakce byly důležité pro přípravu vonných látek.

Ravasio se spolupracovníky¹⁷ studovali přenos vodíku z různých sekundárních alkoholů na steroidní konjugované enony a nasycené ketony, katalyzovaný $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$ při 90 °C. Stereoselektivita reakce záležela na použitém sekundárním alkoholu (donor vodíku). Ve všech případech byl získán přebytek ekvatoriálního alkoholu. Struktura aktivního centra však nebyla popsána.

Ivanov se spolupracovníky¹⁸ studovali MPV redukci acetonu ethanolem, katalyzovanou oxidy kovů s odlišnými acidobazickými vlastnostmi. Bylo zjištěno, že reakce probíhá jak na kyselých katalyzátorech s Lewisovými centry ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{-Cl}$), tak i na zásaditých (MgO , ZrO_2) katalyzátorech. Byly navrženy dvě varianty mechanismů, kde mechanismus probíhající přes šestičlenný tranzitní stav je analogický homogennímu průběhu reakce¹⁸.

2.2.2. MPVO reakce katalyzované zeolitickými katalyzátory

U MPVO reakcí katalyzovaných krystalickými aluminosilikáty nebo dalšími metalosilikáty s vnitřní kanálovou struktu-

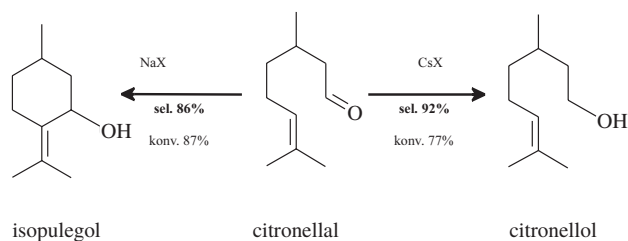


Schéma 4. Uplatnění tvarové selektivity při přeměně citronellalu za podmínek MPV reakce

rou se uplatňuje tvarová selektivita kanálové struktury zeolitu, zajišťovaná geometrickou strukturou vytvořeného přechodového reakčního komplexu. U zeolitu Beta (Si:Al = 12) jsou aktivními centry hlinité atomy, které jsou pouze částečně vázány do sítě zeolitu, avšak jejich struktura není dosud známa. Totéž platí i pro titan v titanosilikátu Ti-Beta struktury.

Shabtai a spol.² studovali MPV redukci různých nenasyčených a nasycených aldehydů a ketonů v plynné fázi propan-2-olem jako redukčním činidlem, katalyzovanou¹⁹ kationtovými formami zeolitů struktury X. V případě X-zeolitů s vysokým obsahem hliníku¹ a kationtů kovů alkalických nebo alkalických zemin se katalytická aktivita vztahuje k jejich zásaditým vlastnostem. Při redukci lineárních aldehydů katalyzované NaX zeolity byl pozorován postupný pokles reakční rychlosti s rostoucí délkou postranního řetězce. To bylo vysvětlováno¹⁹ zvyšujícím se difuzním omezením v mikropórech zeolitu. Tvarová selektivita se uplatnila při přeměně citronellalu za podmínek MPV reakce. V NaX existuje dostatek prostoru, aby mohlo dojít k intramolekulárnímu kruhovému uzavření na isopulegol, kdežto u redukce s větším Cs⁺ kationtem byla pozorována přeměna na lineární citronellole podle schématu 4.

Reakce cyklopentanolu v přítomnosti cyklohexanonu při 350 °C na amorfních oxidech kovů a zeolitech byly studovány Berkanimem a spol.²⁰ a jejich průběh je znázorněn schématem 5.

2.2.3. Katalytické vlastnosti zeolitu Beta

Creyghton a spol.^{21,22} studovali stereoselektivní redukci 4-*tert*-butylcyklohexan-1-olu v kapalně fázi na zeolitu H-Beta. Bylo zjištěno, že aktivita katalyzátoru H-Beta vzrůstá s teplotou jeho aktivace za hydrotermálních podmínek, a že katalyzátor vykazoval vysokou *cis*-stereoselektivitu. Navíc tento katalyzátor se ukázal jako zcela regenerovatelný bez ztráty aktivity a selektivity. Van der Waal, Tan a van Bekum²³ studovali aktivitu Ti-Beta zeolitu ve stejné MPV reakci. Byla opět nalezena velmi vysoká selektivita okolo 98 % na *cis*-izomer, která byla taktéž vysvětlena omezeným tranzitním stavem přechodového komplexu koordinovaného k Lewisovskému kyselému titanovému centru. MPV redukce 4-*tert*-butylcyklohexan-1-onu byly také prováděny v kapalně fázi různými sekundárními alkoholy (propan-2-ol, butan-2-ol, pentan-2-ol a hexan-2-ol). Rostoucí délka řetězce alkoholu neměla žádný vliv na aktivitu a selektivitu reakce. Výsledky získané s různými pevnými katalyzátory jsou uvedeny v tabulce I.

Katalyzátor byl po reakci izolován z reakční směsi filtrací a reaktivován při 550 °C. Bylo zjištěno, že aktivita katalyzá-

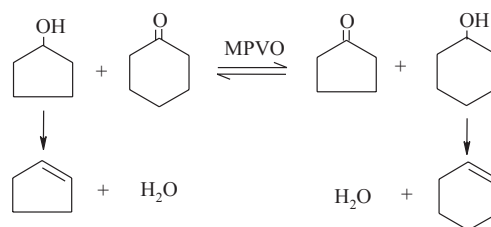


Schéma 5. Reakce cyklopentanolu v přítomnosti cyklohexanonu při 350 °C na amorfních oxidech kovů a zeolitech

Tabulka I

MPV redukce 4-*tert*-butylcyklohexan-1-onu propan-2-olem na 4-*tert*-butylcyklohexan-1-ol katalyzovaná různými pevnými katalyzátory

Katalyzátor ^a	Si:Al	Konverze [%]	Selektivita ^b [%]	<i>cis:trans</i>
Na-Beta	12,5	32	>95	96:4
NH ₄ -Beta	12,5	30	>95	95:5
Si-Beta	>5000	0	–	–
Na-Y	2,5	0	–	–
NH ₄ -Y	2,5	0	–	–
USY	2,5 (objemově)	24,4	ca 85	9:91
NH ₄ -MOR ^c	6,5	0	–	–
deal-MOR ^c	32	0	–	–
H-MCM-41 ^c	15	10	ca 80	10:90
Na-MCM-41 ^c	15	10	>95	10:90
H-MCM-22	15	33	ca 25	24:76
HA-HPV	2	19	>95	9:91
γ-Al ₂ O ₃	–	45	>95	9:91

^a Teplota aktivace 500 °C, ^b selektivita na alkohol, ^c teplota aktivace 430 °C

toru se po reaktivaci mírně zvýšila při zachování selektivity³, což indikovalo tvorbu dalších aktivních center během kalcinace katalyzátoru.

Z tabulky I je patrné, že mordenit (NH₄⁺ nebo dealuminované formy) nebo Y (NH₄⁺ nebo Na⁺-forma) nejsou aktivní pro tuto reakci. Pro mordenit je toto vysvětlováno limitní velikostí pórů tohoto typu zeolitu (7,0×6,5 Å) v kombinaci s jednorozměrnými kanály. Adsorpční experimenty ukázaly, že molekula 4-*tert*-butylcyklohexan-1-onu (6,4×5,8×9,6 Å) nebyla schopna dosáhnout potřebné koncentrace v mikropórech zeolitu při použitých teplotách²⁴. Avšak butan-2-ol, který mohl vstoupit do pórů mordenitu, nebyl propan-2-olem také redukován. Z toho vyplynulo, že mordenit nemá schopnost vytvořit aktivní strukturu Al center katalyzující MPV redukci, případně, že v monodimenzionálních kanálech mordenitu není možné lokalizovat tranzitní reakční komplex. Také Na-Y, NH₄-Y nejsou aktivní v MPV redukci, přestože mají vstupní otvory dostatečně veliké (7,4 Å) jak pro vstupující 4-*tert*-butylcyklohexan-1-on, tak pro vystupující 4-*tert*-butylcyklohexan-1-ol. To je vysvětleno nepřítomností specifických Lewisových kyselých míst^{21,25}, které jsou tvořeny pouze určitými strukturami hliníkových center.

Tabulka II
MPV redukce cyklických ketonů katalyzovaná zeolitem Ti-Beta

Substrát	TOF ^a	Konverze ^b [%]	Selektivita ^b [%]
Cyklopentanon	0,46	11,0	
Cyklohexanon	0,80	26,9	
2-Methylcyklohexan-1-on	0,28	8,8	60:40
3-Methylcyklohexan-1-on	0,74	25,8	30:70
4-Methylcyklohexan-1-on	1,04	33,7	99:1
2- <i>terc</i> -Butylcyklohexan-1-on	0,00	0,0	
4- <i>terc</i> -Butylcyklohexan-1-on	2,26	64,9	98:2

^a Turn-over-frequency, tj. počet reakčních obrátů na jednom aktivním centru za časovou jednotku, ^b konverze a selektivita po 6 hodinách reakce

Tabulka III
MPV redukce 4-*terc*-butylcyklohexan-1-onu, katalyzovaná katalyzátory obsahující Ti při refluxu propan-2-olu

Katalyzátor	TOF ^a [h ⁻¹]	Konverze ^b [%]	Selektivita <i>cis:trans</i> ^b
Ti-Beta (69) ^c	2,26	64,9	98:2
Ti(OiPr) ₄ ^d		0,0	
Ti-MCM-41 (66) ^c		0,0	
Al-Beta (11,2) ^{c,d}	>12	100,0	95:5
Si-Beta		0,0	

^a Turn-over-frequency, tj. počet reakčních obrátů na jednom aktivním centru za časovou jednotku, ^b konverze a selektivita po 6 hodinách reakce, ^c hodnota v závorce určuje buď poměr Si:Ti nebo Si:Al, ^d použito 0,25 mmol katalyzátoru

Tabulka IV
Vliv kationtů zeolitu Beta na stereoselektivitu MPV redukce 4-*terc*-butylcyklohexan-1-onu propan-2-olem na *cis*-4-*terc*-butylcyklohexan-1-ol

Kation v zeolitu Beta	Poloměr kationtu ^a [Å]	<i>cis:trans</i> ^b
Li ⁺	0,90	95:5
Na ⁺	1,16	96:4
K ⁺	1,52	98:2
Rb ⁺	1,66	99:1
Cs ⁺	1,81	99:1

^a Koordinační číslo²⁷ je 6, ^b selektivita na 4-*terc*-butylcyklohexan-1-ol >95 % ve všech případech; konverze >95 %

Pro aktivitu katalyzátoru v MPV reakci jsou potřebná koordinačně nenasycená hlinitá centra, která mohou reagovat s alkoholem za tvorby aktivního alkoxidu a zároveň umožňují koordinaci molekuly ketonu. Předpokládá se, že koordinačně

nenasycená hlinitá centra vytváří mimomřížkový hliník, který je částečně hydrolyzován ze skeletu zeolitu a způsobuje jednak defekty uvnitř zeolitu, jednak specifická Al centra. To vysvětluje, proč zeolit USY, který byl vytvořen hydrotermálním postupem, při kterém je Al uvolňován ze skeletu je aktivním katalyzátorem. Toto platí i pro méně krystalické materiály jako MCM-41, pokud obsahují Al ve skeletu syntetizovaných mesoporezních materiálů.

Výhodou zeolitu Al-Beta je vysoká selektivita pro termodynamicky méně stabilní *cis*-alkohol, který je obvykle žádanějším izomerem. Oba katalyzátory^{1,21} (Al-Beta, Ti-Beta) projevíly vysokou stereoselektivitu na *cis*-4-*terc*-butylcyklohexan-1-ol. Tato stereoselektivita může být vysvětlena předpokladem dvou různých tranzitních stavů v pórech zeolitu Beta. Bylo zjištěno, že aktivita zeolitu Al-Beta vzrůstá s teplotou aktivace. V podstatě úplná konverze ketonu na 4-*terc*-cyklobutylhexan-1-ol a vysoká selektivita (*cis:trans* = 95:5) byla získána s Beta zeolitem aktivovaným při 600 °C. Vzrůst katalytické aktivity s rostoucí teplotou aktivace ukazuje, že aktivní katalytická místa nejsou pouze koordinačně nenasycené hlinitkové ionty, ale speciální Lewisova kyselá centra, vytvořená vysokou kalcinační teplotou. Z IČ měření bylo patrné, že pro Al-Beta jsou tato centra tvořena z částečně hydrolyzovaných Al atomů a mohou se tvořit již během odstranění templátu ze syntetizované formy zeolitu. Koncentrace a struktura těchto center záleží na podmínkách aktivace, tj. teplotě a hydrotermálních podmínkách.

Následující složení produktů z kinetického hlediska bylo získáno v MPV redukci 2-, 3- a 4-methylcyklohexan-1-onu (tabulka II) na Ti-Beta katalyzátoru. Při redukci methylcyklohexanonů bylo pozorováno, že 4-izomer reagoval relativně rychle a poskytoval produkt řízený termodynamicky. 2- a 3-Methylcyklohexan-1-ony reagovaly velmi pomalu a poskytovaly produkty řízené kineticky (*cis:trans* = 60:40, 30:70). To je pravděpodobně způsobeno blízkostí methylové skupiny a katalytického místa¹. Dochází k deformaci *cis*-tranzitního stavu a k nízké selektivitě a aktivitě. Objemnější 2-*terc*-butylcyklohexan-1-on nemohl být za těchto podmínek vůbec redukován vzhledem ke sterickému bránění aktivních poloh³.

Vzhledem k tomu, že MPV reakce jsou katalyzovány Lewisovými kyselinami, byly studovány jako katalyzátory redukce 4-*terc*-butylcyklohexan-1-onu také další zeolity obsahující titan²⁶ (tabulka III).

Jak je vidět z tabulky III, Ti-Beta je schopen katalyzovat MPV redukci, ale s menší aktivitou (nižší hodnota TOF) než Al-Beta. Je zajímavé, že další materiály obsahující Ti byly v MPV redukci zcela neaktivní. Vysoká selektivita Ti-Beta na termodynamicky méně stálý *cis*-alkohol vypovídá o skutečnosti, že reakce probíhala uvnitř kanálové struktury zeolitu Beta. To také indikuje, že titanové centrum v Ti-Beta má značně kyselá Lewisovské vlastnosti.

2.3. Tvarová selektivita MVPO reakcí

Tranzitní stavy, které vedou k *cis*- a *trans*-alkoholům se značně liší také podle jejich umístění v pórech zeolitu Beta (obr. 1).

V tranzitním stavu, vedoucímu k *cis*-izomeru, má alkoxidový intermediát lineární tvar, který se dobře uspořádá v kanálu zeolitu, zatímco tranzitní stav *trans*-izomeru je prostorově velmi náročný. Tato tvarová selektivita tranzitního stavu

vede při redukci 4-*terc*-butylcyklohexan-1-onu převážně ke vzniku *cis*-4-*terc*-butylcyklohexan-1-olu.

Stereoselektivita zeolitu Beta³ v MPV redukci 4-*terc*-butylcyklohexan-1-onu na odpovídající *cis*-alkohol odpovídala také velikosti kationtu iontově vyměněného v zeolitu (tabulka IV), což svědčí o tom, že reakce probíhala v mikropórech zeolitické struktury.

Alkalické kovy a kovy alkalických zemin zvyšují *cis:trans* stereoselektivitu v důsledku snížení volného objemu vnitřní kanálové struktury¹⁹.

3. Závěr

Heterogenní katalyzátory MPVO reakcí zahrnují kovové amorfní oxidy a zeolity. Jejich aktivita se vztahuje k jejich povrchové zásaditosti nebo Lewisově kyselosti. V práci jsou diskutovány především katalytické vlastnosti alumosilikátů a titanosilikátů zeolitické struktury Beta, jejichž aktivita v MPVO reakcích byla teprve nedávno publikována. Bylo zjištěno, že Al-Beta a Ti-Beta jsou regenerovatelné vysoce *cis*-stereoselektivní katalyzátory MPV redukce a doplňkové Oppenauerovy oxidace. Stereoselektivní vlastnosti jsou způsobeny selektivitou tranzitního stavu v mikropórech zeolitu. Aktivní místa Al-Beta jsou tvořena hliníkovými nebo titanovými kationty, které nejsou zcela vázány ve skeletu zeolitické struktury, avšak jsou lokalizovány v mikropórech zeolitu. Titanová centra s Lewisovými vlastnostmi v zeolitu Ti-Beta vykazují analogii s hliníkovými centry v zeolitu Al-Beta. Vzhledem k nižší kyselosti Ti-Beta je vhodnějším katalyzátorem než Al-Beta pro Oppenauerovu oxidaci, protože je snížena pravděpodobnost aldolové kondenzace ketonu a rozpouštědla.

LITERATURA

- van der Waal J. C., Creighton E. J., Kunkeler P. J., Tan K., van Bekkum H.: *Top. Catal.* 4, 261 (1997).
- Creighton E. J., Huskens J., van der Waal J. C., van Bekkum H.: *Heterog. Catal. Fine Chem. IV*, 531 (1997).
- Creighton E. J., Ganeshie S. D., Downing R. S., van Bekkum H.: *J. Mol. Catal. A., Chem.* 115, 457 (1997).
- de Graauw C. F., Peters J. A., van Bekkum H., Huskens J.: *Synthesis* 10, 1007 (1994).
- Ashby E. C.: *Acc. Chem. Res.* 21, 414 (1988).
- Lebrun A., Namy J. L., Kagan H. B.: *Tetrahedron Lett.* 32, 2355 (1991).
- Tishchenko W.: *Chem. Zentralbl.* 77, 1309, 1556 (1906).
- Oppenauer R. V.: *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 56, 137 (1937).
- Honer L., Kaps U. B.: *Ann. Chem.* 1980, 192.
- Posner G. H., Runquist A. W., Chapdelaine M. J.: *J. Org. Chem.* 42, 1202 (1977).
- Wismeijer A. A., Kieboom A. P. G., van Bekkum H.: *Appl. Catal.* 34, 189 (1987).
- Gargano M., D'Oranzio V., Ravasio N., Rossi M. J.: *J. Mol. Catal.* 58, L5 (1990).
- Kuno H., Shibagaki M., Takahashi K., Matsushita H.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 64, 312 (1991).
- Kaspar J., Trovarelli A., Lenarda M., Graziani M.: *Tetrahedron Lett.* 30, 2705 (1989).
- Kaspar J., Trovarelli A., Zamoner F., Farnetti E., Graziani M.: *Stud. Surf. Sci. Catal.* 78, 631 (1993).
- Kijeński J., Gliński M., Reinhercs J.: *Stud. Surf. Sci. Catal.* 41, 231 (1988).
- Ravasio N., Gargano M., Quatraro V. P., Rossi M. J.: *Stud. Surf. Sci. Catal.* 59, 161 (1991).
- Ivanov V. A., Bachelier J., Audry F., Lavalley J. C.: *J. Mol. Catal.* 91, 45 (1994).
- Shabtai J., Lazar R., Biron E.: *J. Catal.* 27, 35 (1984).
- Berkani M., Lemberon J. L., Marczewski M., Perot G.: *Catal. Lett.* 31, 405 (1995).
- Creighton E. J., Ganeshie S. D., Downing R. S., van Bekkum H.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, 1859.
- Creighton E. J., Ganeshie S. D., Downing R. S., van Bekkum H.: *J. Mol. Catal.*, v tisku.
- van der Waal J. C., Tan K., van Bekkum H.: *Catal. Lett.* 41, 63 (1996).
- Dalton A.: *Molecular and Crystal Structure Models*. Wiley, New York 1978.
- Ivanov V. A., Bachelier J., Audry F., Lavalley J. C.: *J. Mol. Catal.* 91, 45 (1994).
- van der Waal J. C., Lin P., Rigutto M. S., van Bekkum H.: *Stud. Surf. Sci. Catal.* 105, 1093 (1997).
- Shannon R. D.: *Acta Crystallogr.*, A 32, 751 (1976).
- Williams E. D., Krieger K. A., Day A. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 2404 (1953).

M. Bartošová^a, L. Červený^a, and B. Wichterlová^b (^a*Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b*Jaroslav Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Meerwein-Ponndorf-Verley Reduction and Oppenauer Oxidation Catalyzed by Heterogeneous Catalysts**

The article summarizes literature findings on Meerwein-Ponndorf-Verley oxidations on heterogeneous catalysts, including amorphous metallic oxides and zeolites that exhibit surface basicity or Lewis acidity. Attention is primarily focused on catalytic properties of high-silicate zeolites of β -structure based on alumosilicates and titanosilicates. The reaction mechanism and high *cis* stereoselectivity of the catalysts are discussed. The reactions find use in the field of specialty chemicals.

PRAKTICKÉ ZKUŠENOSTI SE SIMULACÍ SLOŽITÝCH CHEMICKÝCH KONTINUÁLNÍCH PROCESŮ

JAROSLAV POŽIVIL

Ústav počítačové a řídicí techniky, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: Jaroslav.Pozivil@vscht.cz

Došlo dne 26.IX.2000

Klíčová slova: simulace, chemické kontinuální procesy

Obsah

1. Úvod
2. Cíle simulačních výpočtů v chemickém průmyslu
3. Nástroje simulace chemických procesů
4. Některé problémy při realizaci simulačních výpočtů
 - 4.1. Analýza topologie procesu a sestavení výpočetního schématu
 - 4.2. Modely aparátů
 - 4.3. Databanka fyzikálně-chemických vlastností
 - 4.4. Vstupní data
 - 4.5. Přizpůsobení modelu reálnému chování výroby
 - 4.6. Aktualizace simulačního modelu a jeho další využívání
 - 4.7. Další možnosti využívání simulačních programů
5. Závěr

1. Úvod

V chemickém průmyslu se setkáváme s výrobami s velkým množstvím vzájemně propojených aparátů a s významnými interakcemi hmoty, energie a hybnosti. V zařízení se zpracovávají složité směsi rozmanitých chemických látek často nestandardního chování v širokém rozmezí pracovních podmínek (teplot, tlaků, koncentrací apod.). Modely jednotlivých aparátů obvykle vyžadují řešení soustav nelineárních algebraických a diferenciálních rovnic, v některých případech (kolony) i velmi rozsáhlých. Přesto je modelování jednotlivých operací dobře propracováno a patří ke standardním metodám chemického inženýrství. Naproti tomu chování výrobní linky jako celku nelze předpovědět bez složitých výpočtů. Vzhledem ke složitosti systému se řadí simulace celé výrobní linky mezi obtížnější úlohy. U kontinuálních výrob ve stacionárním stavu bylo řešení těchto problémů významně usnadněno existencí univerzálních simulačních programů. Problematice je věnována rozsáhlá literatura, z nejdostupnějších prací lze uvést¹⁻³.

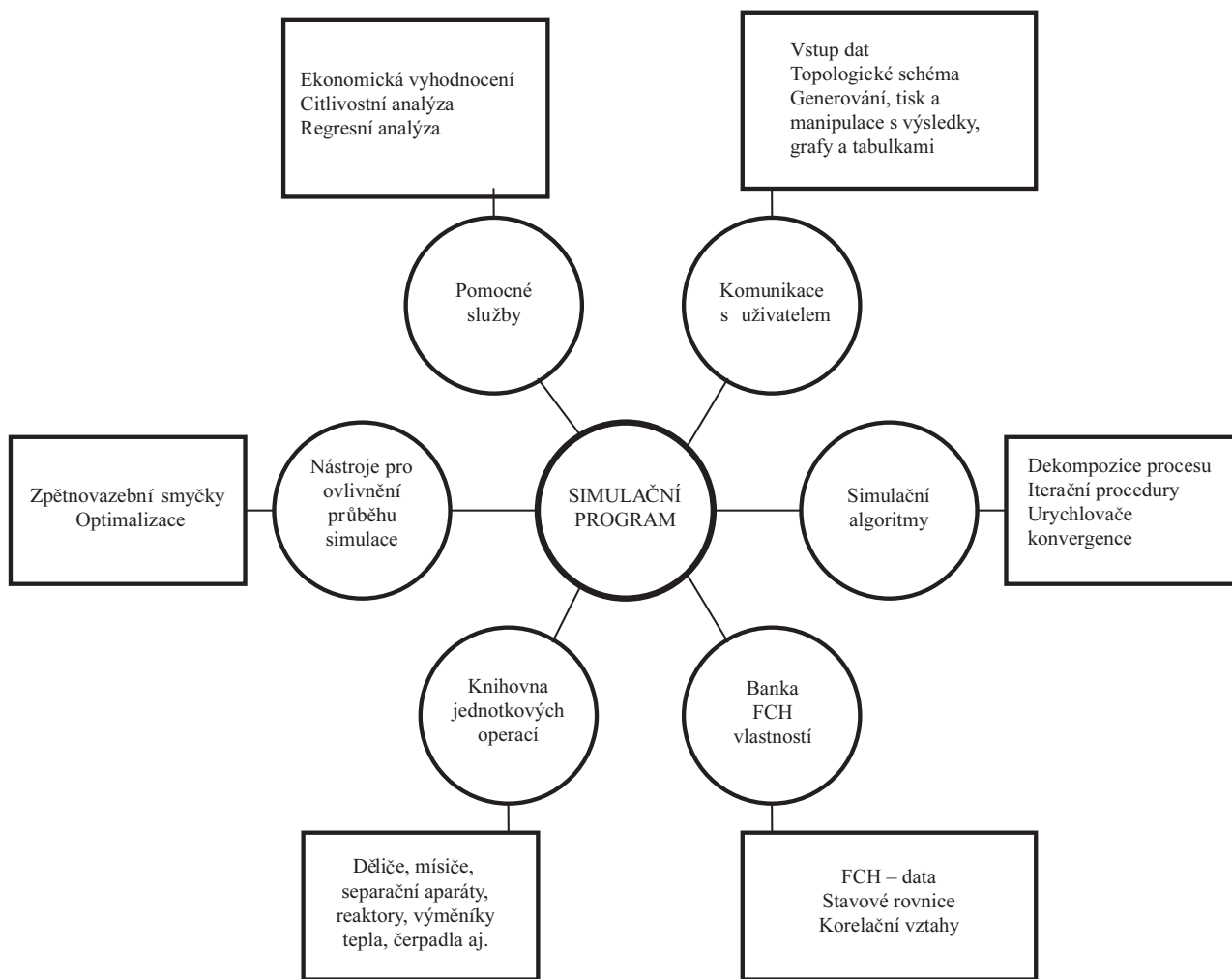
Relativní dokonalost a snadné ovládání v příjemném uživatelském prostředí vytváří idealizované představy o bezproblémovém používání univerzálních simulačních programů. Zkušenosti se simulačními programy však ukazují, že přes

jejich univerzálnost a uživatelský komfort by měl být uživatel i po potřebném zaškolení maximálně obezřetný. Při řešení reálných průmyslových úkolů se vyskytují problémy, např. s výběrem modelů aparátů, s popisem fyzikálně-chemických vlastností, se získáváním provozních a konstrukčních dat apod., které způsobují, že výsledky modelu neodpovídají skutečnému chování výrobního zařízení. O některých z těchto problémů se diskutuje v této práci.

2. Cíle simulačních výpočtů v chemickém průmyslu

Povrchnímu pozorovateli by se mohlo zdát, že simulační výpočty slouží na jedné straně pracovníkům vědy a výzkumu k vytváření publikací a získávání příslušných bodů a na druhé straně pracovníkům průmyslu, kterým osvětlený šéf umožnil práci se simulačním programem, k příjemnému vyplnění nemnohých volných chvil testováním různých možností systému. Ve skutečnosti by však simulační výpočty měly sloužit jednomu hlavnímu cíli, a to úspoře finančních nákladů, resp. vytváření zisku. Toho lze dosáhnout různými způsoby, z nichž lze uvést:

1. Získání důkladných znalostí o chování celého systému, zejména o interakcích mezi jednotlivými jednotkami výrobní linky, které jsou v chemii spojeny recykly nejrůznější úrovně, sdílením tepla apod.
2. Určení funkce výrobní linky při změně vstupních proudů (zejména odezva na změny jakosti surovin, koncentrace zpracovávaných látek apod.).
3. Určení chování linky při změně některého aparátu (poměrně častá výměna aparátů vynucená v chemickém průmyslu zejména korozí bývá spojena se změnou rozměrů, popř. typu aparátů, někdy i změnami propojení a rozmístění).
4. Zjišťování účinku změn provozních podmínek na režim výroby (jde zejména o zjištění citlivosti některé veličiny, např. stupně přeměny v reaktoru na změny teploty, tlaku apod.).
5. Vyhledávání úzkoprofilových článků výrobní linky, simulace návrhů na jejich odstranění a následující intenzifikace výroby.
6. Úpravy technologického režimu vedoucí ke snížení energetické náročnosti výroby, která bývá v chemickém průmyslu vysoká.
7. Úpravy technologického režimu vedoucí ke snížení zatížení životního prostředí, které patří v chemickém průmyslu mezi základní problémy.
8. Zlepšení řízení technologického procesu, resp. v první fázi získání podkladů pro návrh automatizovaného systému řízení.
9. Školení obsluhy, zejména získání citu pro účinnost jednotlivých zásahů do provozního režimu a možné zdroje potíží pro velký rozsah provozních podmínek (schopnosti i dobře vyškolené obsluhy řešit havarijní problémy při dlouhotrvajícím bezporuchovém provozu prudce klesají, k nápravě může sloužit právě simulace).



Obr. 1. Struktura simulačního programu

Ke splnění stanovených cílů je třeba, aby výsledky simulačních výpočtů byly verifikovány a kriticky posouzeny z hlediska přesnosti a použitelnosti, a aby z nich byly vyvozeny praktické závěry.

3. Nástroje simulace chemických procesů

Simulace chemických procesů vyžaduje znalosti simulovaného procesu (technologie), chemického inženýrství (modely aparátů), fyzikální chemie (metody termodynamického popisu chemických systémů) a výpočetní problematiky (numerické metody, nalezení pořadí výpočtů u systémů s recykly, zrychlování konvergence a optimalizace). Proto byla k usnadnění výpočtů vyvinuta řada univerzálních simulačních programů, které osvobozují uživatele od rutinní práce (ať už pracovních ručních výpočtů nebo sestavování programů) a umožňují se soustředit na tvůrčí činnost. Z původních implementací na sálových počítačích spojených s dávkovým zpracováním se vyvinuly moderní interaktivní programy implementované na osobních počítačích a opatřené současnými standardními prvky grafického uživatelského rozhraní (okna, menu, inteligent-

ní formuláře apod.). Z neznámějších jmenujme např. PRO/II, ChemCAD, HYSYS nebo ASPEN PLUS. Jejich struktura, filozofie použití i možnosti jsou velmi podobné a liší se spíše z hlediska komunikace s uživatelem.

Jednotlivé simulační programy mají několik společných základních částí¹, mezi které mj. patří:

- komunikace s uživatelem (vstup dat, prezentace výsledků),
- algoritmy pro řízení simulačního výpočtu – ve většině případů se používá sekvenčně-modulární metoda,
- knihovna jednotkových modulů,
- knihovna fyzikálně-chemických vlastností a databáze fyzikálně-chemických dat,
- nástroje pro ovlivnění simulačního výpočtu uživatelem – zpětnovazební smyčky, citlivostní analýza, optimalizační procedury,
- pomocné služby – grafické prostředky, zpracování experimentálních dat regresními metodami, odhad konstant fyzikálně-chemických vztahů, ekonomické vyhodnocení, aj.

Základní struktura obecného simulačního programu je přehledně znázorněna na obr. 1.

4. Některé problémy při realizaci simulačních výpočtů

V této kapitole vycházíme ze svých dlouholetých zkušeností se simulací průmyslových procesů. Již v letech 1973–76 jsme se účastnili první takové akce v tehdejší Československu – simulace výroby kyseliny sírové ve Spolaně Neratovice pomocí simulačního programu Pacerovského typu na dřevných štítcích^{4,5}. V simulačních výpočtech jsme dále pokračovali (např.⁶) až po zatím poslední simulaci zařízení na čištění surového generatorového plynu⁷.

Před zahájením simulací je nutným prvním krokem stanovení dobře definovaných, realistických a účelných cílů. Od nich se odvíjí nároky na přesnost a základní předpoklady modelů, výběr proměnných a postup simulace. Konečný cíl výpočtů by měl být ekonomický (snížení nákladů, minimalizace počtu experimentů), i když se pracuje převážně s fyzikálními parametry. Od začátku je třeba sledovat, zda vynaložené prostředky jsou adekvátní cílům simulace. Proto se po celou dobu testuje, zda nelze použít jednodušších modelů (lineárních), zda nelze použít jednodušších (modelových) směsí látek, zda nelze zjednodušit výpočetní schéma atd.

4.1. Analýza topologie procesu a sestavení výpočetního schématu

Při sestavování výpočetního schématu podle technologických výkresů je třeba si klást otázky typu: která potrubí se skutečně používají, která slouží jen k najždění/odstavování linky či k havarijním účelům (nouzové přečerpávání). Dále, které části výroby jsou relevantní cílům úlohy, zda je nutné zahrnout i chladicí hospodářství, vodní okruhy apod. Maximální úsilí je třeba věnovat snaze o zjednodušení topologického schématu. Na druhé straně je třeba se ptát, zda jsme nezapomněli na nehmotné proudy, např. energetické (prostup tepla z kondenzátoru jedné rektifikační kolony do vařáku druhé v zařízení na dělení vzduchu⁴), konanou práci či vstup elektrické energie do dmyhadla při výrobě kyseliny sírové^{4,5}.

Nemělo by se začínat s plnou formulací úlohy, na začátku by se uživatel měl vyhnout zbytečným recyklům.

4.2. Modely aparátů

Protože simulační program má pro některé jednotkové operace k dispozici několik modelů, musí být uživatel schopen posoudit vhodnost použití jednotlivých modelů pro danou úlohu. Začátečník obvykle volí modely co nejpřesnější a tudíž nejsložitější, zatímco zejména v prvních fázích simulace by se měli upřednostňovat modely jednodušší (bilanční). Komplexnější uzly se simulují odděleně a postupně se zařazují do simulačního programu. Odstraňování problémů s modely obvykle ztěžuje nedostatečný popis modelů a výpočetních rovnic v uživatelských manuálech.

Důležitou otázkou pro řešitele je, jak lze počet aparátů redukovat. Např. filtr širšího plynu lze zahrnout jako tlakovou ztrátu do následujícího aparátu, nebo při stacionární simulaci není třeba uvažovat zásobníky². Někdy lze více operací sloučit a použít zjednodušený model, např. místo reaktorového

uzlu model s pevně zadanou konverzí, místo separačního uzlu model s pevně daným rozdělením.

A naopak, nesmí se zapomenout na modely v technologickém schématu speciálně nevyznačené jako je větvení a spojování potrubí – modely mísičů a děličů.

4.3. Databanka fyzikálně-chemických vlastností

Důležitou součástí simulačního výpočtu je modelování fyzikálně-chemického chování zpracovávaných látek, zejména stavového chování a popisu fázových rovnováh. Není třeba, aby uživatel sestavoval modely fyzikálně-chemických vlastností, ale musí být schopen posoudit a vybrat vhodný model z knihovny podle rozsahu teplot, tlaků a koncentrací, podle typu látek (elektrolyty, polární a disociované sloučeniny, neideální směsi atd.). V nápovědě bývá doporučení jak pro typ látek, tak pro rozsah stavových podmínek. Modelování fyzikálně-chemických vlastností může způsobovat při simulacích více problémů než modelování aparátů. Proto doporučujeme v případě pochybností konzultovat fyzikálního chemika. Podobně jako u jednotkových operací považujeme i u termodynamických modelů popis v uživatelských manuálech za nedostatečný.

Při praktickém řešení je výhodné nejprve ověřit fyzikálně-chemický model na jedné jednotkové operaci. Směsí složek podobných vlastností můžeme chápat jako jednu pseudosložku (např. ropné frakce). Simulační programy mají obvykle aparát pro definování jejich vlastností.

Např. plynárenství se považuje za oblast, kde lze s výhodou univerzální simulační programy používat, protože organické látky nedělají při výpočtech takové potíže jako silně polární a silně disociované sloučeniny. Přesto jsme při simulaci procesu na čištění generatorového plynu měli značné problémy (nemísitelné směsi, třífázové směsi apod.), které vedly ke špatné konvergenci některých modelů. Byly zřejmě způsobeny numerickými vlastnostmi použité stavové rovnice v extrémních stavových podmínkách. Proto je třeba mít dostatek informací o použitých modelech fyzikálně-chemických vlastností a mít možnost volit/zaměnit použitý model.

4.4. Vstupní data

Při modelování průmyslového zařízení bývá nepřijemným problémem získání dostatečného počtu údajů o aparátech a proudech. Obecně mohou být zdrojem potřebných dat měření v provozu, technologický reglement, technická (zejména výkresová) dokumentace a odborná literatura (encyklopedie, internet). V ideální situaci jsou známy parametry vstupních proudů a parametry aparátů a počítají se parametry výstupních proudů (základní simulační úloha – open simulation). Realita je však více či méně od tohoto ideálního stavu vzdálena.

To se nám potvrdilo např. v našem posledně řešeném případě simulace procesu na čištění generatorového plynu. Nepodařilo se např. zjistit počty teoretických pater v kolonách, proto jsme účinnost patra odhadli. Rovněž se nepodařilo zjistit údaje o vnitřních proudech systému, jejichž znalost jednak usnadňuje ladění modelu po částech, jednak umožňuje nastavit parametry modelů jednotlivých aparátů (např. právě počty teoretických pater). Vstupní a výstupní proudy ze systému jsou obvykle známy, přesto se v našem případě vyskytly určité

potiže, protože u méně významných proudů, jako byl v uvedeném případě benzin, je známa jen hodnota roční produkce a přepočít na hodinový průtok může být zatížen značnou chybou danou přesností údaje o fondu pracovní doby. Dalším problémem je používání průměrných údajů, zatímco skutečné hodnoty během roku významně kolísají. Uvedený provoz je instalován pod širým nebem a pracuje za nízkých teplot až $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, takže vliv klimatických podmínek na teploty je při nedokonalé izolaci evidentní. Obsah sulfanu, stejně jako spalné teplo plynu rovněž značně kolísají podle okamžité kvality, resp. simatosti těženého uhlí. Standardní problémy jsou s přesností provozních měření, popř. jejich rozsahem (např. analýza uhlovodíků v surovém plynu se provádí jen do C_4 , takže zbytek byl dopočten z produkce benzínu, resp. složky s obsahem pod 0,1 % jsme zanedbali). Chyba měření nemusí být způsobena měřicími přístroji, ale např. tím, že v relativně krátkých potrubích velkého průměru není plyn smíchaný za obchvatem výměníku dostatečně promíchán. Opakujícím se problémem při řešení simulačních úloh je vývoj technologie v čase, který není adekvátně podchycen v dostupné dokumentaci. Zejména výkresová dokumentace aparátů bývá historická, nehledě na korozi, zanášení aparátů apod.

4.5. Přizpůsobení modelu reálnému chování výroby

Při sestavování simulačního modelu přijímáme zjednodušující předpoklady (už kvůli tomu, aby model nebyl příliš složitý), resp. neznáme dostatečně některé mechanismy modelovaných dějů. Používané empirické korelace (např. pro výpočet součinitelů přestupu tepla) jsou zatíženy chybou. Z těchto a dalších důvodů výsledky výpočtů zcela neodpovídají skutečnému chování aparátů ve výrobě. Model obvykle neumožňuje zásah do programového kódu, ale jeho chování můžeme ovlivňovat nastavováním hodnot různých parametrů. Pro dosažení lepší shody je vhodnější používat nastavitelné parametry modelů odpovídající mechanismu modelovaného děje než umělé korekční koeficienty (nebo jak se říká Cimrmanovy konstanty). Např. při simulaci trubkového výměníku tepla nebudeme podle výsledků měření korigovat výstupní teplotu, ale upravíme faktor znečištění $1/\alpha_z$ v součiniteli přestupu tepla

$$\frac{1}{k} = \frac{d_2}{\alpha_1 d_1} + \frac{d_2}{2\lambda} \ln \frac{d_2}{d_1} + \frac{1}{\alpha_2} + \frac{1}{\alpha_z}$$

tak, abychom dosáhli shody v hodnotě výstupní teploty. Podobně při simulaci adiabatické vrstvy vanadového katalyzátoru na oxidaci SO_2 nebudeme podle změřené konverze oxidu siřičitého opravovat složení výstupního plynu, ale korigujeme frekvenční faktor v rychlostní konstantě opravným koeficientem Z

$$k = Z A e^{\frac{-E}{RT}}$$

tak, aby vypočtený stupeň přeměny na výstupu z vrstvy katalyzátoru, resp. adiabatický přírůstek teploty byl ve shodě se skutečností. Podobně u rektifikační kolony měníme počet teoretických pater nebo i refluxní poměr, který může zajistit

přijatelnou shodu výsledků s realitou, byť se bude lišit od původně zadané hodnoty.

4.6. Aktualizace simulačního modelu a jeho další využívání

Vzhledem k nákladům vynaloženým na vytvoření simulačního modelu je žádoucí, aby byl i po splnění stanovených cílů dále využíván. K tomu je třeba zajistit, aby dostatečně přesně zobrazoval skutečný stav výroby. Vzhledem k neustálým změnám v chemických výrobnách (dílní rekonstrukce, výměny aparátů, provozní vlivy jako je změna aktivity katalyzátorů, zanášení výměníků, koroze apod.) je proto nutné, aby byl model průběžně aktualizován a jeho aktuální stav dokumentován. Z organizačního hlediska je vhodné, aby pro údržbu a správu modelu byl určen jeden zodpovědný pracovník. Archivace standardní referenční verze a aktualizovaných verzí včetně dokumentace vyžaduje určitý řád, který nezdědka přispívá k úspěšnosti dalšího využívání modelu.

4.7. Další možnosti využívání simulačních programů

Simulační programy poskytují významné možnosti i v dalších oblastech chemie. Jedná se mj. o tyto oblasti:

Reálné chování tekutin – pomocí modelů proudů nebo např. některých modelů výměníků lze sledovat, jak se mění stavové vlastnosti dané směsi v závislosti na jejím stavu a složení a podle výběru stavové rovnice.

Termochemie – prakticky celou ji lze studovat pomocí modelu adiabatického stechiometrického reaktoru.

Fázové rovnováhy – modely rovnovážných destilací a některých výměníků jsou vhodné pro sledování dvofázových (kapalina–pára) nebo třífázových (kapalina–kapalina–pára) rovnováh reálných směsí tekutin v závislosti na vlastnostech vstupních proudů a parametrech modelu jednotkové operace. Pro systémy s více kapalnými fázemi je možno použít model rovnovážného reaktoru založený na minimalizaci celkové Gibbsovy energie systému.

Chemické rovnováhy – pro modelování chemických rovnováh v homogenních a vícefázových soustavách i je možno rovněž použít model rovnovážného reaktoru. Je možno nastavit množství vybraných sloučenin ve výstupních proudcích, inertní sloučeniny, teplotní rozsah pro celkovou rovnováhu systému nebo pro jednotlivé reakce a sledovat jejich vliv na složení a další vlastnosti výstupních proudů.

5. Závěr

Simulační programy se neustále zdokonalují. Běžně využívají uživatelské rozhraní MS Windows, zahrnují stacionární a dynamickou simulaci v jednom celku, rozšiřují se knihovny modelů (např. o aparáty na zpracování tuhé fáze) atd. Budoucnost mají komplexní systémy umožňující vývoj nového procesu, jeho návrh (projekci), simulaci, ekonomické zhodnocení a řízení procesu. I přes neustálé zdokonalování simulačních programů však zůstávají některé problémy s jejich využíváním stejné a je třeba jim věnovat pozornost, aby výsledky výpočtů byly hodnověrné a celá simulace byla ekonomicky efektivní. Snad k tomu přispěje i tato práce.

LITERATURA

1. Poživil J., Vaněk T., Bernauer B.: *Procesní systémové inženýrství*. VŠCHT, Praha 1998.
2. Hlaváček V., Václavěk V., Kubíček M.: *Bilanční a simulační výpočty složitých procesů chemické technologie*. Academia, Praha 1979.
3. Smith R.: *Chemical Process Design*. McGraw-Hill, New York 1995.
4. Čermák F., Michálek J., Poživil J.: Chem. Prum. 30/55, 451 (1980).
5. Čermák F., Michálek J., Poživil J.: *Racionalizace chemických výrob.* SNTL, Praha 1989.
6. Pazdera K., Poživil J.: *Simulation of Oxygen Plant with the Help of the Program ASPEN Plus, Proc. 31st Int. Conf. MOSIS '97, 28.–30.4.1997, Hradec nad Moravicí*, str. 153.
7. Poživil J.: Ropa Uhlie Plyn Petrochem. 42, 42 (2000).

J. Poživil (*Department of Informatics and Control Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Practical Experience with Simulation of Complex Chemical Continuous Processes**

The paper deals with simulations of steady-state continuous chemical processes. Currently, user-friendly universal simulation programs are available, which free the user from routine programming work and allow him/her to concentrate effort on creative work. Despite their seemingly easy use, maximum caution is to be maintained when dealing with industrial problems. Some problems associated with realization of simulation calculations including instruction for their solutions are described. The aim of this paper is to contribute to enhanced reliability of simulation calculations and to increase economic efficiency of simulations.

METODY HODNOCENÍ NÁHRAD KAKAOVÉHO MÁSLA PRO VÝROBU ČOKOLÁD

JANA ČOPIKOVÁ, HANA NOVÁKOVÁ, JAN TŮMA
a ANDREJ SINICA

Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: copikovj@vscht.cz

Došlo dne 1.VIII.2000

Klíčová slova: čokoláda, kakaové máslo, náhrady kakaového másla

Obsah

1. Legislativní požadavky kladené na čokoládu
2. Definice náhrad kakaového másla
3. Kvalitativní a kvantitativní stanovení náhrad
 - 3.1. Nukleární magnetická rezonance a skanovací diferenciální kalorimetrie
 - 3.2. Rentgenová difrakce
 - 3.3. Chromatografické metody
 - 3.4. Plynová chromatografie
 - 3.5. Kapalinová chromatografie
 - 3.6. Spektrální metody
4. Příklady
 - 4.1. Příprava vzorků
 - 4.2. Stanovení obsahu mastných kyselin
 - 4.3. Analýza kakaového másla a jeho náhrad pomocí FTIR spektroskopie
 - 4.4. Vyhodnocení postupu
5. Závěr

1. Legislativní požadavky kladené na čokoládu

Kakaové máslo tvoří podstatnou část čokolády, čokoládových polev a částečně i kakaového prášku. Čokoláda je potravinářský výrobek, který má po celém světě až na malé odchylky stejné složení. Téměř neexistují národní modifikace a tudíž hořká čokoláda, mléčná čokoláda, případně hořkomléčná a smetanová, jsou termíny známé zřejmě v každém jazyce.

Když byla v 70. letech vytvářena v Evropské unii potravinářská legislativa, potom první právní směrnice č. 73/241/EHS (cit. 1) byla vypracována a schválena právě pro čokoládu. Byly stanoveny minimální hodnoty kakaových součástí a maximální hodnoty sacharosy v hořké čokoládě a stejné parametry včetně mléčných součástí v mléčné čokoládě. Kakaovými součástmi se myslí tukuprostá kakaová sušina a kakaové máslo. V této směrnici se hovořilo o tom, že není povolen do čokolád přidávek rostlinných tuků jiných než kakaové máslo. Platnost směrnice v tomto bodě byla derogována na jednotlivé státy unie. Takže v těch zemích, kde náhrady kakaového másla v čokoládě byly povoleny (např. Velká Británie), se čokoláda

vyráběla podle stávajících receptur, ale nebylo možné tyto výrobky prodávat jako čokoládu do zemí, kde náhrady povoleny nebyly (např. Německo).

Od roku 1973, kdy směrnice č. 73/241/EHS vešla v platnost, byly vedeny odborné a právní diskuse o tom, zda přidávek dalších rostlinných tuků může nebo nemůže být povolen. Pro přidávek dalších rostlinných tuků hovořila skutečnost, že tyto tuky mohou vhodně ovlivňovat reologické chování a skladovatelnost čokoládových hmot a čokoládových výrobků. Proti přidávku dalších rostlinných tuků hovořila právníkova jednoznačnost stávající definice čokolády a obava, že povolení náhrad povede k dalšímu povolování náhrad.

Teprve 15. března 2000 ukončila Evropská unie tuto téměř třicetiletou debatu a povolila 5 % přidávku rostlinných tuků do čokolád. Státy Evropské unie jsou povinny do 36 měsíců toto rozhodnutí včlenit do současné potravinářské legislativy. Nicméně výrobce může sám rozhodnout zda bude přidávat náhradu kakaového másla. Informace o přidávku se musí objevit na obalu.

Český zákon o potravinách² se ve své vyhlášce 334, oddíl 5, §22 v mnohém připomíná EU směrnici. Jako u žádné další potravin, je v příloze č. 8 provedeno členění čokolád a čokoládových cukrovinek na druhy, skupiny a podskupiny a v příloze č. 9 jsou jednoznačně definovány minimální a maximální hodnoty složení jednotlivých typů čokolád a čokoládových polev.

V tabulce I jsou uvedeny základní analytické hodnoty vybraných typů čokolád a čokoládových polev. Čokoládami

Tabulka I

Vybrané chemické požadavky na jakost čokolád v hmotnostních % vztažených na sušinu²

Výrobek	Kakaové máslo ³ [%]	Kakaová sušina ³		Sacharosa včetně náhrad cukrů [%]
		tukuprostá ³ [%]	celková ³ [%]	
Čokoláda				
hořká	≥18	≥14	≥35	–
mléčná	–	≥2,5	≥25	≤55
bílá	≥18	≤0,5	≥18	≤55

Tabulka II

Příklad recepturního složení hořké, mléčné a bílé čokolády

Surovina	Čokoláda		
	hořká	mléčná	bílá
Kakaová hmota	46,7	11,8	–
Kakaové máslo	7,3	20,0	35
Sacharosa	45,5	43,1	40
Sušené mléko odtučněné	–	24,0	20
Lecitin	0,5	0,5	0,5

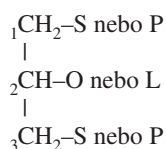
se rozumí hlavně tabulkové čokolády a čokoládovou polevou se rozumí hmota, ze které se vyrábí čokoládové cukrovinky formované (např. višně v čokoládě) a máčené (např. rumové pralinky). Složení čokolád a čokoládových polev se podstatně neliší.

V tabulce II je uvedeno recepturní složení tří typů čokolád. Z tabulky je zřejmé, že se do čokoládových hmot přidává kakaové máslo. Pražením, drcením, odstraněním rozdrčených slupek a mletím kakaové drti vzniká kakaová hmota, která neobsahuje kakaové slupky. Kakaová hmota je meziproduktem při výrobě čokolád nebo kakaového prášku a kakaového másla. Lisováním kakaové hmoty se získá kakaové máslo a kakaové pokrutiny, které se melou na kakaový prášek. Odlišované kakaové máslo se používá zejména do receptur čokolád. Poptávka po kakaovém máse je vyšší než celosvětová výroba, což je jeden z důvodů, proč se používají jeho náhrady. Náhradami, vyrobenými tzv. na míru, se dají ovlivňovat technologické vlastnosti čokolád a čokoládových polev. To znamená, že je možno ovlivňovat viskozitu hmot a odolnost vůči tukovému výkvětu. Důležitá je také otázka cen náhrad. Náhrady kakaového másla jsou obecně levnější ve srovnání s kakaovým máslem. Cena náhrady záleží na její surovině, typu náhrady a celkové hospodářské situaci ve světě.

2. Definice náhrad kakaového másla

Pokud se náhrady do čokolád a čokoládových polev přidávají, pak nastává otázka jejich stanovení. Náhrady kakaového másla je pestrá skupina tuků, která se vyrábí z různých olejnatých surovin. Společně mají náhrady to, že se musí co nejvíce blížit svým složením kakaovému máslu, aby byly zajištěny stejné fyzikální vlastnosti a tím i technologické chování.

I když se procentické zastoupení jednotlivých acylglycerolů liší podle původu kakaového másla, existuje určitá zákonitost v jeho struktuře. Pro triacylglycerolovou strukturu kakaového másla je charakteristické, že druhé postavení v triacylglycerolu je většinou obsazené nenasycenými mastnými kyselinami. Nasycené mastné kyseliny se většinou nacházejí v postavení 1 a 3. Složení triacylglycerolu je názorné z následujícího schématu



kde S je kyselina stearová, P je kyselina palmitová, O je kyselina olejová, L je kyselina linolová.

Kyseliny palmitová, stearová, olejová a linolová tvoří zhruba 95 % všech kyselin v kakaovém máse. V menším množství se vyskytují kyseliny myristová, linolenová, arachová a behenová. Průměrné složení triacylglycerolů v kakaovém máse je patrné z přehledu v tabulce III.

Kakaové máslo je polymorfní, tedy krystalizuje v mnohostěnech odlišného tvaru. V případě kakaového másla jsou jeho polymorfické vlastnosti dány polymorfickou povahou převládajících frakcí kakaového másla, tj. triacylglycerolů POP, POS a SOS. U kakaového másla je polyformismus způsoben různými možnostmi stočení a podélných uskupení řetězců mastných kyselin.

Tabulka III
Složení triacylglycerolů v kakaovém máse²¹

Počet uhlíků v triacylglycerolu	Obsah [%]	Triacylglycerol ^a
	0,3–0,5	PPP, POM
50	15,2–22,7	POP, PPS, MOS
52	45,4–47,1	POS, POO, PSS
54	28,0–38,0	SOS, SOO, POA, SSS, OOO
48	1,4–1,6	SOA, SSA
68	0,1–0,4	AOA

^aM – kyselina myristová (14:0), P – kyselina palmitová (16:0), S – kyselina stearová (18:0) A – kyselina arachidonová (20:0), O – kyselina olejová (18:1), linolová (18:2) nebo linolenová (18:3)

Tabulka IV
Přehled krystalických forem kakaového másla

Krystalická forma	Bod tání [°C]	Systematická nomenklatura	Krystalická struktura
I	17,3	β_3 (sub α)(γ)	–
II	23,3	α -2	hexagonální
III	25,5	β_2 -2	ortorombická
IV	27,5	β_1 -2	ortorombická
V	33,8	β_2 -3	triklinická
VI	36,2	β_1 -3	triklinická

Kakaové máslo krystalizuje v šesti krystalických formách, které bývají označovány římskými číslicemi I až VI nebo jako u ostatních triacylglycerolů řeckými písmeny (tab. IV). Označení řeckými písmeny se v jednotlivých publikacích mírně liší, poslední dvě formy bývají jednodušeji označovány jako β -V a β -VI. Z tabulky je patrné, že méně stabilní formy mají nižší bod tání. Nejkratší životnost má γ forma, která rychle přechází na α formu.

Proces krystalizace kakaového másla probíhá v několika stupních. Indukční perioda je následována nukleací a potom růstem krystalů a konečně dochází k vytvoření pevného stavu. Délka jednotlivých period velmi závisí na teplotě tekuté hmoty. Při temperaci čokoládových hmot, což je důležitý technologický krok při výrobě čokolády, probíhají všechny fáze postupné krystalizace kakaového másla. Právě technologicky správně vedená temperace, tj. nukleace a krystalizace kakaového másla v čokoládové hmotě, chlazení a potom skladování čokolád při teplotách kolem 18 °C zaručí dokonalý lesk čokolád. Stálá modifikace β -V vzniklá při temperaci pozvolna přechází na formu β -VI, což je dlouhodobý proces, ke kterému dochází při skladování hotového produktu. Dobře temperovaná čokoláda se pozná podle jemné, zcela homogenní struktury, podmiňující současně jemnou rozplývanou chuť, podle tvrdé konzistence, lasturovitého lomu a lesklého povrchu.

Tukový výkvět, což je šedavý povrch čokolád, je důkazem

špatné temperace, špatného skladování a případně i nevhodným mísením jiných tuků s kakaovým máslem.

Náhrady kakaového másla se rozdělují podle svých vlastností a možností použití do dvou hlavních skupin:

1) Smísením s kakaovým máslem vzniká soustava, kterou je nutné temperovat, nebo-li tuky svými chemicko-fyzikálními vlastnostmi co nejlépe kakaovému máslu (Equivalents CBE, případně Improvers CBI).

Tyto tuky lze mísit v libovolném poměru s kakaovým máslem, protože složením triacylglycerolů a mastných kyselin jsou velmi podobné kakaovému máslu a tudíž při tuhnutí poskytují stejné krystalické struktury.

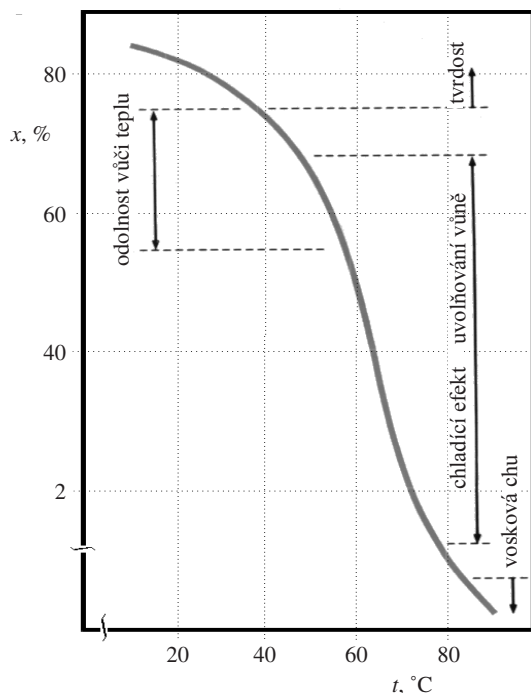
Tyto náhrady mohou tvořit 25 až 30 % tukové fáze čokoládové hmoty. Vyrábějí se nejčastěji frakcionací tuků obsahujících triacylglyceroly podobné kakaovému máslu. Jsou to rostlinné tuky z tropických rostlin, např. z ořechů Shea, Illipe a určité frakce palmového oleje.

Skupina Equivalents je na trhu uváděna jako tzv. tuky bez obsahu mastných kyselin se středně dlouhým uhlíkatým řetězcem, především kyseliny laurové (12:0).

2) Smísením s kakaovým máslem vzniká soustava, kterou není nutné temperovat, nebo-li tuky označované Replacers (CBR) a Substitutes (CBS).

Tyto tuky jsou částečně mísitelné až nemísitelné s kakaovým máslem. Ve směsi s nimi ztrácí kakaové máslo své charakteristické vlastnosti polymorfního tuku.

Skupina tuků označovaná Replacers neobsahuje kyselinu laurovou. Tyto tuky se částečně mísí s kakaovým máslem. Nevýhodou je někdy pomalejší tání v ústech vyvolávající voskovou chuť. Výrobky připravené z CBR mají dobrý lesk, lom, mechanickou odolnost a stabilitu proti oxidaci. Náhrady typu Replacer se vyrábějí hydrogenací, transesterifikací a frakcionací zejména sojového, řepkového, palmového nebo bavlníkového oleje.



Obr. 1. Křivka tuhnutí kakaového másla²⁰, x – krystalický podíl

Skupina tuků označovaná Substitutes obsahuje kyselinu laurovou a vyrábí se hydrogenací a frakcionací palmojadrového a kokosového oleje. Náhrady obsahující kyselinu laurovou se začaly používat díky dokonalé technologii při výrobě tuků, která zcela eliminuje aktivitu lipas. Přítomnost lipas totiž vede k uvolňování kyseliny laurové, což je příčina mýdlové chuti čokoládové polevy. Laurové tuky CBS mají ostrý bod tání (kolem 34 °C), rychlé tání a nízkou viskozitu v kapalném stavu. Takže jsou vhodné k výrobě čokoládových plev, např. na mražené výrobky.

Náhrady kakaového másla typu Replacers nebo Substitutes se liší svými chemicko-fyzikálními vlastnostmi od čistého kakaového másla. Liší se jejich chemické složení, UV spektra a hodnoty absorbance při 270 nm. Při technologii je třeba dbát jejich rozdílných bodů tání a tuhnutí, dilatačních, krystalizačních a reologických vlastností.

Náhrady kakaového másla, patřící do druhé skupiny, se používají zejména v recepturách čokoládových plev, které se vyrábějí z kakaového prášku. Průmyslový kakaový prášek obsahuje 10 až 12 % kakaového másla, což je hodnota obsahu kakaového másla, kdy ještě dochází k jeho mísení s náhradami Replacer a Substitute a nevznikají technologické potíže. Čokoládové polevy vyrobené z kakaového prášku jsou určeny především pro trvanlivé pečivo, cukrářské výrobky a mražené výrobky.

3. Kvalitativní a kvantitativní stanovení náhrad

U náhrad kakaového másla, jako u jiných tuků, se stanovují běžně

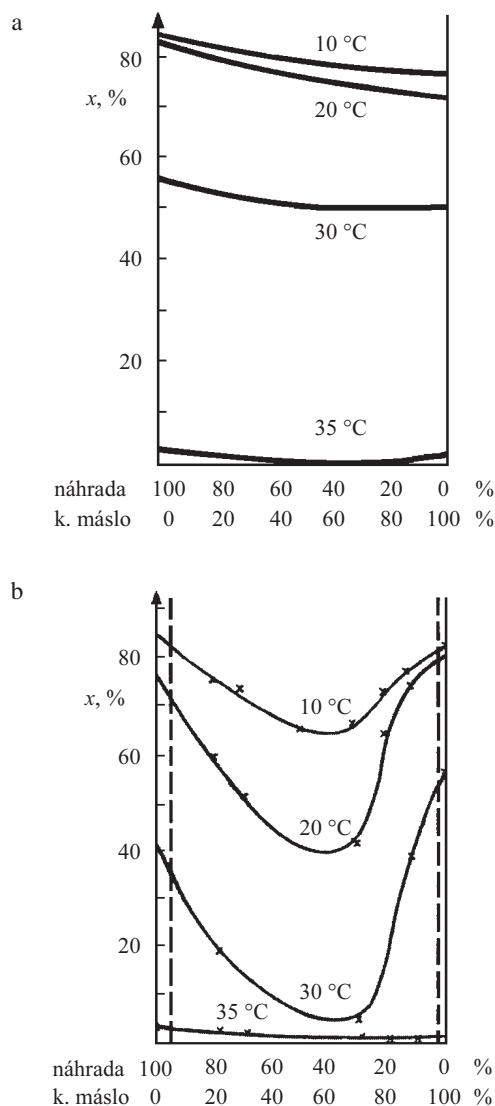
- číslo kyselosti,
- peroxidové číslo,
- jodové číslo,
- obsah volných mastných kyselin,
- křivky SFC (Solid Fat Content).

Uvedené běžné analytické hodnoty, s výjimkou křivek SFC, těžko mohou určit o jaký typ náhrady se jedná. V současné době však společnosti vyrábějící náhrady tuků vždy s průvodním listem dodávají požadovaná analytická data, ale také údaj, o jaký typ náhrady se jedná.

3.1. Nukleární magnetická rezonance a skanovací diferenciální kalorimetrie

Křivky SFC, tj. křivky tuhnutí jsou pro výrobce náhrad kakaového másla, ale především pro výrobce čokolád, velmi důležité. Křivky tuhnutí čistých tuků se většinou stanovují pomocí nukleární magnetické rezonance³ (NMR). K tomu účelu se používají širokopásmové přístroje, které měří rezonanci jader vodíkových atomů tuků v magnetickém poli a stanovují podíl vodíkových jader v tekuté a pevné fázi v závislosti na teplotě. Stejně křivky je možné určit pomocí diferenciální skanovací kalorimetrie⁴, avšak první způsob je běžnější. Na obr. 1 je typická SFC křivka kakaového másla. Náhrady kakaového másla musí mít takové chemické složení, aby se jejich křivka SFC se co nejvíce blížila křivce kakaového másla.

Dále jsou důležité křivky, které zachycují mísitelnost kakaového másla s jinými tuky, tak zvané iso-solid diagramy.



Obr. 2. Mísitelnost kakaového másla s náhradami ($x, \% =$ obsah krystalické složky); a – mísitelná náhrada, b – náhrada mísitelná jen při nízkém obsahu kakaového másla²¹

Tyto křivky znázorňují závislost obsahu pevné fáze ve směsi dvou tuků na teplotě a složení směsi (obr. 2).

Křivky SFC se používají k identifikaci kakaového másla, jeho náhrad a směsí kakaového másla s náhradami. Studují se možnosti mísení nových tuků a tudíž jejich technologické možnosti⁵⁻⁸. Tyto techniky však nebyly zatím použity k analýze tukové fáze čokoládových výrobků a tudíž k identifikaci, zda bylo nebo nebylo použito náhrady kakaového másla.

3.2. Rentgenová difrakce

Rentgenová difrakce je využívána ke studiu krystalických forem kakaového másla, náhrad a chemicky čistých triacylglycerolů⁹. Tato metoda ve spojení s metodami stanovujícími krystalický podíl má uplatnění při stanovení technologických

vlastností náhrad a jejich směsí s kakaovým máslem⁵. K identifikaci náhrad kakaového másla v čokoládách se doposud nevyužívá.

3.3. Chromatografické metody

Chromatografické metody mají při analýze kakaového másla a jeho náhrad řadu aplikací. Přehledem chromatografických a dalších metod se zabývá obsírný článek autorů Lippa a Anklama¹⁰. Uplatňují se jak plynová chromatografie triacylglycerolů a derivátů mastných kyselin, tak kapalinová chromatografie.

3.4. Plynová chromatografie

Velmi důležitou prací je studie Padleye a Timmse¹¹, kteří na náplňové koloně s fází 3 % OV1 separovali triacylglyceroly kakaového másla a jeho náhrad. Dokázali, že pro kakaová másla z různých pěstitelských oblastí existuje lineární závislost mezi obsahem triacylglycerolů s počtem uhlíků 50 (C_{50}) a počtem uhlíků 54 (C_{54}). Statisticky ověřili, že náhrady leží mimo interval spolehlivosti této závislosti. Podobné výsledky uveřejnily téměř o 20 let později autorky Minim a Cecchi¹², které separovaly triacylglyceroly na kapilární koloně 25 m dlouhé a smočené fází TAP-CB (Chrompack).

Další autoři, Simoneau, Hannaert a Anklam¹³, separovali triacylglyceroly na kapilární koloně 50 m dlouhé a smočené fází 5 % polymethylfenylsiloxanem. Korelovali obsah jednotlivých triacylglycerolů navzájem a získali statisticky významné závislosti pro kakaové máslo, přičemž náhrady ležely opět mimo intervaly spolehlivosti.

Problém zůstává v tom, že uvedené metody jsou ověřeny na modelových systémech. U reálných vzorků, to znamená tukové složky izolované z čokolády, je možné pouze prokázat přidavek a typ náhrady, ale není možné určit konkrétní náhradu a s dostatečnou přesností obsah náhrady.

3.5. Kapalinová chromatografie

V posledních deseti letech se kapalinová chromatografie k analýze kakaového másla a jeho náhrad téměř nevyužívá. Práce pocházející z 80. let většinou studují možnosti kapalinové chromatografie při stanovení složení jedlých tuků a nejsou přímo založeny pouze na analýze kakaového másla a jeho náhrad. Avšak v roce 1991 uveřejnil Hernández a spol.¹⁴ práci, ve které pomocí kapalinové chromatografie s mobilní fází propionitrilem stanovil obsah hlavních triacylglycerolů v kakaovém másle v kakaových bobech z různých pěstitelských oblastí ve světě. Na základě těchto výsledků bylo možné kakaové boby zařadit do skupin, které odpovídaly pěstitelských oblastem kakaovníku.

3.6. Spektrální metody

Anklam a spol.¹⁵ se pokusili rozlišit kakaová másla a další rostlinné tuky po jejich pyrolyze hmotnostní spektroskopii. Hmotnostní spektra byla vyhodnocena pomocí neuronových sítí a podařilo se odlišit kakaové máslo od ostatních rostlinných tuků. Tuto techniku není však možné použít samostatně k určení náhrady v čokoládovém výrobku. Blízká infračervená spektroskopie se spíše používá ke sledování určitých techno-

logických kroků, jako je např. temperace¹⁶. FTIR spektroskopie zase nachází uplatnění při strukturální analýze triacylglycerolů ve spojení s jejich krystalickými formami¹⁷.

Kakaové máslo má přirozeně velmi nízký obsah mastných kyselin s *trans*-vazbami, které mají svoji odezvu v infračerveném spektru. V této práci se pokusíme na základě interpretace infračervených spekter identifikovat náhrady typu ekvivalent v modelové směsi s kakaovým máslem. K tomu účelu byly připraveny modelové směsi kakaového másla izolovaného z kakaových bobů z Pobřeží slonoviny s náhradami, které se v recepturách čokolád nebo čokoládových plev používají. Z obrázků 3 a 4 je zřejmé, jak dalece se liší obsah mastných kyselin v kakaovém másle ze tří světových pěstitelských oblastí (1. Afrika, 2. Severní, Střední a Jižní Amerika, 3. Asie a Oceánie) a v jednotlivých náhradách. Vzhledem k tomu, že Pobřeží slonoviny je největším producentem kakaových bobů na světě (42,5 % světové produkce v sezóně 1997/98) (cit.²²), bylo kakaové máslo izolované z kakaových bobů z Pobřeží slonoviny použito jako standard k identifikaci náhrad kakaového másla pomocí blízké infračervené spektroskopie. K přípravě modelových směsí náhrad s kakaovým máslem z Pobřeží slonoviny byly použity tuky, které se jako ekvivalenty běžně používají.

4. Příklady

4.1. Příprava vzorků

Modelové směsi byly připraveny roztavením a homogenizací náhrad typu Equivalent a kakaového másla. Obsah náhrady ve směsi byl 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 a 100 %. a náhrady jsou označeny písmeny A, B, C, D a E (výrobci – Aarhus Oliefabrik, Karlshamn a Vamo Fuji).

Ze tří komerčních vzorků zakoupených v obchodní síti s hořkou čokoládovou polevou byl tuk z polevy izolován extrakcí petroletherem¹⁸.

Vzorek: 1 – Ledové kaštiny, tyčinka Nestlé Čokoládovny a.s.
2 – Pomy, pektinové želé s chutí pomeranče máčené v hořké čokoládě, tyčinka Nestlé Čokoládovny a.s.
3 – Rumby – máčené cukrovinky s rumovou příchutí, Jacobs Suchard Figaro.

4.2. Stanovení obsahu mastných kyselin

Obsah mastných kyselin v vzorcích kakaového másla a jeho náhrad byl stanoven po hydrolýze tuku¹⁸ a methylací¹⁹ na plynovém chromatografu GC 6890, Hewlett Packard s FID za těchto podmínek:

Kapilární kolona: HP – INNOWax, HP 19091a – 213, polyethylen glykol, Hewlett Packard délka 30,0 m, vnitřní průměr 320,0 μm , tloušťka filmu 0,50 μm

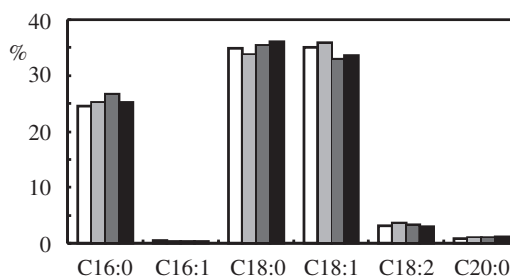
Teplotní program: počáteční teplota 120 °C, nárůst teploty 10 °C.min⁻¹, konečná teplota 240 °C

Nosný plyn: atestovaný dusík, průtok N₂ 0,7 ml.min⁻¹

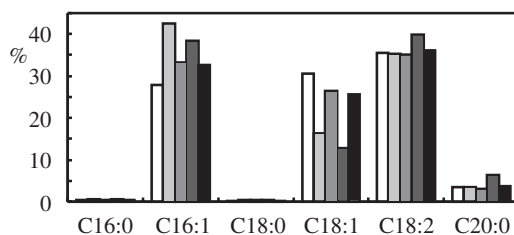
Nástřík: teplota 220 °C, split 1:30, automatický dávkovač, nástřík 1 μl

Detektor: teplota 280 °C, průtok vodíku 30,0 ml.min⁻¹, průtok vzduchu 400,0 ml.min⁻¹, makeup (dusík) 25,0 ml.min⁻¹

Obsah mastných kyselin se vyjadřuje jako poměr plochy píku dané mastné kyseliny k celkové ploše všech píků v (%).



Obr. 3. Obsah (%) vybraných mastných kyselin v kakaovém másle z různých pěstitelských zemí; □ Ghana, ▨ Equador, ▩ P. slonoviny, ■ Indonésie



Obr. 4. Obsah (%) mastných kyselin v náhradách (Equivalents) kakaového másla; □ náhrada A, ▨ B, ▩ C, ■ D, ■ E

4.3. Analýza kakaového másla a jeho náhrad pomocí FTIR spektroskopie

Pro měření ve střední infračervené oblasti byly tuky a jejich směsi zahřáty nad 60 °C, aby došlo k roztavení všech triacylglycerolů, a řádně zhomogenizovány. Takto připravený vzorek se nanášel přímo na ATR krystal.

Infračervená spektra byla zaznamenána pomocí FTIR spektrometru NICOLET 740 s detektorem TGS a děličem paprsku KBr, apodizace: Happ – Genzel

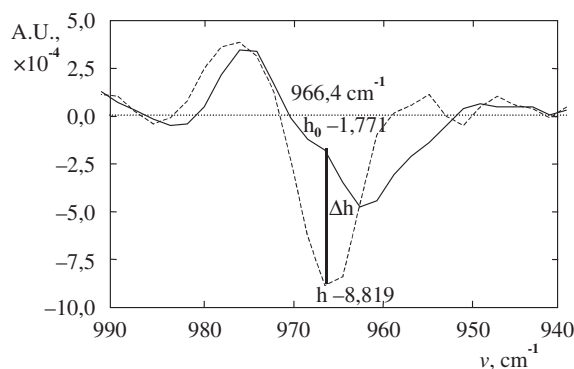
Pro směsi náhrad s kakaovým máslem byl použit nástavec pro horizontální ATR s krystalem ze ZnSe. Úhel mezi paprskem a povrchem krystalu byl 45°. Krystal spektrometru byl ofukován, aby se snížily vlivy atmosférického oxidu uhličitého a vodní páry.

Bylo měřeno absorbanční spektrum vzorku ve spektrálním rozsahu 4000 cm⁻¹–600 cm⁻¹ při rozlišení 4 cm⁻¹. Počet akumulací 256.

Spektrometr NICOLET 740 je vybaven softwarem Omnic 4,0, spektra a jejich druhé derivace však byly zpracovány programem Origin 6.

4.4. Vyhodnocení postupu

Analýzou infračervených spekter kakaového másla z Pobřeží slonoviny a všech pěti náhrad bylo zjištěno, že největší rozdíl se nachází u vlnočtu 966,4 cm⁻¹, tj. v oblasti, kde absorbují dvojné *trans*-vazby. Vyhodnocení se zakládalo na tom, že byly porovnány vzdálenosti (Δh) na tomto vlnočtu mezi spektrem kakaového másla (obr. 5) a spektrem modelových směsí. Obsah náhrady ve směsi byl 5 až 100 %, spektra směsí s nižším obsahem náhrad nemohla být v důsledku velkého šumu použita.



Obr. 5. Výřez druhé derivace spektra kakaového másla (—) a náhrady B (---)

Tabulka V
Parametry kalibračních přímk

Typ náhrady	Max Δh	Směrnice přímk k	Korelační koeficient R
A	5,14	0,054±0,004	0,993
B	7,048	0,072±0,002	0,999
C	1,988	0,021±0,004	0,967
D	2,625	0,029±0,006	0,955
E	1,106	0,024±0,008	0,935

Tabulka VI
Výpočet přírůvku náhrad typu Equivalent u tří vzorků hořkých polev

Vzorek	Δh	Obsah CBE [%]				
		A	B	C	D	E
1	8,436	–	–	–	–	–
2	1,424	26,17	19,87	67,36	48,40	58,96
3	10,029	–	–	–	–	–

Závislost mezi obsahem jednotlivé náhrady ve směsi c (%) a vzdáleností Δh (AU) na spektru byla vyhodnocena lineární regresí a vypočtené parametry kalibračních přímk jsou shrnuty v tabulce V.

$$\Delta h = k \cdot c$$

kde k je směrnice přímk.

Nejlepších statistických výsledků pro kalibraci bylo dosaženo u náhrady B (obr. 5, tabulka V.). Korelační koeficient R byl roven 0,999, což ukazuje na významnou funkční závislost Δh na obsahu náhrady kakaového másla ve směsi. Tyto statisticky významné parametry kalibrační křivky jsou dány poměrně velkou odlišností složení náhrady B od kakaového másla (viz obr. 3 a 4).

Z druhých derivací spekter tukového podílu vyextrahova-

ného z čokoládových polev tří komerčních výrobků 1, 2 a 3 byly opět v oblasti vlnočtu $966,4 \text{ cm}^{-1}$ odečteny vzdálenosti od spektra kakaového másla. Infračervená spektra byla použita k identifikaci *trans*-vazeb a zjištění Δh . Kalibrační přímk v tabulce V sloužily k výpočtu obsahu náhrady kakaového másla.

Čokoládové hmoty nebo polevy mohou obsahovat až 34 až 40 % tuku, potom náhrada typu Equivalent, která se přidává do receptury do 5 %, může tvořit 12 až 15 % tuku.

Hodnoty Δh u vzorků 1 a 3 byly mimo rozsah kalibračních hodnot a pouze u vzorku 2 a náhrady B zjištěný obsah se blíží předpokládané hodnotě (tab. VI). Tato skutečnost je zřejmě způsobena hlavně tím, že vzorky 1 a 2 obsahovaly tukovou náplň, která se vyrábí z náplňových tuků a ty mohou obsahovat více nenasycených *trans*-vazeb. Čokoládová poleva může být pak do určité míry náplňovými tuky kontaminována. Dále při výrobě čokoládových polev na vybraných vzorcích mohly být použity jiné tuky typu Equivalent než ty, které byly ověřovány. Nicméně je možné použít naměřená infračervená spektra k důkazu, že bylo použito náhrad kakaového másla.

5. Závěr

Článek byl napsán s úmyslem přispět do širší diskuse o náhradách tuků a cukrů v potravinách. Tuky a cukry jsou nahrazovány v potravinách z různých důvodů, zdravotních, energetických, ekonomických a technologických. Čokolády, jako legislativní pojem, patřily mezi výjimečné potraviny, kdy se tradičně nepoužívaly žádné náhrady. V současné době, když je povolen přírůvek náhrad kakaového másla typu Equivalent do 5 % v čokoládě, je důležité najít metodu, která by tento přírůvek identifikovala i kvantitativně stanovila. Vzhledem k tomu, že kakaovník se pěstuje v různých oblastech Země, nemá kakaové máslo stejné složení. Navíc světových výrobců náhrad typu Equivalent je také řada a náhrady se svým složením také mírně liší. Tudíž je tento analytický problém složitý a doposud se zejména chromatografickými metodami podařilo vypracovat postupy, které umožní identifikovat náhradu a zařadit ji do určité skupiny náhrad (Equivalent, Replacer a Substitute). Tyto postupy jsou doposud ověřeny především na modelových směsích a stanovit skutečný obsah náhrady se zatím nepodařilo stanovit. S tímto zjištěním jsou v souladu naše částečné výsledky, kdy se pomocí střední infračervené spektroskopie podařilo náhradu kakaového másla prokázat, avšak nepodařilo se ji kvantitativně stanovit.

LITERATURA

- 73/241/EEC: Council Directive of 24th July 1973 on the approximation of the laws of the Member States relating to cocoa and chocolate products intended for human consumption.
- Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a prováděcí vyhlášky.
- ČSN ISO 8292: živočišné a rostlinné tuky a oleje. Stanovení obsahu tuhých podílů – metoda pulsní nukleární magnetické rezonance.
- Lambelet P.: Lebensm. Wissen. Techn. 16, 200 (1983).
- Sabariah S., Ali-ARM, Chog C. L.: Int. J. Food Sci. Nutr. 49, 211 (1998).
- Sessa D. J.: Int. Sci. Food Agri. 72, 295 (1996).

7. Cebula D. J., Smith K. W.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 992 (1992).
8. Shukla V. K. S.: *Food Technol.* 8, 152 (1997).
9. Malssen K. van, Peschar R., Brito C., Schenk H.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1225 (1996).
10. Lipp A., Anklam E.: *Food Chem.* 62, 99 (1998).
11. Padley F. B., Timms R. E.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 286 (1980).
12. Minim V. P. R., Cecchi H. M.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 22, 305 (1999).
13. Simoneau C., Hannaert P., Anklam E.: *Food Chem.* 65, 11 (1999).
14. Hernández B., Castellote A. I., Permanyer J. J.: *Food Chem.* 41, 269 (1991).
15. Anklam E., Bassani M.-R., Eiberger T., Kriebel S., Lipp M., Matissek R.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 357, 981 (1997).
16. Bollinger S., Zeng Y., Windhab E. J.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 659 (1999).
17. Yano J., Sato K.: *Food Res. Int.* 32, 249 (1999).
18. ČSN 56 0146, část 4.
19. ČSN ISO 5509.
20. Loders Crocklaan B.V. (Nizozemí, zastoupení Kuk Bohemia s.r.o. ČR): Informační materiály společnosti.
21. Karlshamns Sweden AB, Karlshamns ČR: Informační materiály společnosti.
22. <http://www.icco.org/anrep/anrep97-98english.pdf>

J. Čopíková, H. Nováková, J. Tůma, and A. Sinica
(*Department of Chemistry and Technology of Saccharides, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Methods of Evaluation of Cocoa Butter Substitutes for Chocolate Production**

Development of legislation concerning chocolate in the European Union and Czech Republic is summarized.

The discussion concerns in particular authorization of substitution of cocoa butter in chocolate. Composition and physicochemical properties of cocoa butter and requirements for substitutes of the Equivalent type (substitutes completely miscible with cocoa butter) are described. The methods studied with the goal of determination of the cocoa butter substitute content in chocolate are characterized. For identification and determination of substitutes completely miscible with cocoa butter in chocolate icings, near-infrared absorption at 966.4 cm^{-1} (trans bonds) was used.

INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINAS

VLADIMÍR KRYŠTOF a MIROSLAV STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, e-mail: krystof@aix.upol.cz

Došlo dne 1.VIII.2000

Klíčová slova: cyklin-dependentní kinasa, inhibitor, buněčný cyklus, antimitotický účinek

Obsah

1. Úvod
2. Regulace buněčného cyklu a CDK
3. Chemické inhibitory CDK
 - 3.1. Butyrolakton
 - 3.2. Flavonoidy
 - 3.3. Trisubstituované puriny
 - 3.4. Paullony
 - 3.5. Indigoidní látky
 - 3.6. Ostatní způsoby blokování aktivity CDK
4. Závěr

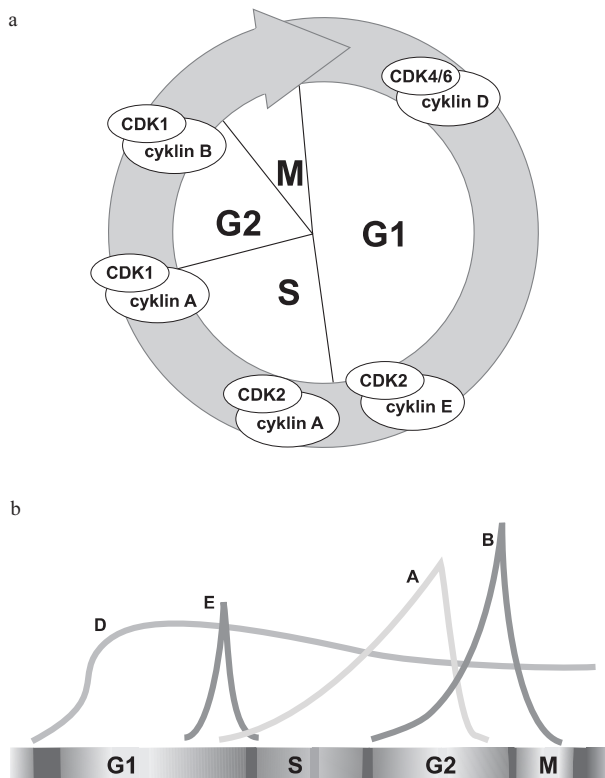
1. Úvod

Fosforylace proteinů představuje jeden z nejčastěji využívaných regulačních mechanismů, kterými buňka disponuje. Docela malá změna hmotnosti proteinu vede k radikálním změnám konformace, jež mají za následek aktivaci nebo deaktivaci enzymů, receptorů, regulačních proteinů apod. Na fosforylaci je založeno také řízení buněčného cyklu, v němž hlavní slovo mají cyklin-dependentní kinasy (CDK). Díky svým častým poruchám v řadě nádorů se staly slibným cílem vývoje specifických inhibitorů. Prakticky zároveň s objevem přirozených proteinových inhibitorů regulujících aktivitu cyklin-dependentních kinas (CKI) v buňkách započalo hledání inhibitorů chemických. Na počátku této éry byl nalezen i purinový derivát olomoucín, rychle následován dalšími inhibitory. Od té doby jejich počet několikanásobně vzrostl. Je to zcela přirozené, uvědomíme-li si úzkou souvislost genetických změn cyklin-dependentních kinas a jejich regulátorů se vznikem nádorů, přímou interakci s onkogeny a nádorovými supresory a jejich stěžejní funkci v řízení buněčného cyklu. Tyto souvislosti evidentně vybízejí k vývoji nové generace chemoterapeutik odvozených od inhibitorů CDK, které blokují progresi buněčného cyklu, indukují apoptózu a vykazují silné protinádorové účinky nejen na buněčných liniích, ale též *in vivo*.

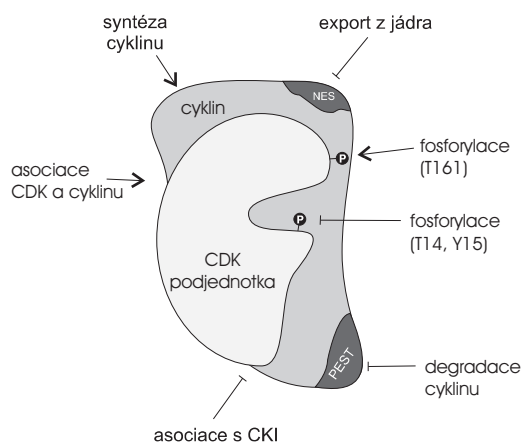
2. Regulace buněčného cyklu a CDK

Buněčný cyklus, sled dějů zajišťující duplikaci DNA mateřské buňky a její rozdělení mezi buňky dceřinné, řídí ve všech eukaryontních organismech enzymy ze skupiny CDK. Objev cyklin-dependentních kinas před více než deseti lety započal novou éru nahlížení na kontrolu buněčné proliferace i na proliferaci samotnou. Spouštění jednotlivých fází bylo shledáno závislým na aktivitě CDK, což umožnilo vytvořit první jednoduchý model kontroly buněčného cyklu¹ (obr. 1). Holoenzym CDK se skládá z proteinu s katalytickou funkcí (proteinkinasa) a pozitivního regulátoru (cyklin). Asociace cyklinu s CDK podjednotkou dává vzniknout aktivnímu komplexu, řídícímu určitou fázi cyklu. Odtud také pochází název cyklinu, jenž odráží jeho přechodnou přítomnost v buňce. Kompletní CDK pak katalyzují přenos fosfátové skupiny z ATP na serinový nebo threoninový zbytek v polypeptidovém řetězci určité sekvence. Aktivita CDK kriticky závisí na vazbě s cyklinem, přičemž některé CDK mohou poutat více typů cyklinů a fosforylovat různé substráty. Těmi bývají transkripční faktory, proteiny cytoskeletu, proteiny biosyntézy purinů a jaderné membrány aj.

Regulace aktivity CDK se však neomezuje pouze na asociaci a disociaci komplexu CDK a expresi cyklinu. Zahrnuje



Obr. 1. Aktivita cyklin-dependentních kinas během buněčného cyklu (a) a fluktuace koncentrace cyklinů regulujících aktivitu CDK (b)



Obr. 2. **Způsoby regulace aktivity CDK:** ↓ značí aktivaci, ⊥ inhibici aktivity, NES – sekvence pro export z jádra, PEST – sekvence proteolýzy cyklinu

také aktivující fosforylaci threoninového zbytku² (odkrytí aktivního místa), deaktivující fosforylaci threoninu a tyrosinu přímo ve vazebném místě pro ATP³ (bránění vstupu ATP do vazebného místa), vazbu přirozeného proteinového inhibitoru⁴, degradaci cyklinu po označení ubiquitinem⁵, intracelulární translokaci⁶ a asociaci se subcelulárními strukturami (obr. 2).

Úkol buněčného cyklu spočívá ve vytvoření přesné kopie DNA a následném rozdělení buňky do dvou. Precizní průběh cyklu regulují cyklin-dependentní kinas. Pokud zpětnovazební kontrolní mechanismy zjistí poškození DNA, zablokují aktivitu CDK prostřednictvím přirozených inhibitorů a buněčný cyklus se zastaví (např. radiční záření indukuje expresi nádorového supresoru p53, který zároveň funguje jako transkripční faktor přirozeného CKI p21^{Cip1/Waf1}). V následující pauze dochází k opravám, tak aby do dalších generací vstupoval genetický materiál pokud možno totožný. Poruchy těchto kontrolních a řídicích mechanismů vedou k maligní transformaci tkání; do další generace vstupují již buňky s mutovanou DNA, které se množí bez regulace. Mutace vedoucí k nekontrolovanému dělení buněk byly prokázány v genech cyklin- dependentních kinas⁷, cyklinů⁸, aktivujících fosfatase cdc25 (cit.⁹), nádorových supresorů pRb a p53 (cit.^{10,11})

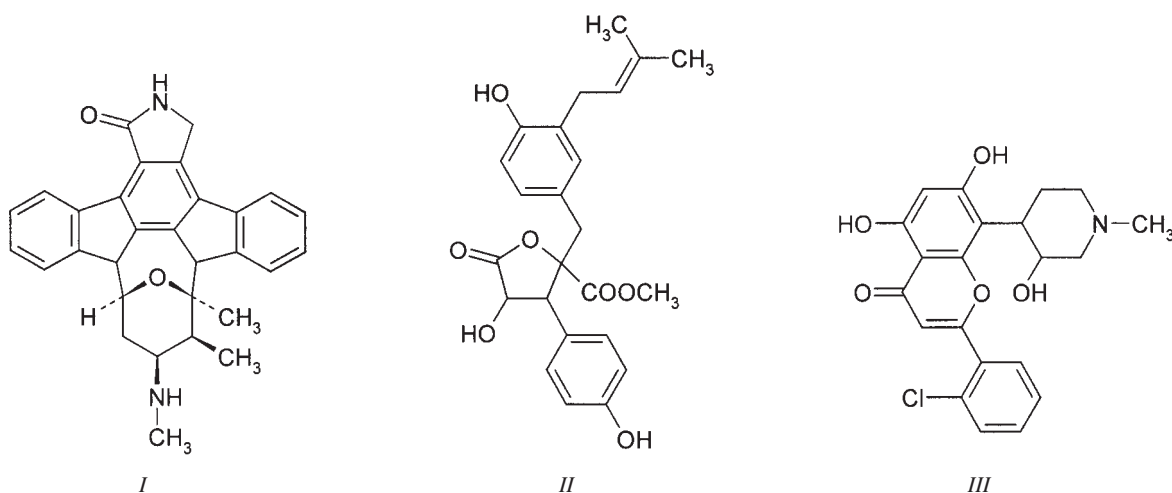
a přirozených inhibitorů cyklin-dependentních kinas (např. p16^{INK4a}, cit.¹²).

3. Chemické inhibitory CDK

Chemické inhibitory CDK mohou působit řadou rozdílných mechanismů. Teoreticky lze připravit malé molekuly, které kompetují s ATP o vazebné místo, interagují s fosforylovaným zbytkem threoninu v T-kličece, ovlivňují vznik a disociaci komplexu CDK / cyklin nebo vazbu nízkomolekulárních proteinových podjednotek, blokují funkci aktivující fosfatasy cdc25, narušují intracelulární lokalizaci CDK, mimikují přirozené proteinové inhibitory nebo vyvolávají proteolýzu cyklinů¹³. Zatím jsou k dispozici pouze látky ovlivňující vazbu ATP (kompetitivní i nekompetitivní inhibitory) a inhibitory cdc25.

Pokud je odhalena nová látka s inhibičním účinkem, studuje se nejprve molekulární mechanismus jejího efektu klasickou enzymologickou analýzou a dále také rentgenostrukturní analýzou společného krystalu CDK a inhibitoru. Odhalená struktura kokystalu umožňuje efektivnější a cílenější navrhování derivátů lépe zapadajících do aktivního místa a pevněji interagujících s proteinem na více místech. Mimo ATP byly získány a analyzovány kokrystaly CDK2 s celou řadou kompetitivních inhibitorů^{14–19}. Všechny doposud popsané látky jsou lokalizovány ve vazebném místě pro ATP, které tímto prokazuje svou schopnost pojmout i značně odlišné molekuly. Další krystalografické práce již rozebírají vazebné aspekty v ternárních komplexech CDK-cyklin-ATP a CDK-cyklin-CKI (cit.²⁰). Výsledky jasně prokazují změnu konformace aktivního místa CDK po navázání cyklinu, které je tedy nutno také uvažovat. Efektivním nástrojem pro syntézu nových derivátů se nepochybně stává i počítačové modelování interakcí inhibitoru a CDK (cit.^{21,22}).

Hledání chemických inhibitorů CDK začalo prakticky těsně po objevu přirozených CKI a objasnění úlohy, kterou v regulaci buněčného cyklu zastávají. Záhy byly známy nespecifické inhibitory jako je 6-dimethylaminopurin²³, 6-(Δ^2 -isopentenyl)aminopurin²³, staurosporin (*I*) a 7-hydroxystaurosporin²³ (produkty plísni rodu *Streptomyces*), nebo suramin²⁴ – přirozený glykosaminoglykan používaný jako antihelmintikum, antiprozoikum a později též jako inhibitor topoisome-



rasy II a cytotstatikum. Nízkou selektivitou vůči enzymům skupiny kinasy je charakteristický též další inhibitor topoisomerasy II, 9-hydroxyellipticin²⁵, derivát alkaloidu z rostlin rodu *Ochrosia*. Jejich použití při studiu buněčného cyklu silně omezuje právě nízká selektivita, avšak není vyloučeno, že se některý z nich posléze stane výchozím členem nové skupiny s užším spektrem účinku. Ěru specifických inhibitorů CDK započal objev butyrolaktonu a olomoucínu. Od této doby byla identifikována řada dalších skupin látek s vysokou specifitou pro kinasy homologní s CDK1. Popis jednotlivých skupin je uveden níže a jejich inhibiční účinky na CDK shrnuje tab. I. Všimněte si, že se mezi nimi nevyskytuje specifický inhibitor CDK4.

Tabulka I

Inhibice cyklin-dependentních kinas různými sloučeninami. Hodnota IC₅₀ představuje 50 % inhibici enzymu

	Sloučenina	IC ₅₀ /μM		
		CDK1	CDK2	CDK4
I	Staurosporin	0,003	0,007	>1000
II	Butyrolakton-I	0,6	1,5	>1000
III	Flavopiridol	0,3	0,4	0,4
IV	epigalokatechin galát	>10	>10	0,3
	6-Benzylaminopurin	200	–	–
V	Olomoucín	7	7	>1000
VI	Roskovitin	0,65	0,7	>100
VII	Purvalanol A	0,004	0,035	0,85
VIII	Kenpaullon	0,4	0,7	>100
IX	Alsterpaullon	0,035	–	>100
X	Indirubin	10	2,2	12
XI	Indirubin-5-sulfonová kyselina	0,055	0,035	0,3
	6-(2,3-Dichlorfenylamino)-7-chlor-5,8-chinolindion	–	5	>50
	5-Fenylamino-2-methyl-4,7-dioxobenzothiazol	–	6	>200

3.1. Butyrolakton

Butyrolakton-I (II) byl izolován z plísně *Aspergillus* při screeningu produktů kultur různých mikroorganismů²⁶. Fun-

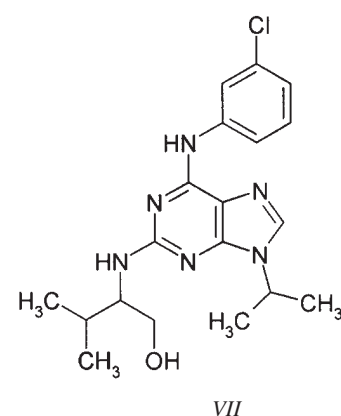
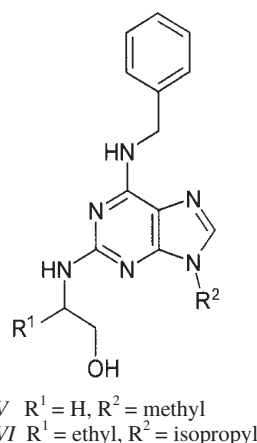
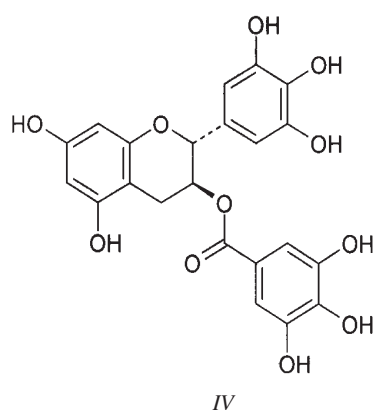
guje jako kompetitivní inhibitor CDK1 vzhledem k ATP, ostatní kinasy včetně CDK4 neblokuje. Jeho efekt byl potvrzen i na buněčných systémech²⁷, které blokuje na rozhraní G1/S i G2/M. Prozatím nebyla jeho molekula nijak modifikována, čímž se stává atraktivním prototypem celé skupiny inhibitorů.

3.2. Flavonoidy

Flavonové látky jsou již delší dobu známy jako inhibitory různých kinas a mnoho z nich také způsobuje změny v buněčném cyklu a růstu. Nejúčinnějšími inhibitory CDK z této skupiny jsou flavopiridol (III) a deschlorflavopiridol²⁸, odvozené od látek nalezených v indické rostlině *Disoxylum bincetiferum*. Jedná se o sloučeniny strukturně příbuzné flavonům quercetinu a genisteinu, které ale mají asi 250× slabší inhibiční účinek na CDK. Flavopiridol nejvýrazněji blokuje CDK1; později byl zjištěn obdobný vliv na CDK2 a také na CDK4. Funguje jako kompetitivní inhibitor vzhledem k ATP, což následně potvrdila rentgenostrukturní analýza kokryystalu CDK2 s deschlorflavopiridolem¹⁵. Benzopyranový skelet zaujímá podobné místo jako purin ATP a piperidinový zbytek se nachází v místě, kam se za normálních podmínek váže α-fosfát ATP. Fenyl, podobně jako je tomu u purinových inhibitorů, interaguje mimo aktivní místo. Pro srovnání byla vyřešena také krystalová struktura CDK2 s dalším flavonem myrrecetinem, který je proti flavopiridolu asi 500× slabším inhibitorem, ale reprezentuje podobnou strukturu. Do aktivního místa se váže obráceně, tedy velmi podobně jako purinové deriváty.

Cytotoxické účinky flavopiridolu byly úspěšně testovány na mnoha nádorových liniích a je nutné podotknout, že se stal prvním chemickým inhibitorem CDK, zařazeným do klinických zkoušek, i když dnes už ne jediným. Pro své nežádoucí vedlejší účinky však byly klinické studie zastaveny.

Pozoruhodná je také další flavonová sloučenina, obsažená v zeleném čaji, epigalokatechin galát (IV). CDK4 blokuje v submikromolární koncentraci a na aktivitu ostatních kinas včetně CDK1 a CDK2 má vliv mnohem menší²⁹. V buněčné kultuře vystavené působení epigalokatechin galátu vzrostla hladina p53 a následně *de novo* exprimovaných přírodních inhibitorů rodin KIP/CIP (cit.³⁰). Testován byl také na nádorech transplantovaných myším a vedl k jejich rapidnímu zmenšení a remisi³¹.



3.3. Trisubstituované puriny

Jako slabé a málo specifické inhibitory kinas byly známy různé deriváty purinu (viz výše). Prvním purinovým derivátem specificky inhibujícím CDK1 a CDK2 se stal olomoucín (V, cit.³²). Jedná se o látku strukturně odvozenou od rostlinných hormonů cytokininů, původně syntetizovanou jako inhibitor rostlinných glukosyltransferas³³. Její schopnost blokovat funkci CDK1 byla objevena při testování dlouhé řady různě substituovaných purinů. Mezi všemi testovanými látkami vykazovaly nejvyšší účinnost zejména C2, C6, N9-trisubstituované puriny.

Kinetická analýza prokázala, že inhibice CDK1 olomoucínem je kompetitivní vzhledem k ATP a nekompetitivní vůči histonu, který je při testech používán jako substrát. Brzy to potvrdila i rentgenová analýza kokryystalu CDK2 s olomoucínem¹⁴. Purinový skelet sice vstupuje přímo do vazebného místa pro ATP, ale vzhledem k purinové části ATP zaujímá obrácenou polohu: C2 substituent obsazuje místo zachycující ribosu ATP a 6-benzylaminoskupina zůstává podobně jako u flavopiridolu mimo vazebné místo. Studium kokryystalů také vysvětlilo specifitu purinových inhibitorů, přestože vazebné místo pro ATP zůstává v řadě kinas různých skupin značně konzervativní. Právě 6-benzylaminoskupina interaguje s oblastmi, které do styku s ATP vůbec nepřicházejí, a jejich aminokyselinové zbytky jsou charakteristické pouze pro cyklin-dependentní kinasy.

Díky pozornosti, kterou purinové inhibitory záhy po svém objevu přitáhly, se stal olomoucín výchozím členem pro detailnější studium struktury a aktivity purinů blokujících buněčný cyklus. Brzy byly obměnami jeho struktury získány účinnější sloučeniny, např. bohemín a roskovitín (VI, cit.¹⁶), CVT-313 (cit.³⁴), a další, strukturou i aktivitou velmi podobné^{35–38}. Mezi nejsilnější patří derivát pojmenovaný purvalanol A (VII), který je 1000× účinnějším inhibitorem CDK než olomoucín¹⁸. Také u této látky byla analyzována krystalová struktura kokryystalu s CDK2 enzymem.

Ačkoliv jsou purinové inhibitory účinné a specifické *in vivo* i *in vitro* testech, je nepravděpodobné, že jejich jediným cílem v buňce budou CDK. Purinové látky jsou v přírodě bohatě zastoupeny a řada enzymů je využívá jako kofaktory a substráty. Jejich možnému využití v chemoterapii to ale nijak nepřekáží.

3.4. Paullony

Během srovnávací studie účinku flavopiridolu s několika desítkami tisíc látek na lidských nádorových liniích v National Cancer Institute (USA) byla objevena další účinná a specifická skupina inhibitorů CDK – paullony²². Jedná se o deriváty 7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]-benzazepinu a mezi nimi nejefektivnější 9-bromderivát (kenpaullon, VIII). Jako ostatní specifické inhibitory CDK funguje i kenpaullon kompetitivně a vykazuje antiproliferační aktivitu. Přes značně odlišnou strukturu kenpaullonu ve srovnání s ostatními CKI potvrzuje molekulární modelování vstup do vazebného místa pro ATP (cit.²³). Zároveň naznačuje možné substituce za účelem pevnější interakce. Následující studium vztahů mezi strukturou a aktivitou vedlo k přípravě inhibitoru 10× účinnějšího, alsterpaullonu (IX), jehož antimitotický účinek rovněž vzrostl o jeden řád³⁹.

3.5. Indigoidní látky

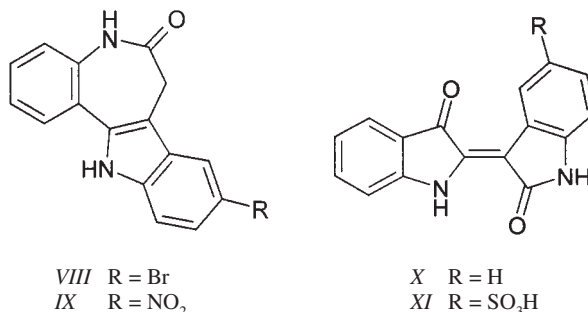
Při analýze účinku aktivních látek z rostlin používaných tradiční čínskou medicínou byla v předloňském roce objevena nová skupina CDK inhibitorů, indirubiny (X, cit.¹⁹). Extrakty rostlin obsahující indigoidní sloučeniny vykazují prokazatelnou protinádorovou aktivitu. V 80. letech podrobili indirubin *in vivo* experimentům a klinickým zkouškám, při nichž zjistili nízkou toxicitu, malé vedlejší účinky a 26 % remisi u různých typů leukemií. Nové syntetické indirubiny kompetitivně inhibují CDK1 a CDK2, asi o řád hůře pak i CDK4. Zastavují proliferaci velkého počtu buněčných linií, které zůstávají zablokovány těsně před mitózou.

Dvě ze skupiny indigoidních látek byly pro potvrzení mechanismu účinku podrobeny krystalografické analýze, konkrétně 5-chlorindirubin a indirubin-5-sulfonová kyselina (XI). Z kokryystalů s CDK2 je zřejmá značná komplementarita tvaru molekuly indirubinu a vnitřního povrchu vazebného místa pro ATP. Ve srovnání s ATP či staurosporinem však oba deriváty vykazují silnější vazbu k CDK2, a to díky interakcím v místech, kam se váže N9-isopropylový zbytek roskovitinu.

3.6. Ostatní způsoby blokování aktivity CDK

Způsobů, jak ovlivnit aktivitu cyklin-dependentních kinas, je celá řada, jak již bylo uvedeno výše. Kromě uvedených kompetitorů s ATP stojí za zmínku rozhodně i peptidové inhibitory. Taktika jejich přípravy zahrnuje 1) mapování sekvencí přirozených proteinových inhibitorů a 2) syntézu fragmentů s vazebnou (a inhibiční) aktivitou pro CDK. Bylo vyzkoušeno i testování systematicky nebo náhodně syntetizovaných polypeptidů, ale prozatím úspěšnější ve svých pokusech byly týmy soustředující se na mapování aktivních míst přirozených inhibitorů CDK p16^{INK4} (cit.⁴⁰) a p21^{WAF1} (cit.⁴¹). Tato místa pak redukovali na malé fragmenty, odpovědné za inhibici CDK4, které posléze úspěšně otestovali na buněčných kulturách.

Zablokování kinasy CDK4 považují buněční biologové v současnosti za jeden z neefektivnějších způsobů zastavení buněčného cyklu, neboť tento enzym fosforyluje aktivuje transkripci genů spouštějících replikaci DNA na počátku buněčného cyklu (v G1 fázi). Ačkoliv se celá řada vědeckých týmů snaží identifikovat skupinu látek, které by snadnými modifikacemi položily základ specifickým inhibitorům CDK4, jsou prozatím málo úspěšné. Snad první skupinou se stanou nedávno objevené 6-arylamo-7-halo-5,8-chinolindiony nebo podobné 5-arylamo-2-methyl-4,7-dioxobenzothiazoly⁴².



Mezi další studované cesty patří také vývoj inhibitorů aktivačních fosfatů cdc25 (cit. ^{43,44}). Jedním z nejdůležitějších prostředků regulujících aktivitu CDK je fosforylace a defosforylace T14 a Y15 CDK podjednotky. Fosforylace na zmíněných místech je sice pro funkci CDK nezbytná, neboť přítomnost fosfátových skupin blokuje vazbu ATP do aktivního místa, ovšem zvýšená aktivita fosfatasy cdc25 může aktivovat CDK v nesprávném místě a v nesprávný čas. Řada experimentů potvrdila zvýšenou aktivitu cdc25 v několika typech nádorů. To jen podpořilo domněnku, že nesprávná aktivace CDK přispívá ke vzniku nádorů. Cdc25 se tak nabízí jako další možný prostředek žádoucího ovlivnění aktivity CDK a cíl potenciálních syntetických inhibitorů. Velkým kladem inhibitorů fosfatů je jejich nezávislost na intracelulární hladině ATP, která obecně značně snižuje účinnost syntetických CKI *in vivo*. Vyplývá z toho efektivnější účinnost v buňce, která bude bližší inhibiční hodnotě IC_{50} pro enzym. Několik inhibitorů cdc25 je již popsáno a otestováno na nádorových liniích (benzochinoidní sloučeniny dnacin A1 a B1, terpen γ -hydroxybutenolid). Zatím ale není jasné, zda jejich účinek na buněčný cyklus může být připsán na vrub přímé inhibici cdc25.

Molekulárně-biologický přístup blokování CDK zastupuje technologie protisměrných nukleotidů. Představuje oblast, do níž jsou vkládány v současnosti asi největší naděje. Přitom je spojena s obrovskými potížemi, týkající se zejména doručení protisměrných nukleotidů do živých buněk. Buňkám jsou předkládány syntetické oligonukleotidy DNA, nesoucí sekvenci komplementární k určitému úseku mRNA. Tato molekula hybridizuje s odpovídajícím úsekem na DNA a brání tak transkripci, nebo s úsekem na RNA a inhibuje translaci. Nejedná se tedy o klasickou enzymovou inhibici jako u ostatních uváděných látek, ale o ovlivnění aktivity CDK na úrovni transkripcie a translace ^{45,46}.

4. Závěr

Poruchy mechanismů řídicích buněčný cyklus a zejména ty, které způsobují nádorová onemocnění, stimulovaly prudký vzestup zájmu o inhibitory CDK jako o novou generaci protinádorových látek. Jejich důležitými vlastnostmi přitom musejí být nízká toxicita, schopnost pronikat biologickými membránami a také relativní stabilita v organismu. S nízkou toxicitou vůči nemutovaným buňkám úzce souvisí specifita účinku CKI. Situaci rovněž komplikuje vysoký stupeň konzervativnosti vazebního místa pro ATP, které je společné obrovské skupině proteinkinás. Relativní nesnáze pomáhá překonávat nemalou měrou krystalografická analýza a stále častěji i nesrovnatelně levnější molekulární modelování. Nový typ skutečně účinných protinádorových látek založených na blokování buněčného cyklu skrze aktivitu CDK je proto otázkou velmi blízké budoucnosti.

Velmi zajímavým aspektem účinku CKI je indukce apoptózy (programové buněčné smrti). Ačkoli reverzibilně blokují buněčný cyklus, jsou některé CKI schopny apoptózu indukovat, a to v závislosti na typu buněčné linie. Zejména schopnost specifické indukce apoptózy nádorových buněk může být důležitým kritériem potenciálního využití v chemoterapii. Dodejme však, že potenciální využití CKI v medicíně může směřovat také do dalších oblastí, které nějakým způsobem souvisejí s poruchami proliferace, jako např. kardiovas-

kulární onemocnění (aterosklerosa, angiogenese), dermatologie (psoriasis), nefrologie (glomerulonefritida), neurologie (Alzheimerova choroba, ischemie), parazitologie (prvoci, plísňe) a virové infekce. Z pohledu buněčné biologie a biochemie mohou chemické CKI jako velice specifické nástroje přispět k lepšímu porozumění mechanismu buněčného cyklu, což může v budoucnu vést opět k odhalení mnohem efektivnějších způsobů terapie.

Na studiu struktury a aktivity zde uváděných skupin látek a na dalším zefektivnění inhibičních vlastností a specifity CKI se do značné míry již podílejí i nadnárodní farmaceutické společnosti. Proces vývoje zcela nové generace léčiva na bázi inhibitorů CDK bude v každém případě zahrnovat několik fází zkoušení, trvat více než 10 let a spolyká stovky miliónů dolarů. Ani po 6 letech intenzivních studií nebyl totiž žádný z výše uvedených inhibitorů CDK zaveden do klinického zkoušení. Nejdále jsou z tohoto pohledu purinové deriváty a flavopiridol. Dosavadní výsledky preklinických testů s purinovými deriváty vypadají nadějně a tak se můžeme pouze těšit na klinické zkoušení, které detailněji prokáže nejen hlavní, ale i vedlejší účinky těchto látek. Preklinické testy prozatím prokázaly širokospektrální účinky na řadu nádorů s minimálními účinky vedlejšími.

LITERATURA

1. Maller J. L., Gautier J., Langan T. A., Lohka M. J., Shenoy S., Shalloway D., Nurse P.: *J. Cell Sci. Suppl.* 12, 53 (1989).
2. Fesquet D., Labbe J. C., Derancourt J., Capony J. P., Galas S., Girard F., Lorca T., Shuttleworth J., Doree M., Cavadore J. C.: *EMBO J.* 12, 3111 (1993).
3. Müller P. R., Coleman T. R., Kumagai A., Dunphy W. G.: *Science* 270, 86 (1995).
4. Pines J.: *Trends Biochem. Sci.* 19, 143 (1994).
5. Pagano M.: *FASEB J.* 11, 1067 (1997).
6. Pines J.: *Nature* 397, 104 (1999).
7. Bullrich F., MacLachlan T. K., Sang N., Druck T., Veronese M. L., Allen S. L., Chiorazzi N., Koff A., Heubner K., Croce C. M.: *Cancer Res.* 55, 1199 (1995).
8. Hall M., Peters G.: *Adv. Cancer Res.* 68, 67 (1996).
9. Galaktionov K., Lee A. K., Eckstein J., Draetta G., Meckler J., Loda M., Beach D.: *Science* 269, 1575 (1995).
10. Herwig S., Strauss M.: *Eur. J. Biochem.* 246, 581 (1997).
11. Ko J. L., Prives C.: *Genes Dev.* 10, 1054 (1996).
12. Gemma A., Takenoshita S., Hagiwara K., Okamoto A., Spillare E. A., McMemamin M. G., Hussain S. P., Forrester K., Zariwala M., Xiong Y., Harris C. C.: *Int. J. Cancer* 68, 605 (1996).
13. Meijer L.: *Trends Cell Biol.* 6, 393 (1996).
14. Schulze-Gahmen U., Brandsen J., Jones H. D., Morgan D. O., Meijer L., Vesely J., Kim S. H.: *Proteins* 22, 378 (1995).
15. Azevedo W. F., Müller-Dieckmann H. J., Schulze-Gahmen U., Worland P. J., Sausville E., Kim S. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2735 (1996).
16. De Azevedo W. F., Leclerc S., Meijer L., Havlíček L., Strnad M., Kim S. H.: *Eur. J. Biochem.* 243, 518 (1997).
17. Toledo L. M., Lydon L. B.: *Structure* 5, 1551 (1997).
18. Gray N. S., Wodicka L., Thunnissen A. M., Norman T.

- C., Kwon S., Espinoza F. H., Morgan D. O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Kim S. H., Lockhart D. J., Schultz P. G.: *Science* 281, 533 (1998).
19. Hoessel R., Leclerc S., Endicott J.A., Nobel M. E. M., Lawrie A., Tunnah P., Leost M., Damiens E., Marie D., Marko D., Niederberg E., Tang W., Eisenbrand G., Meijer L.: *Nature Cell Biol.* 1, 60 (1999).
 20. Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavlitch N. P.: *Nature* 376, 313 (1995).
 21. Otyepka M., Kryštof V., Havlíček L., Sieglarová V., Strnad M., Koča J.: *J. Med. Chem.* 43, 2506 (2000).
 22. Zaharevitz D. W., Gussio R., Leost M., Senderowicz A. M., Lahusen T., Kunick C., Meijer L., Sausville E. A.: *Cancer Res.* 59, 2566 (1999).
 23. Riallet V., Meijer L.: *Anticancer Res.* 11, 1581 (1991).
 24. Bojanowski K., Nishio K., Fukuda M., Larsen A. K., Saijo N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1574 (1994).
 25. Ohashi M., Sukigawa E., Nakanishi N.: *Jpn. J. Cancer Res.* 96, 819 (1995).
 26. Kitagawa M., Okabe T., Ogino H., Matsumoto H., Suzuki-Tahakasi I., Kokubo T., Higashi H., Saitoh S., Taya Y., Yasuda H., Ohba Y., Nishimura S., Tanaka N., Okuyama A.: *Oncogene* 8, 2425 (1993).
 27. Someya A., Tanaka N., Okuyama A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 536 (1994).
 28. Losiewicz M. D., Carlson B. A., Kaur G. K., Sausville E. A., Worland P. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 589 (1994).
 29. Schächtele C., Totzke F., Marmé D.: *Cell. Mol. Biol. Lett.* 3, 332 (1998).
 30. Liang Y. C., Lin-Shiau S. Y., Chen C. F., Lin J. K.: *J. Cell Biochem.* 75, 1 (1999).
 31. Jankum J., Keck R. W., Skrzypczak-Jankum E., Swiercz R.: *Cancer Res.* 57, 559 (1997).
 32. Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L.: *Eur. J. Biochem.* 224, 771 (1994).
 33. Parker C. W., Entsch B., Letham D. S.: *Phytochemistry* 25, 303 (1986).
 34. Brooks E. E., Gray N. S., Joly A., Kerwar S. S., Lum R., Mackman R. L., Norman T. C., Rosete J., Rowe M., Schow S. R., Schultz P. G., Wang X., Wick M. M., Shiffman D.: *J. Biol. Chem.* 14, 29207 (1997).
 35. Schow R. S., Mackman R. L., Blum C. L., Brooks E., Horsma A. G., Joly A., Kerwar S. S., Lee G., Shiffman D., Nelson M. G., Wang X., Wick M. M., Zhang X., Lum R. T.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 2697 (1997).
 36. Chang Y. T., Gray N. S., Rosania G. R., Sutherland D. P., Kwon S., Norman T. C., Sarohia R., Leost M., Meijer L., Schultz P. G.: *Chem. Biol.* 6, 361 (1999).
 37. Imbach P., Capraro H. G., Furet P., Mett H., Meyer T., Zimmermann J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 91 (1999).
 38. Oh C. H., Lee S. C., Lee K. S., Woo E. R., Hong C. Y., Yang B. S., Baek D. J., Cho J. H.: *Arch. Pharm. (Weinheim)* 6, 187 (1999).
 39. Schultz C., Link A., Leost M., Zaharevitz D. W., Gussio R., Sausville E. A., Meijer L., Kunick C.: *J. Med. Chem.* 15, 2909 (1999).
 40. Fähræus R., Paramio P. M., Ball K., Laín S., Lane D. P.: *Curr. Biol.* 6, 84 (1996).
 41. Ball K. L., Lain S., Fähræus R., Smythe C., Lane D. P.: *Curr. Biol.* 7, 71 (1997).
 42. Ryu C. K., Kang H.Y., Yi Y. J., Lee C. O.: *Arch. Pharm. Res.* 1, 42 (2000).
 43. Horiguchi T., Nishi K., Hakoda S., Tanida S., Nagata A., Okayama H.: *Biochem. Pharmacol.* 48, 2139 (1994).
 44. Gunasekera S. P., McCarthy P. J., Kelly-Borges M., Lobkovsky E., Clardy J.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 8759 (1996).
 45. Flanagan W. M., Su L. L., Wagner R. W.: *Nature Biotechnol.* 14, 1139 (1996).
 46. Minshull J., Blow J. J., Hunt T.: *Cell* 56, 947 (1989).
- V. Kryštof and M. Strnad** (*Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Olomouc*): **Inhibitors of Cyclin-dependent Kinases**
- Disorders in regulation mechanisms of the cell cycle cause uncontrolled division of cells, which is the nature of neoplastic diseases. Cyclin-dependent kinases (CDK), enzymes of the serine-threonine protein kinase group, belong to main regulators of cell division in all eukaryotic organisms. Their indispensability in regulation of the cell cycle and, in particular, their frequent deregulation in tumours led to active search for chemical inhibitors of CDK. Butyrolactone, flavopiridol, purines of the olomoucine type, paullones, indirubins and others inhibit the CDK, block the cell cycle in the G1/S and G2/M transitions and show interesting anticancer effects. In the article, chemical properties, the mechanism of action and biological activity of the inhibitors are described.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ ETHOPABÁTU V PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK A FINÁLNÍCH KRMIVECH METODOU HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ. MEZILABORATORNÍ POROVNÁVACÍ ZKOUŠKA METODY

MICHAL DOUŠA

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Regionální laboratorní oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň

Došlo dne 17.I.2000

Klíčová slova: HPLC, ethopabát, fluorescenční detekce, krmivo

Úvod

Ethopabát (obr. 1), methylester 4-acetamido-2-ethoxy-benzoové kyseliny, se používá v krmivech v kombinaci s amproliem jako prevence proti kokcidióze drůbeže v dávce $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ finálního krmiva¹ a jeho ochranná lhůta činí 3 dny. Jeho příprava, struktura² a jeho aktivita³ jako antikocidika byly již popsány.

Pro stanovení ethopabátu v krmivech bylo popsáno několik metod, které jsou však poměrně zdoluhavé a experimentálně náročné. Szalkowského spektrofotometrická metoda⁴ je velmi časově náročná i když je použitelná v přítomnosti dalších antibiotik nebo stimulatorů růstu, které toto stanovení dále neruší. Metody plynové chromatografie jsou použitelné po předchozí předkolonové derivatizaci ethopabátu^{5,6}. Oficiální metodikou sdružení Association of Official Analytical Chemists (AOAC) je rovněž spektrofotometrická metoda⁷. Autoři po extrakci ethopabátu hydrolyzují amid na volný amin, který je diazotován dusitanem sodným a následně podroben kopulaci s *N*-(1-naftyl)ethylendiaminem za vzniku azoderivátu. Ten je extrahován do butanolu a jeho absorpční maximum je při 555 nm. Schronk a spol.⁸ použili k přečištění matrice kolonovou chromatografii (neutrální oxid hlinitý), k separaci ethopabátu HPLC na reverzní fázi C_{18} a UV detekci při 280 nm.

Následující metoda vychází z již publikované HPLC metody⁸, avšak je modifikována předběžná separace a ke zvýšení selektivity a citlivosti metody je použita fluorimetrická detekce.

Experimentální část

Princip metody

Ethopabát se stanoví po extrakci zkušební vzorku methanolem a přečištění extraktu na bazickém oxidu hlinitém,

metodou HPLC na reverzní fázi C_{18} s fluorimetrickou detekcí při vlnové délce 268 nm (excitační) a 350 nm (emisní).

Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepače LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika) a přečištění extraktu bylo provedeno na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges Alumina B (Waters, Milford, USA). Kapalinový chromatograf se skládal z vysokotlaké pumpy W515 (Waters, Milford, USA), autosampleru W717 Plus Autosampler (Waters, Milford, USA), fluorimetrického detektoru W474 (Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq (Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Jako kolona byla použita chromatografická kolona NovaPak C_{18} , 4 μm , 3,9x150 mm (Waters, Milford, USA).

Chemikálie a pomůcky

Methanol a acetonitril byly čistoty pro HPLC (J. T. Baker, USA). Mobilní fáze byla připravena smísením 300 ml acetonitrilu a 700 ml deionizované vody (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, MA, USA). Kalibrační roztoky o koncentraci 40; 80; 160 a 400 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny postupným ředěním základního roztoku ethopabátu v methanolu (Fluka, Švýcarsko) o koncentraci 200 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ methanolem. Extrakty vzorků byly filtrovány skládaným papírovým filtrem MN 280 $\frac{1}{4}$ (Macherey-Nagel, SRN).

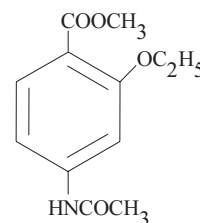
Výběr vzorků

Na analýzy byly použity reálné vzorky krmných směsí a premixů odebraných v rámci státní kontroly, zákon o krmivech podle §16 a §17 (cit.⁹).

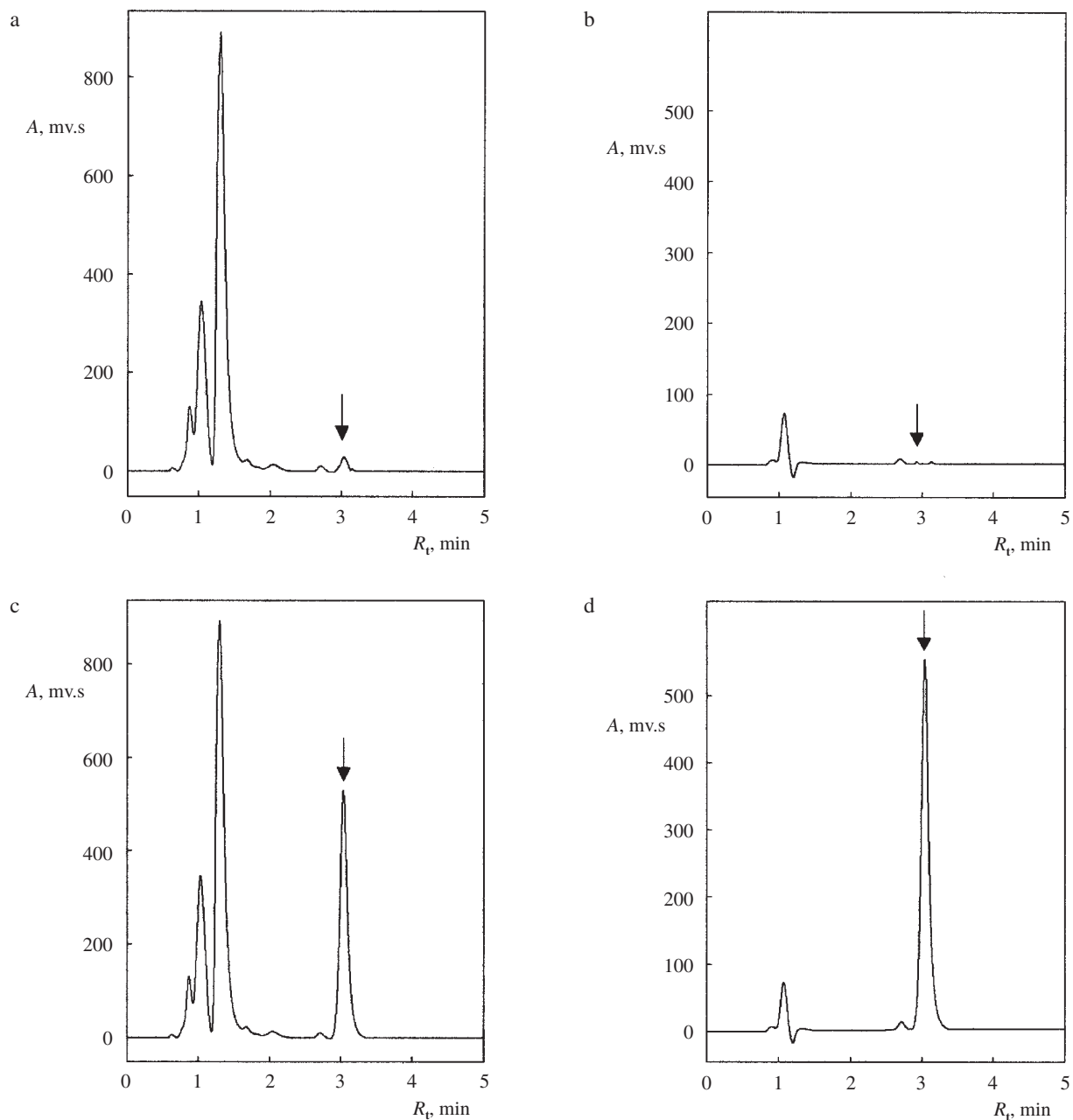
Pracovní postup

Vzorek se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a mletí. 5 až 25 g zkušební vzorku, podle deklarovaného obsahu ethopabátu, se extrahuje 100 ml methanolu po dobu 30 minut ve 250 ml uzavřené kónické baňce na laboratorní třepače. Po extrakci se extrakt zfiltruje.

Při analýze krmných směsí se odstraní balastní látky extrakcí na kolonce Sep-Pak Alumina B po předchozím naředění extraktu na požadovanou koncentraci methanolem. Kolonka



Obr. 1. Strukturální vzorec ethopabátu



Obr. 2. HPLC separace ethopabátu na modelovém vzorku. Slepý pokus bez přečištění matrice a) a po přečištění matrice b), modelový vzorek (koncentrace ethopabátu $5,33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) bez přečištění matrice c) a po přečištění matrice d) na kolonce Sep-Pak Alumina B. HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I

se připojí k polyethylenové injekční stříkačce o objemu 5 ml, do které se odlije asi 4 ml přefiltrovaného extraktu, na kolonku se nanese asi 1 ml extraktu a kolonka se nechá 5 sekund kondicionovat. Pak se extrakt pomalu protlačí připojenou kolonkou, přičemž první podíl eluátu (asi 0,2 ml) se nezachycuje a další podíl se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu. Takto přečištěný eluát je nutné promíchat.

Při analýze premixů doplňkových látek se extrakt pouze naředí methanolem na koncentraci asi $80 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I.

Výsledky a diskuse

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byla vypočtena z kalibračního modelu, kdy mez detekce odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez $(1-\alpha)\%$ ního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna kritické úrovni a mez stanovitelnosti je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibrač-

Tabulka I
HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Kolona	NovaPak C18, 4 μm , 3,9 \times 150 mm
Složení mobilní fáze	acetonitril–voda (300 + 700)
Průtok mobilní fáze	1,0 ml.min ⁻¹
Teplota kolony	okolí
Objem nástřiku	5 μl
Detektor	excitační vlnová délka 268 nm, fluorimetrický emisní vlnová délka 350 nm

Tabulka II

Parametry fluorescenční detekce ethopabátu (excitační vlnová délka/emisní vlnová délka)

Parametr ^a	Fluorescenční detekce	
	268 nm/350 nm	300 nm/350 nm
<i>a</i>	166087	45763
<i>b</i>	19658	8763
<i>r</i>	0,9999	0,9999
X_S	3,2	15,1

^a *a*, *b* – koeficienty regresní rovnice, *r* – korelační koeficient, X_S – mez stanovitelnosti ($\mu\text{g.l}^{-1}$)

Tabulka III

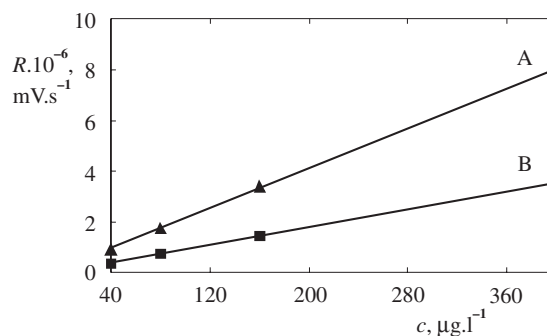
Výtěžnost metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry pro vzorky krmných směsí

Statistické parametry	Hodnota			
Očekávaná hodnota [mg.kg^{-1}]	1,33	2,67	5,33	10,67
Nalezená hodnota [mg.kg^{-1}]	1,30	2,64	5,44	10,90
Výtěžek metody [%]	97,7	98,9	102,1	102,2
Interval spolehlivosti [%]	3,0	1,2	0,6	0,8
Relativní směrodatná odchylna [%]	1,85	0,76	0,37	0,52

ního modelu dostatečně malá a obvykle je rovna hodnotě 0,1 (cit.¹⁰). Mez detekce má hodnotu 1,3 $\mu\text{g.l}^{-1}$, tj. pro daný pracovní postup 7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a mez stanovitelnosti má hodnotu 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, tj. pro daný pracovní postup 15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Robustnost metody – vliv matrice vzorku

Vliv matrice vzorku jsme prokazovali jednak proměřením extraktu připraveného modelového vzorku (33 % pšenice, 30 % ječmen, 20 % sojový extrahovaný šrot, 5 % masokostní moučka, 5 % žitné otruby, 4 % vápenec a 3 % úsušky pícnin) bez přídavku ethopabátu za podmínek metody bez přečištění (obr. 2a) a po přečištění extraktu vzorku (obr. 2b) na kolonce Sep-Pak Alumina B (slepy vzorek) a proměřením kalibračních



Obr. 3. Porovnání kalibračních přímek fluorescenční detekce při emisní vlnové délce 350 nm a excitační vlnové délce 268 nm (A) a 300 nm (B)

roztoků připravených bez přečištění (obr. 2c) a po přečištění vzorku (obr. 2d) na kolonce Sep-Pak Alumina B. Testováním Studentovým *t*-testem koeficientů regresní rovnice *b* (bez přečištění) proti *b'* (po přečištění matrice vzorku) je vypočtená hodnota $t = 14,185$. Porovnáním $t \geq t_{\text{krit.}}$ ($P = 0,95$; $f = 3$) dospějeme k závěru, že tento rozdíl je statisticky významný, je vždy nutné provádět přečištění.

Robustnost metody

Parametry fluorescenční detekce jsme sledovali proměřením kalibračních roztoků ethopabátu při emisní vlnové délce 350 nm a dvou různých excitačních vlnových délkách – 268 nm a 300 nm (obr. 3). Výsledky a vypočtené statistické parametry kalibrace (hladina významnosti $P = 0,95$) jsou uvedeny v tabulce II. Kalibrace za těchto podmínek této metody (excitační vlnová délka 268 nm) vykazuje vyšší citlivost a nižší mez stanovitelnosti.

Správnost a přesnost

Vzhledem k tomu, že neexistují certifikované referenční materiály, byla správnost metody (těsnost shody získané hodnoty s jeho hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Byly připraveny modelové vzorky krmiva s přídavkem ethopabátu o koncentrační hladině 1,33; 2,67; 5,33 a 10,67 mg.kg^{-1} a pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5 \times jako vzorek krmné směsi. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti $P = 0,95$) jsou uvedeny v tabulce III. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 1,33 až 10,67 mg.kg^{-1} je (100,2 \pm 3,6) %. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí lineární regrese. Očekávané hodnoty byly považovány za nezávisle proměnné, nalezené hodnoty jako závisle proměnné. Konstanta *a* regresního vztahu (konstantní soustavná odchylna) má hodnotu $-0,079 \pm 0,117$ a statisticky se neliší od nuly, konstanta *b* regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylna) má hodnotu $1,0297 \pm 0,0191$ a neliší se statisticky od jedničky. Metoda tudíž poskytuje správné výsledky.

Přesnost metody (míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek) byla omezena na výpočet ukazatele opakovatelnosti. Ukazatel opakovatelnosti byl vypočten ze směrodatné odchyl-

Tabulka IV

Výsledky mezilaboratorního testu. Stanovení ethopabátu metodou HPLC v premixech a krmných směsích

Parametr	Laboratoř	Průměr [mg.kg ⁻¹] ve vzorku			
		P1	P2	S1	S2
	5	2 292	1 443	6,62	5,74
	6	2 333	1 475	6,80	5,65
	8	2 424	1 541	6,95	6,20
	9	2 463	1 448	7,20	6,15
	10	2 335	1 453	8,90**	5,61
	11	2 094	1 376	7,15	5,64
	12	2 123	1 358	7,10	5,25
	15	2 459	1 853**	9,13**	8,01**
Průměrná hodnota [mg.kg ⁻¹]		2 315	1 442	6,97	5,70
Počet neodlehých laboratoř		8	7	6	7
Směrodatná odchylna opakovatelnosti s_r [mg.kg ⁻¹]		44	33	0,33	0,26
Směrodatná odchylna reprodukovatelnosti s_R [mg.kg ⁻¹]		145	65	0,33	0,37
Ukazatel opakovatelnosti r [mg.kg ⁻¹]		122	91	0,93	0,74
Ukazatel reprodukovatelnosti R [mg.kg ⁻¹]		407	183	0,93	1,05

V tabulce jsou uvedeny pouze průměry dvou paralelních stanovení, které jsou k nahlédnutí u autora; další vysvětlení v textu

ky rozpětí obou paralelních stanovení reálných vzorků pro premixy doplňkových látek i finální krmiva. Celkový počet vzorků pro finální krmiva, který byl použit k výpočtu, je 40 a po vyloučení odlehých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 2,0 až 8,0 mg.kg⁻¹ má ukazatel opakovatelnosti hodnotu 0,63 mg.kg⁻¹. Celkový počet vzorků pro premixy doplňkových látek, který byl použit k výpočtu, je 20 a po vyloučení odlehých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 1200 až 2400 mg.kg⁻¹ má ukazatel opakovatelnosti hodnotu 120 mg.kg⁻¹.

Reprodukovatelnost metody byla stanovena mezilaboratorním porovnávacím testem.

Mezilaboratorní kruhový test

Mezilaboratorního kruhového testu se zúčastnilo 8 laboratoř za podmínek normy ISO 5725–1986 (cit.¹¹) a bylo provedeno vyhodnocení ukazatele opakovatelnosti a reprodukovatelnosti dané metody. Ke statistickému testování odlehlosti hodnot byl použit Cochranův jednostranný test odlehlosti a Grubbsův test v kombinaci s tímto postupem:

- je-li $P > 5\%$, tj. je-li testovaná charakteristika Grubbsova nebo Cochranova testu menší než její pětiprocentní kritická hodnota, považuje se testovaná hodnota za správnou,
- je-li $5\% \geq P > 1\%$, tj. leží-li testovaná charakteristika mezi jednoprocenní a pětiprocenní kritickou hodnotou, nazve se testovaná hodnota hodnotou vybočující a označí se jednou hvězdičkou *),
- je-li $P \leq 1\%$, tj. je-li testovaná charakteristika Grubbsova nebo Cochranova testu větší než její jednoprocenní kritická hodnota, nazve se testovaná hodnota hodnotou odlehlou a označuje se dvěma hvězdičkami **).

Jako vzorky byly použity komerčně vyráběné premixy na dvou koncentračních hladinách – 1 400 a 2 400 mg.kg⁻¹ a na dvou vzorcích finálních krmiv o přibližné koncentraci 8 mg.kg⁻¹. Vzorky byly upraveny mletím, následně byly zhomogenizovány a na vzorcích byl proveden test homogenity (ANOVA).

Výsledky mezilaboratorního kruhového testu jsou sesta-

veny do tabulky IV. Z výsledků mezilaboratorního testu je zřejmé, že ukazatel opakovatelnosti stanovení ethopabátu metodou HPLC pro premixy při obsahu 1 400 a 2 400 mg.kg⁻¹ dosahuje hodnoty 5 až 6 % relativních a ukazatel reprodukovatelnosti se pohybuje v rozmezí 12 až 18 % relativních. Ukazatel opakovatelnosti pro finální krmiva dosahuje hodnoty 13 % relativních a ukazatel reprodukovatelnosti se pohybuje v rozmezí 13 až 18 % relativních.

Závěr

Metoda stanovení ethopabátu v krmivech poskytuje správné a přesné výsledky. Byla stanovena hodnota ukazatele opakovatelnosti pro koncentrační hladinu ethopabátu 2,0 až 2 400 mg.kg⁻¹, která je 5 až 6 % relativních. Výťažnost metody pro koncentrační hladinu ethopabátu 1,3 až 10,7 mg.kg⁻¹ je (100,2 ± 3,6) %. Byly srovnány hodnoty opakovatelnosti získané pouze v naší laboratoři a hodnoty opakovatelnosti vypočtené z výsledků mezilaboratorního kruhového testu. Obě hodnoty opakovatelnosti jsou v dobré shodě. Pro aplikaci metody stanovení ethopabátu v oblasti krmiv byla provedena optimalizace přečištění extraktu na kolonkách Sep-Pak Alumina B.

LITERATURA

1. Vyhláška č. 194/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. Grimme P., Schmitz F. P.: Berichte 87, 179 (1954).
3. Rogers D.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 488 (1964).
4. Szalkowski C. R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 46, 464 (1963).
5. Buhs R. P., Polin D., Beattie J. O., Beck J. L., Smith J. L., Speth O. C., Trenner N. R.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 154, 357 (1966).

6. Handy P. R., Holzer F. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53, 461 (1970).
7. Cunniff P. (ed.): *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, kap. 5, Method 964.29. AOAC, Arlington 1995.
8. Schronk L. R., Colvin B. M., Hanks A. R., Bushway R. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60, 1048 (1977).
9. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech.
10. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*. FINISH, Pardubice 1992.
11. ČSN 01 0251 (ekv ISO 5725–1986): *Stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované zkušební metody pomocí mezilaboratorních zkoušek*. ÚNM, Praha 1988.

M. Douša (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture Brno, Regional laboratory Plzeň): **Determina-**

tion of Ethopabate in Admixture Premixes and in Animal Feeds by HPLC with Fluorescence Detection. Interlaboratory Comparative Test of the Method

An HPLC method of determination of ethopabate for the purpose of rapid monitoring its contents in admixture premixes and in final fodders was developed. Ethopabate is extracted from a sample with methanol and after purification of the extract on basic aluminium oxide it is determined by HPLC on the C18 reverse phase with fluorescence detection. The values of the determination limit ($15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), repeatability ($0.63 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the yield of the method ($100.2\pm 3.6 \%$) were determined in the ethopabate concentration range $1.3\text{--}10.7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The repeatability value was determined with samples of real fodders. From the interlaboratory circular tests of the determination, the repeatability index was calculated, amounting to $5\text{--}6 \%$ at $2\text{--}2400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The reproducibility index ranges between 13 and 18 %.

STANOVENÍ DEXTROMETHORFANU A JEHO METABOLITŮ V PLAZMĚ METODOU HPLC

GABRIELA ZIMOVÁ^a, JAROSLAV CHLÁDEK^b,
JIŘINA MARTÍNKOVÁ^b a MARTIN BERÁNEK^c

^aKatedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: zimova@faf.cuni.cz, ^bÚstav farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové, ^cÚstav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, 500 05 Hradec Králové

Došlo dne 21.I.2000

Klíčová slova: dextromethorfan, metabolity, plazma, HPLC, fenotyp

Úvod

Tato práce byla součástí studie, jejímž cílem bylo zjistit rozložení aktivity cytochromu P450 izoenzymu 2D6 (CYP2D6) v české populaci¹.

Aktivitu enzymu lze předpovědět buď určením genotypu (analýzou DNA), nebo určením fenotypu, tzn. podáním vhodné modelové látky, jejíž metabolismus závisí výlučně na aktivitě CYP2D6. Fenotyp se pak zjišťuje na základě množství podané modelové látky a jejího metabolitu (-ů) v plazmě nebo v moči¹.

Jako modelovou látku jsme použili dextromethorfan (DM), o němž je známo, že v organismu podléhá O-demethylaci na

dextrofan (DEX). Je prokázáno, že cestu O-demethylace katalyzuje hlavně CYP2D6. Vznik DEX z DM poskytuje spolehlivou informaci o aktivitě CYP2D6, v uspořádání *in vitro* a *in vivo*²⁻⁶. Poměr molárních koncentrací DM a DEX v moči, tzv. metabolický poměr (MP), je indexem pro hodnocení aktivity CYP2D6 *in vivo*. Jedinci s MP>0,3 jsou metabolizátoři pomalí, ostatní jsou metabolizátoři rychlí. Alternativní metabolickou cestou DM je jeho N-demethylace na methoxymorfinan (MM). Tato cesta je katalyzována několika dalšími izoenzymy cytochromu P450, a to CYP3A3/4, CYP3A5, CYP3A7, CYP2D9 a CYP2C19 (cit.^{3,4,7,8}). Cesta N-demethylace však nemůže nahradit defektní O-demethylaci. DEX i MM jsou dále demetylovány na hydroxymorfinan^{2,5,9} (HM). DEX a HM jsou v plazmě přítomny hlavně ve formě konjugátů s kyselinou glukuronovou. Struktury dextromethorfanu a jeho metabolitů jsou uvedeny na obr. 1.

V první části studie bylo provedeno stanovení MP v moči a na základě zjištěných výsledků byli dobrovolníci rozděleni na skupinu rychlých (93,1 %) a na skupinu pomalých (6,9 %) metabolizátorů¹. Tento výsledek se shoduje s výsledky obdobných studií, které byly provedeny v jiných evropských bílých populacích jak s dextromethorfanem, tak i s dalšími vhodnými modelovými látkami^{6,10-12}.

Ve druhé části studie byl stanovován MP v plazmě. Vzhledem k tomu, že je k dispozici jen velmi málo prací zabývajících se určováním fenotypu z plazmatických koncentrací modelových látek, zajímalo nás, jak výsledky získané analýzou moče budou korelovat s výsledky získanými analýzou plazmy^{1,13,14}. Závěry získané z fenotypování jsme porovnávali s genotypem zúčastněných dobrovolníků.

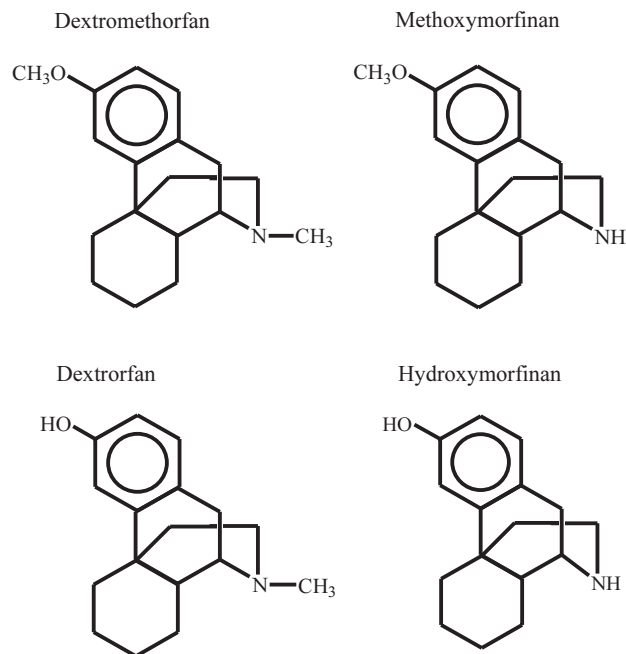
Experimentální část

Studie se účastnilo celkem 102 zdravých, nepříbuzných dobrovolníků ve věku 20–35 let (59 mužů, 43 žen). Jednorázově jim byl podán hydrobromid dextromethorfanu v dávce 27,5 mg per os (25 ml sirupu WICK Formula 44 Plus S, Wick Pharma, Gross-Gerau, SRN). 3 hodiny po podání látky byla 95 dobrovolníkům odebrána krev (10 ml) – 7 dobrovolníků odběr krve odmítlo. Přibližně 1,6 ml plné krve bylo odděleno a použito k určení genotypu. Genotyp byl určován metodou PCR (Polymerase Chain Reaction)^{14,15}. Do té doby byla krev uchovávána při –20 °C. Zbytek krve byl zcentrifugován (3000 ot.min⁻¹, 10 min) a získaná plazma byla uchovávána při –20 °C až do analýzy.

HPLC stanovení

Konfigurace přístroje: pumpa LC-10AS, dávkovací zařízení SIL-10A a fluorescenční detektor RF-10A (excitační a emisní vlnová délka 280 nm/315 nm) od firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

Chromatografické podmínky: kolona: Tessek phenyl, 150×3 mm, 5 μm (Tessek, Praha, ČR), předkolona: Tessek phenyl, 30×3 mm, 10 μm (Tessek, Praha, ČR), mobilní fáze: acetonitril–KH₂PO₄ pufr (0,01 mol.l⁻¹) v poměru 3 : 2 (v/v), pH pufru 3,6 (upraveno 0,1 mol.l⁻¹ H₃PO₄), triethylamin (350 μl.l⁻¹), průtoková rychlost 0,7 ml.min⁻¹ (160–170 MPa), teplota autosampleru 10 °C, teplota kolony 30 °C, vnitřní standard: betaxolol (betaxololi hydrochloridum, Lokren



Obr. 1. Struktury analyzovaných látek

20 mg tbl., Synthelabo, Francie), standardy stanovených látek: dextromethorfan hydrobromid monohydrát, (+)-3-methoxymorfinan hydrobromid, (+)-3-hydroxymorfinan hydrochlorid a vian dextrofranu monohydrát od firmy Hoffmann-La Roche, Švýcarsko

Úprava vzorků plazmy před analýzou

Na základě výsledků analýzy moče byli dobrovolníci podle fenotypu rozděleni na rychlé a pomalé metabolizátory. V důsledku předpokládaných rozdílných plazmatických koncentrací stanovených látek u rychlých a pomalých metabolizátorů byla plazma zpracovávána v odlišném množství u obou skupin. Pro izolaci DM a jeho metabolitů ze vzorků plazmy byla použita metoda extrakce a reextrakce v systému kapalina–kapalina. Konjugáty DEX a HM s kyselinou glukuronovou byly před extrakcí hydrolyticky rozštěpeny enzymem β -glukuronidasou. Vzorky byly analyzovány bez hydrolyzy i po hydrolyze s β -glukuronidasou.

V případě rychlých metabolizátorů bylo k hydrolyze odebráno 0,3 ml plazmy a přidáno 0,14 ml vodného roztoku octanu sodného ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) a 0,011 ml β -glukuronidasy ($1,620 \mu\text{katal.l}^{-1}$). Tato směs byla inkubována ve vodní lázni temperované na 37°C . Inkubační doba 18 h byla předem experimentálně ověřena jako dostatečná pro úplnou hydrolyzu glukuronidů.

U pomalých metabolizátorů bylo hydrolytické štěpení glukuronidů prováděno s dvojnásobným množstvím plazmy než u rychlých metabolizátorů z důvodu očekávaných nízkých koncentrací metabolitů v plazmě. Dvakrát byl zvýšen také objem vodného roztoku octanu sodného a β -glukuronidasy.

Extrakce a reextrakce vzorků plazmy po inkubaci s β -glukuronidasou

V případě rychlých metabolizátorů bylo k extrakci odebráno 0,4 ml inkubační směsi, v případě pomalých metabolizátorů bylo odebráno množství dvojnásobné, tzn. 0,8 ml inkubační směsi (důvod viz výše). Další postup byl u obou typů metabolizátorů shodný.

K odebranému množství inkubační směsi bylo přidáno 0,16 ml Na_2CO_3 ($0,5 \text{ mol.l}^{-1}$), 0,1 ml betaxololu jako vnitřního standardu (2 ng.l^{-1} , ředěno $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl) a 5 ml extrakčního činidla (hexan:*n*-butanol, 9:1, v/v). Po 15 minutovém protřepání a následné centrifugaci (2000 rpm, 15 minut) byly zkumavky se vzorky vloženy do chlazené hexanové lázně (-20°C). Po zmrznutí vodné fáze byla organická vrstva převedena do čisté konické zkumavky. Vodná fáze byla po rozmrazení extrahována ještě jednou stejným postupem. Organické fáze z obou extrakcí byly spojeny a použity k reextrakci.

Ke spojeným organickým fázím bylo přidáno 0,3 ml KHSO_4 ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$). Po 15 minutovém třepání následovala centrifugace (2200 rpm, 15 min), po které byla vodná vrstva opět vymrazena a organická fáze byla odstraněna. Vodná fáze byla po rozmrazení nastříkována na kolonu v objemu 30–50 μl .

Extrakce a reextrakce vzorků plazmy bez inkubace

K 1 ml plazmy bylo přidáno 0,4 ml Na_2CO_3 ($0,5 \text{ mol.l}^{-1}$), 0,1 ml betaxololu jako vnitřního standardu ($2,5 \text{ ng.l}^{-1}$, ředěno

$0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl) a 5 ml extrakčního činidla (hexan:*n*-butanol, 9:1, v/v).

Dále pokračovala extrakce i reextrakce stejným způsobem jako v případě vzorků plazmy, které byly s β -glukuronidasou inkubovány. Nástřikový objem vodné fáze po jejím rozmrazení byl 50 μl .

Kalibrace

Kalibrační řada a vzorky kontroly kvality byly připravovány ředěním zásobních roztoků standardů lidskou plazmou. Plazma byla získána od subjektů, kterým nebyl dextromethorfan podán a její čistota byla před použitím chromatograficky ověřena. Objemy zásobních roztoků standardů a přidávané lidské plazmy při přípravě kalibrační řady a vzorků kontroly kvality byly současně ověřovány vážením. Koncentrace zásobních roztoků: DM $197,7 \text{ mg.l}^{-1}$, MM $208,5 \text{ mg.l}^{-1}$, DEX $1870,5 \text{ mg.l}^{-1}$ a HM $966,7 \text{ mg.l}^{-1}$ (ředěno $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl). Rozsahy koncentrací jednotlivých látek v kalibrační řadě byly $1,09 \cdot 10^{-3}$ – $0,14 \text{ mg.l}^{-1}$ pro DM, $0,62 \cdot 10^{-3}$ – $0,080 \text{ mg.l}^{-1}$ pro MM, $0,58 \cdot 10^{-3}$ – $0,074 \text{ mg.l}^{-1}$ pro DEX a $0,59 \cdot 10^{-3}$ – $0,075 \text{ mg.l}^{-1}$ pro HM.

Parametry kalibračních závislostí byly získány ze závislosti poměrů ploch píků stanovené látky a vnitřního standardu na teoretické koncentraci analyzované látky metodou vážené lineární regrese (program SOLO, BMDP Statistical Software, Los Angeles, California).

Výsledky a diskuse

Použité chromatografické podmínky umožnily úplnou separaci a stanovení DM, jeho metabolitů a vnitřního standardu. Za těchto podmínek neinterferovaly endogenní látky s látkami analyzovanými. Chromatografické záznamy analýz jsou uvedeny na obr. 2 a 3. Na chromatogramech většiny rychlých metabolizátorů nejsou patrné píky methoxymorfinanu.

Ke stanovení koncentrací dextromethorfanu a jeho metabolitů jsme použili metodu HPLC s fluorescenční detekcí. Metoda vznikla úpravou podmínek, které byly vypracovány v první části studie pro stanovení těchto látek v moči¹.

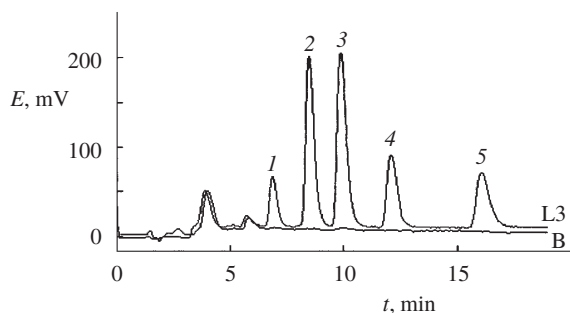
K izolaci DM a metabolitů z plazmy byl použit postup, který se osvědčil při extrakci těchto látek z moči¹. Byl upraven pouze objem extrakčního činidla, protože s jeho původním množstvím (4 ml) nebylo dosahováno dostatečné výtěžnosti. Při zvýšení objemu extrakční směsi na 5 ml stoupla výtěžnost DM, DEX, MM a BX o 10 až 14 %. Výtěžnost HM stoupla téměř o 20 %. Výsledné extrakční výtěžnosti jednotlivých analytů byly DM 91 %, DEX 101 %, HM 90 %, MM 76 % a BX 99 %.

Korelační koeficienty kalibračních závislostí během sedmi po sobě následujících dnů byly pro DM, DEX a MM vyšší než 0,998 a pro HM byly vyšší než 0,996. Relativní odchylky teoretických a skutečných koncentrací kalibračních bodů se pohybovaly v těchto mezích: pro DM od $-8,2\%$ do $9,9\%$, pro DEX od $-5,6\%$ do $7,9\%$, pro MM od $-8,3\%$ do $5,7\%$ a pro HM od $-8,9\%$ do $10,7\%$.

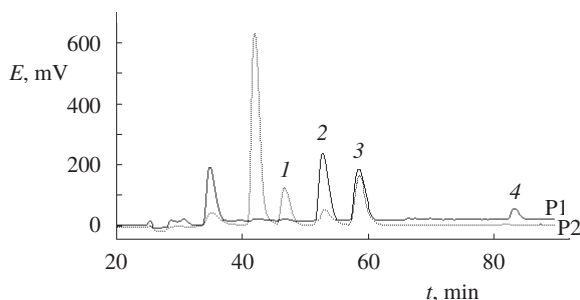
Přesnost a správnost analýz vzorků pro kontrolu kvality je vidět z údajů v tabulce I. Analýzy kalibračních bodů s nejnižšími koncentracemi byly opakovatelné a správné. Teoretické koncentrace těchto bodů (viz experimentální část) je možné

považovat za spodní meze stanovitelnosti pro všechny analyzované látky. Námí dosažená spodní mez stanovitelnosti je o jeden řád nižší než je uváděno v literatuře¹³. Je to pravděpodobně způsobeno dokonalejším izolačním postupem, který vedl téměř k úplnému odstranění endogenních látek. Pro hodnotu poměru signálu a šumu 5 byl detekční limit pro DM a jeho metabolity odhadnut na 0,073 ng. To odpovídá koncentraci $0,73 \cdot 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ analytů v plazmě.

Tabulka II uvádí koncentrace DM a jeho metabolitů v plazmě naměřené 3 hodiny po podání modelové látky a metabo-



Obr. 2. B – chromatogram slepého vzorku plazmy, L3 chromatogram kalibračního bodu L3: 1 – hydroxymorfinan, 2 – dextrorfan, 3 – betaxolol, 4 – methoxymorfinan, 5 – dextromethorfan



Obr. 3. P1 — chromatogram plazmy rychlého metabolizátora bez inkubace s β -glukuronidasou pro stanovení dextromethorfanu (4) a betaxololu (3); P2 chromatogram plazmy rychlého metabolizátora po inkubaci s β -glukuronidasou pro stanovení hydroxymorfinanu (1), dextrorfanu (2) a betaxololu (3)

Tabulka I

Výsledky analýz vzorků kontroly kvality

Vzorek	Analyt	Teoretická koncentrace [mg.l ⁻¹]	Poměr naměřené a teoretické koncentrace					Průměr	CV ^a [%]	RD ^b [%]
			1. den	2. den	3. den	4. den	5. den			
K1	DM	14,98	1,13	1,05	1,20	1,01	0,99	1,07	7,45	5,34
	DEX	27,71	0,99	1,07	0,99	0,99	0,96	1,00	3,66	2,13
	MM	16,03	1,01	1,03	1,00	0,94	0,85	0,98	6,80	1,75
K2	HM	7,35	1,10	1,12	1,21	1,23	1,04	1,14	6,06	3,13
	DM	3,37	1,09	1,19	1,31	1,00	1,11	1,14	9,11	7,51
	DEX	6,92	1,00	1,05	1,14	0,99	0,98	1,03	5,76	0,43
	MM	3,99	0,94	1,30	1,22	1,00	1,09	1,11	12,20	4,26
	HM	3,77	1,36	1,26	1,02	1,09	1,25	1,20	10,24	9,43

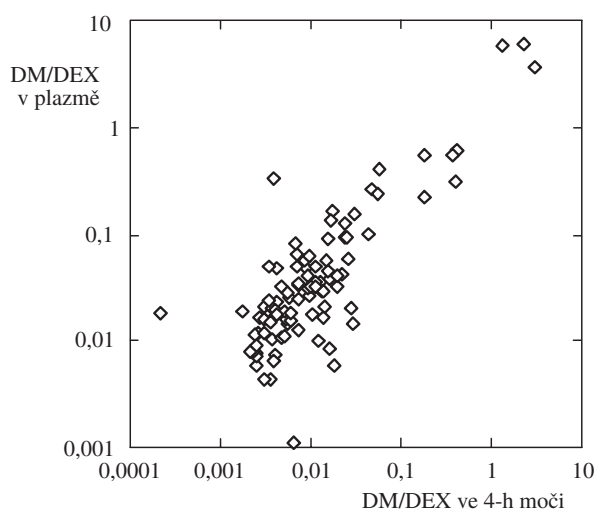
^a Variační koeficient, ^b relativní chyba

Tabulka II

Medián (rozpětí) koncentrací dextromethorfanu a jeho metabolitů v plazmě odebrané 3 h po podání 85 μmol (27,5 mg) hydrobromidu dextromethorfanu ve skupině rychlých (RM) a pomalých (PM) metabolizátorů a medián (rozpětí) metabolických poměrů (MP) počítaných jako poměr molárních koncentrací DM a DEX v plazmě

Látka	RM (N = 89)	PM (N = 6)
	Koncentrace [nmol.l ⁻¹]	
DM	7,98 (0,459–106)	58,3 (39,8–71,6)
DEX	316 (81,0–609)	42,8 (10,5–122)
MM ^a	<0,7 (<0,7–4,98)	1,18 (<0,7–3,26)
HM	178 (30,7–313)	24,3 (5,79–65,4)
MP (DM/DEX)	0,025 (0,001–0,56)	2,15 (0,32–6,15)

^a U 80 RM a 3 PM byla konc. <0,7 nmol.l⁻¹ (spodní limit stanovitelnosti)



Obr. 4. Korelace metabolických poměrů získaných měřením koncentrací dextromethorfanu (DM) a dextrorfanu (DEX) v moči (sbírané 0–4 h po podání modelové látky) a v plazmě (získané 3 h po podání modelové látky); $r_s = 0,705$, $p < 1 \cdot 10^{-4}$

lický poměr (DM/DEX) vypočtený z těchto koncentrací. Srovnáme-li výsledky uvedené v tabulce II s výsledky získanými analýzou moči (medián (rozpětí) MP v moči byl pro rychlé metabolizátory 0,007 (0,0001–0,18); a pro pomalé metabolizátory 1,3 (0,37–4,6)¹), vidíme, že hodnoty MP v plazmě se ve skupině rychlých a pomalých metabolizátorů překrývají. Z toho je možné usoudit, že hraniční hodnota MP zjištěná v plazmě bude odlišná od hodnoty 0,3, která je používána pro stanovení MP v moči. Velikost této hraniční meze v plazmě není zatím přesně známa. Literatura uvádí střední hodnotu MP v plazmě 0,126 (pro DM jako modelovou látku)¹³.

Korelace metabolických poměrů získaných jak měřením koncentrací látek v moči, tak měřením v plazmě vyplývá z obr. 4. Lze říci, že oba metabolické poměry spolu dobře korelují. Z toho vyplývá, že stanovení aktivity CYP2D6 s využitím metabolického poměru DM/DEX v plazmě získané 3 hodiny po podání modelové látky by mohlo být vhodnou alternativou ke standardnímu přístupu, tj. ke stanovení fenotypu CYP2D6 v moči. Tento přístup by byl zvláště vhodný v případech snížené funkce ledvin, kdy poměry látek v moči mohou být negativně ovlivněny změnami exkrece DM a DEX do moči.

LITERATURA

- Zimová G., Chládek J., Martínková J., Beránek M.: Chem. Listy 97, 132 (2000).
- Dayer P., Leemann T., Striberni R.: Clin. Pharmacol. Ther. 45, 34 (1989).
- von Moltke L. L., Greenblatt D. J., Grassi J. M., Granda B. W., Venkatakrishnan K., Schmider J., Harmatz J. S., Shader R. I.: J. Pharm. Pharmacol. 50, 997 (1998).
- Schmider J., Greenblatt D. J., Fogelman S. M., von Moltke L. L., Shader R. I.: Biopharm. Drug Dispos. 18, 227 (1997).
- Mortimer Ö., Lindström B., Laurell H., Bergman U., Rane A.: Br. J. Clin. Pharmacol. 27, 223 (1989).
- Droll K., Bruce-Mensah K., Otton S. V., Gaedigk A., Sellers E. M., Tyndale R. F.: Pharmacogenetics 8, 325 (1998).
- Gorski J. C., Jones D. R., Wrighton S. A., Hall S. D.: Biochem. Pharmacol. 48, 173 (1994).
- Jacqz-Aigrain E., Funck-Brentano C., Cresteil T.: Pharmacogenetics 3, 197 (1993).
- Ducharme J., Sami A., Irving W.W.: J. Chromatogr., B 678, 113 (1996).
- Alván G., Bechtel P., Izelius L., Gundert-Remy U.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 39, 533 (1990).
- Bertilsson L.: Clin. Pharmacokinet. 29, 192 (1995).
- Henthorn T. K., Benitez J., Avram M. J., Martinez C., Llerena A., Cobaleda J., Krejcie T. C., Gibbon R. D.: Clin. Pharmacol. Ther. 45, 328 (1989).
- Köhler D., Härtter S., Fuchs K., Sieghart W., Hiemke Ch.: Pharmacogenetics 7, 453 (1997).
- Funck-Brentano Ch., Thomas G., Jacqz-Aigrain E., Poirie J. M., Simon T., Béréziat G., Jaillon P.: J. Pharm. Exp. Ther. 263, 780 (1992).
- Heim M., Meyer U. A.: Lancet 336, 529 (1990).

G. Zimová, J. Chládek, J. Martínková, and M. Beránek
(Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control,
Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové):
HPLC Determination of Dextromethorphan and Its Metabolites in Plasma

An HPLC method for the determination of dextromethorphan, dextrorphan, methoxymorphinan and hydroxymorphinan in plasma using fluorescence detection (excitation and emission wavelength 280 and 315 nm, respectively) was elaborated. The mobile phase was acetonitrile – 0.01 M-KH₂PO₄ (3:2) containing triethylamine (350 ml.l⁻¹), pH 3.6; flow rate 0.7 ml.min⁻¹; internal standard betaxolol. For isolation of the substances from plasma, liquid-liquid extraction and re-extraction with freezing out the aqueous phase was used. The recoveries of the substances were 91, 101, 76, 90 and 99 %, respectively. The method was used for determination of the CYP2D6 phenotype in 95 healthy, unrelated volunteers from Czech population.

TROJROZMERNÉ FLUORESCENČNÉ SPEKTRÁ – RIEŠITELNÝ PROBLÉM AJ PRE STARŠIE PRÍSTROJE

KATARÍNA DUBAYOVÁ^a, JAROSLAV KUŠNÍR^a
a MILOŠ HANUS^b

^aÚstav lekárskej chémie a biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Trieda SNP 1, 040 66 Košice, e-mail: dubayova@central.medic.upjs.sk, ^bKurská 25, 040 22 Košice, Slovenská republika

Došlo dňa 26.I.2000

Kľúčové slová: spektrofluorimeter, fluorescenčné spektrum, vrstevnicová mapa, albumín, riboflavín, kyselina acetylsalicylová, pyridoxín

Úvod

Špecifita fluorescencie látok vyplýva zo závislosti intenzity od dvoch vlnových dĺžok, excitačnej a emisnej $F = f(\lambda_{ex}; \lambda_{em})$. Pre každú látku je možné namerať emisné spektrá pri rôznych excitačných vlnových dĺžkach a naopak. Zoradenie takto nameraných jednotlivých spektier v priestore, tj. vytvorenie závislosti intenzity fluorescencie od viacerých (postupne sa zvyšujúcich) hodnôt excitačnej a emisnej vlnovej dĺžky, vedie ku vzniku trojrozmerného grafu. Prezentácia fluorescenčných spektier vo forme trojrozmerných grafov dáva možnosť na komplexné využitie všetkých informácií o analyzovanej látke. Spektrum každého fluorofóru, alebo zmesi fluorofórov má oveľa vyššiu vypovedaciu hodnotu, ak sa sníma pri viacerých excitačných, či emisných vlnových dĺžkach. Klasicky snímané emisné spektrá pri konštantnej vlnovej dĺžke excitačného svetla a opačne, nezodpovedajú požiadavkám na rozlíšenie hlavne v oblasti biochemického výskumu. Preto sa preferuje trojrozmerná fluorescenčná analýza. Na interpretáciu výsledkov trojrozmernej fluorescenčnej analýzy sa v praxi využíva najmä počítačová forma špeciálnych vrstevnicových máp. (Analogia zemepisných máp: vrstevnice predstavujú oblasti s rovnakou intenzitou fluorescencie, súradnicová poloha na mape je kvalitatívnou, „kóta“ kvantitatívnou charakteristikou fluoreskujúcej látky.)

Vrstevnicová mapa zobrazuje podstatne väčší počet podrobností, než klasické spektrum v podobe jednej krivky. Uzavreté vrstevnice sú charakteristickou fluorescenciou analyzovanej látky a môžu slúžiť na identifikáciu fluorescenčných zložiek v komplikovanej zmesi, prípadne potvrdiť alebo vyvrátiť identitu dvoch zmesí. Vrstevnicové mapy takto slúžia ako selektívny odtlačok¹.

Technika trojrozmernej fluorescenčnej analýzy bola využitá aj pri identifikácii farbiva na zvyšku plátna, ktoré bolo nájdené pri archeologických vykopávkach. Na základe vytvorenej fluorescenčnej vrstevnicovej mapy farbiva na nájdenej textilii a porovnaním so štandardami prírodných farieb na vybraných typoch materiálov (hodváb, bavlna) sa podarilo identifikovať nielen pôvod farby, ale aj typ tkaniny².

Trojrozmerné grafické výstupy nameraných veličín umožňujú

dnes komerčne vyrábané spektrofluorimetre vyššej kategórie. Technicky najprepracovanejším prístrojom na takéto merania je fluorescenčný spektrofotometer Hitachi model F-4500 s adekvátnou počítačovou výbavou³. Praktická dostupnosť týchto prístrojov je však z cenových dôvodov pre väčšinu bežných laboratórií málo reálna. Preto sme modernizovali starší, avšak koncepčne veľmi dobre riešený fluorescenčný spektrometer Perkin-Elmer Model 3000.

Experimentálna časť

Chemikálie

Hovädzí sérový albumín (Merck, SRN), acylpyrín (Slovakofarma Hlohovec), riboflavín, injekčný roztok (Léčiva Praha), pyridoxín, injekčný roztok (Léčiva Praha), B-komplex (Léčiva Praha). Koncentrácie vodných roztokov: acylpyrín 200 mg.l⁻¹, albumín 40 mg.l⁻¹, riboflavín 10 mg.l⁻¹, pyridoxín 5 mg.l⁻¹.

Prístroje a zariadenia

Fluorescenčný spektrometer Perkin-Elmer model 3000 (PE 3000), rok výroby 1981 s pripojeným počítačom PC Pentium so softwarom Spektro⁴, novo vyvinuté hardwarové rozhranie.

Metódy

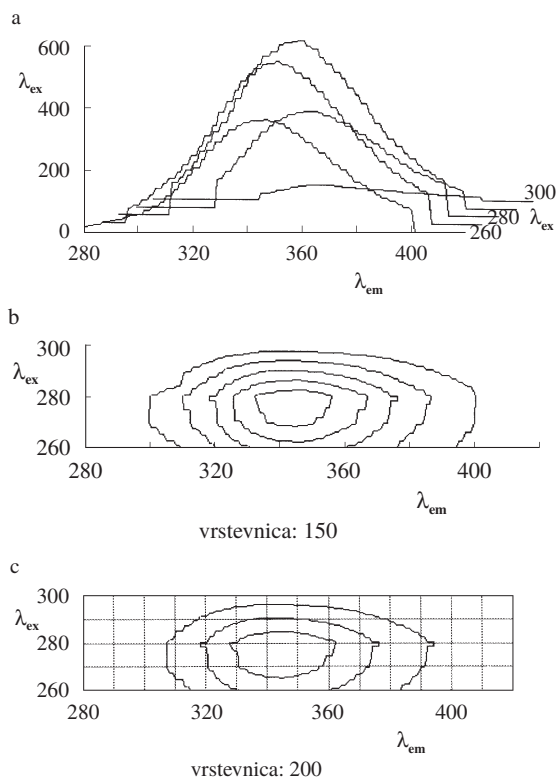
Emisné spektrá boli snímané pri excitačných vlnových dĺžkach začínajúcich pri 260 nm a zvyšujúcich sa po 10 nm až do hodnoty 600 nm. Emisný monochromátor bol nastavený na počiatočnú vlnovú dĺžku posunutú vždy o 20 nm vyššie oproti excitačnej, aby sa eliminovali rozptylové javy. Vrstevnicové mapy boli vytvorené okamžite po ukončení merania programom Spektro.

Výsledky a diskusia

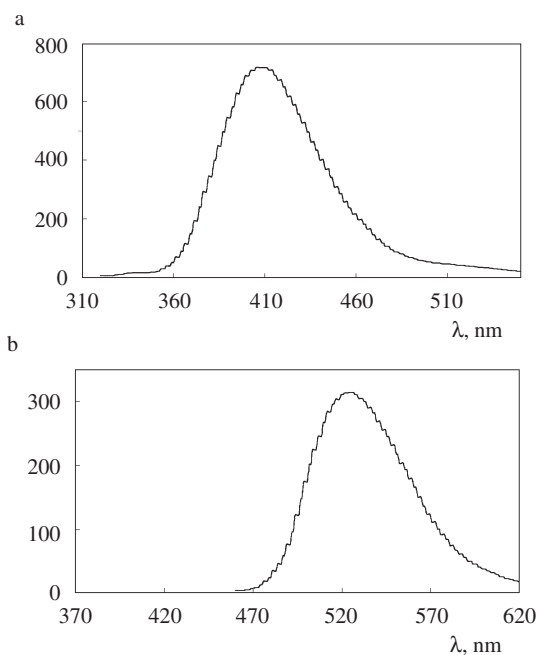
Technická úprava výstupu nameraných spektrálnych veličín prístroja Perkin-Elmer Model 3000, jeho pripojenie na PC Pentium a program Spektro⁴, ktorý bol vytvorený podľa našich požiadaviek a predstáv, umožňuje analyzovať fluorescenčný materiál rôznymi spôsobmi a interpretovať namerané hodnoty vo vhodnej grafickej forme na vysokej úrovni.

Program Spektro je autorský program na počítačové spracovanie hodnôt nameraných fluorescenčným spektrofotometerom PE 3000. Umožňuje registráciu všetkých typov spektier v číselnej aj grafickej podobe a ich archiváciu. Na znázornenie spektra je možné v ľubovoľnom bode veľmi presne odčítať hodnotu vlnovej dĺžky a jej odpovedajúcu intenzitu fluorescencie. Viaceré spektrá je možné znázorniť s farebným odlíšením. Program umožňuje sčítanie, odčítanie spektier aj výpočet priemeru viacerých meraní. Namerané údaje je možné exportovať do iných grafických programov (napr. Excel). Samozrejmom súčasťou programu je tlač zobrazených spektier.

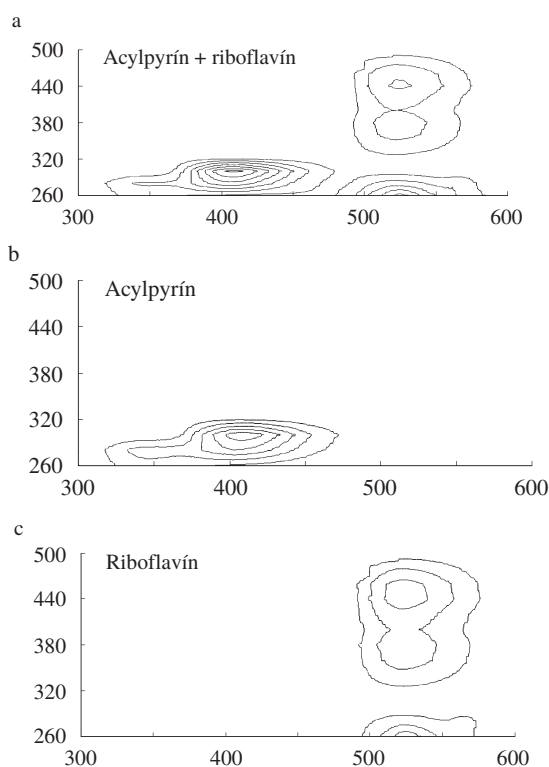
Výsledky trojrozmernej fluorescenčnej analýzy je možné v programe Spektro prezentovať vo forme trojrozmerného grafu, ale aj v jeho dvojrozmernej alternatíve, vo forme vrstevnicových spektrálnych máp (obr. 1). Na vrstevnicovej ma-



Obr. 1. Trojrozmerné spracovanie fluorescenčných spektier vodného roztoku albumínu. Usporiadanie emisných spektier v priestore (a), vrstevnicová mapa – 150 jednotiek relatívnej fluorescence (b), vrstevnicová mapa so zobrazenou mriežkou – 200 jednotiek relatívnej fluorescence (c)



Obr. 2. Jednoduché emisné spektrum modelovej zmesi (acylpyrín + riboflavín) snímané pri excitačnom maxime kyseliny acetylsalicylovej $\lambda_{ex} = 300$ nm (a) a riboflavínu $\lambda_{ex} = 440$ nm (b). Identifikovateľná je vždy iba jedna zložka zmesi



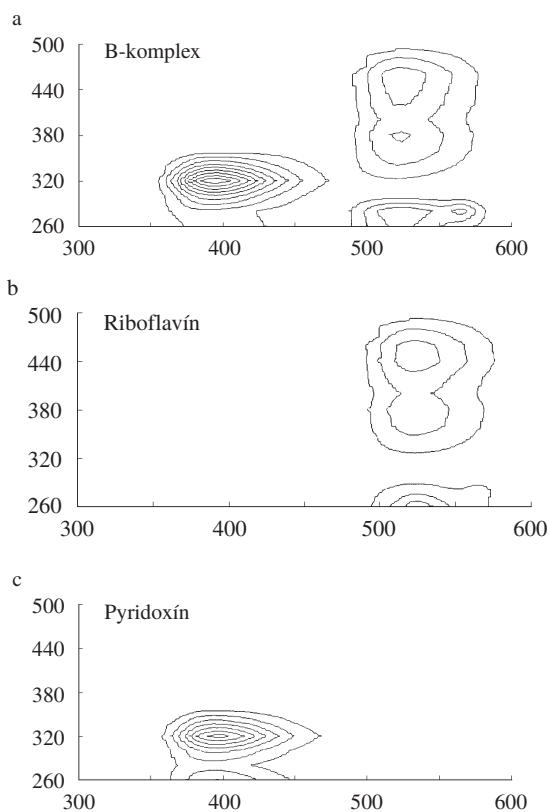
Obr. 3. Fluorescenčná vrstevnicová mapa roztoku modelovej zmesi (acylpyrín + riboflavín) a jednotlivých zložiek – acylpyrínu, riboflavínu. V zmesi sú identifikovateľné všetky zložky

pe os x reprezentuje emisnú, os y excitačnú vlnovú dĺžku. Vrstevnice spektrálnej mapy spájajú body s rovnakou intenzitou fluorescence. Hustotu vrstevníc je možné zadávať s ľubovoľným odstupom intenzity fluorescence. Orientáciu na mape uľahčuje mriežka, ktorú je možné podľa zväženia zobraziť (obr. 1). V programe Spektro sa automaticky zobrazujú súradnice akéhokoľvek miesta na vrstevnicovej mape pri pohybe myšou po mape. Jednotlivé fluorescenčné pásma sa dajú farebne odlíšiť.

Na grafickom zobrazení trojrozmerných emisných fluorescenčných spektier vo forme vrstevnicových spektrálnych máp chceme demonštrovať možnosti veľmi podrobnej spektrálnej charakteristiky niektorých látok.

Trojrozmerná fluorescenčná analýza je zvlášť výhodná pri skúmaní zmesi fluorescenčných látok. Klasickou fluorescenčnou analýzou (emisné spektrum snímané pri vlnovej dĺžke excitačného maxima) je málokedy možné odhaliť prítomnosť ďalších látok s odlišnými fluorescenčnými charakteristikami, než má práve meraná látka. Ako modelovú zmes sme zvolili vodný roztok kyseliny acetylsalicylovej (acylpyrín) v prítomnosti riboflavínu. Emisné spektrum modelovej zmesi snímané pri excitačnom maxime kyseliny acetylsalicylovej nezaregistruje prítomnosť riboflavínu a naopak (obr. 2). Vrstevnicová mapa tieto obmedzenia nemá a dokazuje grafickú výnimočnosť najmä pri porovnávaní – identifikácii čistých látok alebo zmesí (obr. 3). Jednotlivé fluorofóry prítomné vo vzorke vytvárajú v plošnom zobrazení máp uzavreté, alebo polouzavreté krivky s presne vymedzenými súradnicami. Takýto obrázok plne charakterizuje totožnosť meranej vzorky.

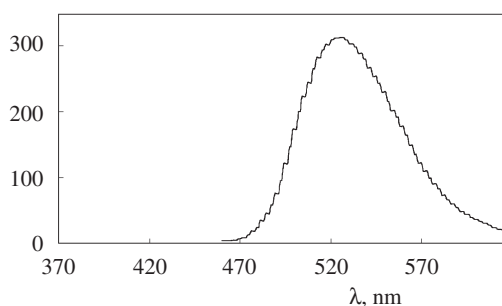
Riboflavin (vitamín B₂) je aj jednou zo zložiek tablety B-komplexu (B₁, B₂, B₅, B₆, PP). Na fluorescenčnej vrstevnicovej mape vodného roztoku tablety B-komplexu sa okrem



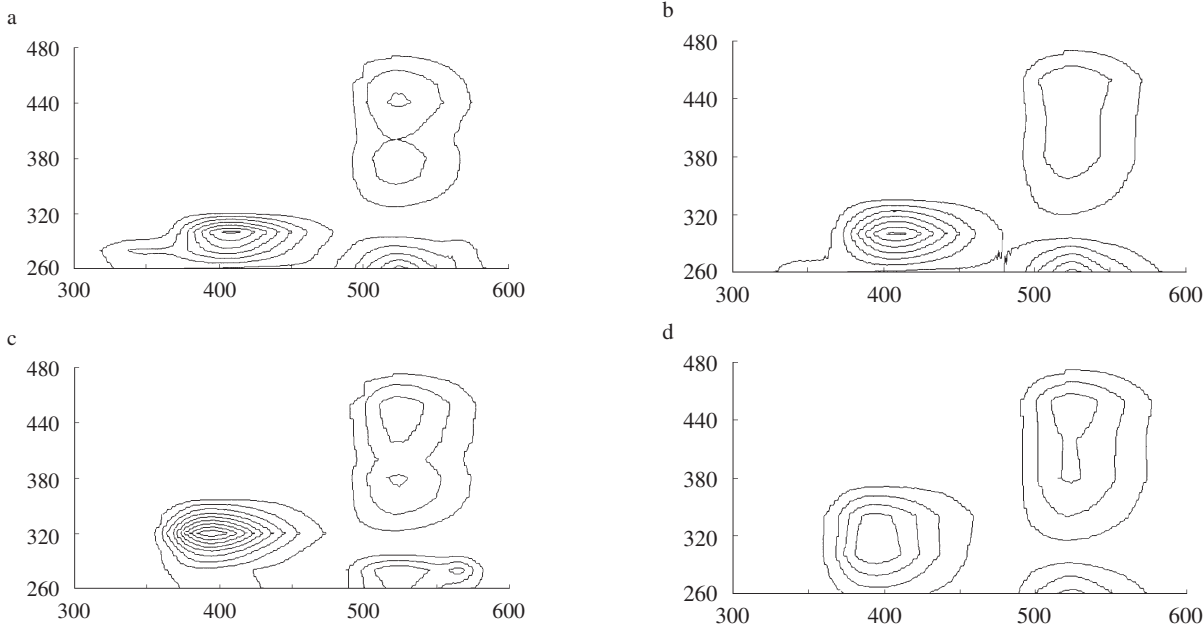
Obr. 4. Fluorescenčná vrstevnicová mapa roztoku B-komplexu a jeho zložiek – riboflavínu, pyridoxínu. V zmesi sú identifikovateľné všetky zložky

riboflavínu prejavuje aj ďalší fluorofór, ktorý predstavuje pyridoxín (B₆). Jeho totožnosť potvrdzuje vrstevnicová mapa roztoku pyridoxínu (obr. 4). Klasické fluorescenčné spektrum roztoku B-komplexu snímané pri excitačnom maxime riboflavínu nezaznamenalo prítomnosť ďalšieho fluorofóru (obr. 5).

Jediným obmedzením upraveného fluorimetra Perkin-Elmer 3000 je nízka rýchlosť pohybu monochromátorov (max. 240 nm.min⁻¹) v porovnaní s fluorimetrom Hitachi F-4500 až 30000 nm.min⁻¹ (cit.³). Ich rýchlosť nie je možné zvýšiť, pretože je daná samotnou konštrukciou prístroja. Preto, hlavne z časových dôvodov, sa snímali emisné spektrá tak, že excitačná vlnová dĺžka sa menila v intervaloch po 10 nm (tj. 260, 270, 280 nm ... 500 nm). Pri príliš veľkých odstupoch (napr. 40 nm) môže dôjsť ku skresleniu fluorescenčných charakteristík (obr. 5). Avšak aj pri takomto zjednodušení je možné rozlíšiť v zmesi jednotlivé fluorescenčné zložky, ba aj odlíšiť dve zmesi, ktoré obsahujú fluorofór s blízskymi spektrálnymi charakteristikami. Ak sa merania robia rovnakým spôsobom, potom sa pri porovnávaní jednotlivých spektrálnych máp tieto chyby eliminujú a znižuje sa iba rozlišovacia schopnosť spektier.



Obr. 5. Jednoduché emisné spektrum roztoku B-komplexu snímané pri excitačnom maxime riboflavínu $\lambda_{ex} = 440$ nm. Identifikovateľná iba jedna zložka zmesi



Obr. 6. Porovnanie tvaru fluorescenčných vrstevnicových máp roztoku modelovej zmesi a, b a B-komplexu c, d v závislosti od hustoty merania emisných spektier. Excitačné vlnové dĺžky sa menili po 10 nm a, c alebo po 40 nm b, d

Záver

Technickou úpravou staršieho prístroja a vytvorením programu Spektro sme dosiahli úroveň spektrálnych fluorescenčných meraní, porovnateľnú so špičkovým zariadením. Pri kvalitnej mechanickej a elektronickej výbave pôvodného fluorimetra zostalo jediné obmedzenie – rýchlosť pohybu monochromátorov. Následkom je dlhšia doba merania kompletného trojrozmerného spektra – 15 až 20 minút v porovnaní s 1 až 3 minútami u najmodernejších zariadení. Tento časový rozdiel nie je rozhodujúci, pokiaľ sa nemerajú veľké série vzoriek, alebo sa nevyžaduje extrémna „hustota“ emisných spektier. Časový faktor však ustupuje do pozadia, ak sa zoberie do úvahy cena modernizácie – 25 000 Sk a cena nového prístroja okolo 1 500 000 Sk.

LITERATÚRA

1. Phelan V.: *Int. Lab. News* 7, 12 (1994).
2. Shimoyama S., Nada Y.: *12th Annual Meeting of Dyes in History and Archaeology, November 25–26, Brussels 1993*.

3. Dokumentačný materiál k fluorescenčnému spektrofotometru HITACHI Model F-4500.
4. Dubayová K., Kušnir J., Hanus M., Synek M.: *Folia Med. Cassov.* 54, 108 (1997).

Katarína Dubayová^a, Jaroslav Kušnir^a, and Miloš Hanus^b (^a*Department of Medicinal Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Pavel Jozef Šafárik University, Košice, Kurská St. 25, Košice, Slovak Republic*): **Three-dimensional Fluorescence Spectra – A Resolvable Problem also with Older Instruments**

The possibility of obtaining fluorescence spectra in the form of three-dimensional graphs after modification of an old spectral fluorimeter is described. A Perkin-Elmer model 3000 instrument was innovated to provide, through a hardware interface, the direct output of measured spectral quantities into a computer, where they are worked up, using a special program Spektro, in the shape of three-dimensional graphs or spectral contour maps. By this modification, the instruments achieve several parameters of the latest superior spectrofluorimeters.

OSOBNÍ ZPRÁVY

K životnímu jubileu Ing. Lubomíra Lochmanna, DrSc

Dne 22. května letošního roku oslaví své 75. narozeniny Ing. Lubomír Lochmann, DrSc., jeden z vynikajících vědeckých pracovníků Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky.

Světlo světa spatřil tedy v roce 1926 v Praze jako syn komorního stenografa tehdejšího Parlamentu Republiky Československé. Jeho náklonnost k přírodovědným oborům, nejméně k chemii, se projevily už v relativně útlém věku. Přesto však, podle přání rodičů, absolvoval čtyři třídy klasického gymnázia, a teprve poté, v souladu s přáním vlastním, pokračoval ve specializovaném vzdělávání na Vyšší průmyslové škole chemické v Praze. Tu ukončil v roce 1945. Po krátkém působení ve Výzkumném ústavu cukrovarnickém pokračoval ve zvyšování kvalifikace studiem na Vysoké škole chemicko-technologické, které završil již v roce 1949 na katedře technologie organických látek u profesora Šorma. Po absolvování školy krátce působil jako doktorand na katedře prof. Lukeše, pak pracoval postupně v Nováckých chemických závodech, v Konstruktivě a v n.p. Reagencie v Praze a Kralupech, až posléze koncem roku 1960 nastoupil do krátce předtím založeného Ústavu makromolekulární chemie Československé akademie věd, do oddělení organické syntézy. Jeho odborný zájem vzbudila chemie organokovových sloučenin alkalických kovů a tomuto oboru se pak věnoval po celou dobu své kariéry. Zde také v roce 1968 obhájil kandidátskou disertační práci věnovanou alkalickým organokovům a alkoxidům, a o 30 let později získal i hodnost doktora věd. V letech 1992–93 působil jako Visiting Scientist na Cornellově univerzitě v Ithace, USA, ve skupině prof. Fréchet, který je znám svými pracemi v oboru dendrimerů.

Soubor Lochmannových prací, věnovaných alkalickým organokovům, patří do základního fondu vědomostí o aniontové polymerizaci akrylových a hlavně methakrylových esterů, tedy oboru, který je i mým „osudem“ už hezkou řádku let. Podstatnou část z nich jsme s Lochmannem strávili v jednom oddělení našeho ústavu. Proto mohu za všechny, kteří se v této oblasti angažují, s plnou odpovědností prohlásit, že jeho modelové studie mechanismu aniontové polymerizace methakrylátů, vypracované postupy syntézy modelových ester-enolátů a další práce jsou stále – a ještě budou – hojně citovanými základními údaji o tomto procesu, obzvláště o kinetice dílčích reakcí polymerizace a fungování stabilizačních přísad. Pro tyto studie si jubilant vypracoval speciální experimentální techniku, jako např. modifikovaný průtočný reaktor, z něhož bylo možno získávat vzorky reakční směsi v časovém rozmezí řádově desítek milisekund, anebo řadu třeba i drobných pomůcek a různých „udělátek“ pro manipulaci s citlivými chemikáliemi v inertním prostředí, jejichž relativní jednoduchost a přitom „vymyšlenost“ byla mnohdy obdivuhodná; některé z nich patří stále k základnímu vybavení laboratoře. Je autorem nebo spoluautorem více než 80 původních prací, několika přehledných článků, 30 patentů a řady sdělení na mezinárodních vědeckých setkáních. V roce 1975 získal Cenu ČSAV za soubor studií o aniontové polymeriza-

ci methakrylátů. V roce 1991 obdržel od Čs. úřadu pro vynálezy a objevy diplom za objev obecně platné výměnné reakce kov–kov probíhající mezi organolithnými sloučeninami a alkoxidy těžších alkalických kovů podle schématu: $R^1Li + R^2OM \rightarrow R^1M + R^2OLi$ ($M = Na, K, Rb, Cs$). Tato reakce je základem tzv. Lochmannových superbází, v anglosaské literatuře známých jako „Lochmann's base“, které se vyznačují mimořádnou reaktivitou a jsou hojně využívány preparativně, hlavně při metalacích organických sloučenin v organické syntéze, anebo při modifikaci polymerů, jako jeden z kroků při přípravě roubovaných (ko)polymerů. Objev této reakce je pěknou ilustrací známého rčení, že náhoda pomáhá připravenému. Při studiu interakce alkyllithia se sodným alkoxidem se totiž v baňce vytvořila sraženina, která na vzduchu vzplanula, což indikovalo, že se v reakční směsi děje něco hodného dalšího studia.

Dr. Lochmann je mezi kolegy znám spíše jako „Bušek“, ale musím se přiznat, že se mi nikdy nepodařilo vystopovat původ této přezdívky. Zato jsem ke svému údivu zjistil, že někteří naši společní známí vůbec neznali jeho skutečné křestní jméno – byl pro ně prostě Bušek. Oslovovaly jej tak i jeho laborantky. Ty měly v Buškově šéfa vždy korektního, avšak vzhledem k jeho úzkostlivé pečlivosti při práci v laboratoři náročného a důsledného – on sám je totiž velice zručný experimentátor. Nikdy se vážněji nerozčiloval, neřku-li že by zvýšil hlas, ale vysvětloval chyby nebo objasňoval své představy s občasným lehkým pomlasknutím, a tak oznámení jeho spolupracovnice, že „Bušek mlaská...“ vešlo do historie oddělení coby zpráva o nepřilíš vydařeném experimentu. Nutno však poznamenat, že se to stávalo spíše zřídkka. Řídit auto začal poměrně pozdě, ale naučil se to velice rychle a dobře a se svým Trabantem a později Favoritem už procestoval pořádný kus Evropy. V létě to byla horská turistika a v zimě lyžování v Alpách, – je totiž výborný sjezdář. Pokaždé přiveze z dovolené perfektně uspořádaný soubor téměř profesionálně provedených fotografií a poutavě a se suchým humorem vypráví o svých zážitcích.

Závěrem Ti, milý Bušku, přejeme do dalších let pevně zdraví, co nejméně důvodů k „mlaskání“, hodně úspěchů v práci, radosti v kruhu rodinném a nakonec taky kousek štěstí.

Petr Vlček

Doc. Ing. Jiří Hodek, CSc., pětasedmdesátníkem

24. května 2001 se dožívá významného životního jubilea docent Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, Jiří Hodek. Rodák z Nového Města nad Metují vystudoval nejprve Nižší průmyslovou školu chemicko-textilní ve Dvoře Králové, poté Vyšší průmyslovou školu chemickou v Kolíně, aby po dvouleté praxi v koželužně nastoupil v roce 1947 na tehdejší fakultu chemicko-technologického inženýrství ČVUT v Praze. Po jejím absolvování v roce 1952 nastoupil jako asistent na katedru fyzikální chemie VŠCHT Praha, kde setrval až do svého odchodu do důchodu.

Po celou dobu své vědecké dráhy se zabýval adsorpcí plynů a par na tuhých adsorbentech. Se svými spolupracovníky vyvinul u nás tehdy neznámou technologii výroby spirálových křemenných vah pro vázkovou adsorpční aparaturu. Na ní pak dokázali poprvé na světě přímo změřit adsorpční izostery (závislost tlaku na teplotě při konstantním naadsorbovaném množství) a vysvětlit jejich zlomy, které tehdy oproti všem známým teoriím naměřili. Za téměř 50 let práce na katedře zkonstruoval více jak desítku většinou originálních skleněných adsorpčních aparatur, při jejichž stavbě dbal nejenom na technické řešení, ale i na estetický dojem, k čemuž také vedl i pracovníky sklofoukačské dílny. V tom se projevovala i jeho záliba ve výtvarném umění a klasické hudbě, které spolu s láskou k přírodě mu zůstaly koníčkem pro celý život. Stejně pečlivě jako si počínal při experimentech, měl vždy

logicky uspořádaný i své přednášky a cvičení pro posluchače.

Svou habilitační práci zaměřil na dielektrické chování adsorbované vrstvy butanu na silikagelu, pro jehož měření si postavil unikátní aparaturu. Naposledy své velké zkušenosti z adsorpční a vakuové techniky využil při návrhu aparatur na měření pervaporačních vlastností polymerních membrán a sorpci binárních směsí organických par na nich. A protože bez svých oblíbených aparatur nemůže být ani v důchodu, dochází stále na ústav, kde pomáhá svými radami i při vedení diplomantů a doktorandů.

Milý Jirko, jménem svým i Tvých žáků, spolupracovníků a přátel Ti přeji do dalších let mnoho zdraví a dobré pohody, kterou jsi vždy dovedl kolem sebe šířit.

Milan Zábranský

DISKUSE

Chemické názvosloví na základních a středních školách

Nynější diskuse o používání chemického názvosloví v praxi se v poslední době sice rozvinula zejména díky vydání *Průvodce názvoslovím organických sloučenin* podle IUPAC, ale jako hlavní problém se v ní objevuje spíše vztah současného chemického názvosloví k normám spisovné češtiny. I pro podmínky výuky chemie na základních a středních školách lze potvrdit, že zařadit do praxe nejzákladnější změny v organickém názvosloví dané Průvodcem nebude zdaleka tak problematické jako nalezení rovnováhy mezi spisovnou češtinou a odborným chemickým slovníkem.

Rámcově panuje v rozdělení působnosti pravidel spisovné češtiny a norem chemického názvosloví shoda: chemické názvosloví má své místo v odborné komunikaci, naproti tomu v populárně vědeckých textech a v obecném užití se používají fonetické tvary chemických názvů. Na pomezí těchto sfér leží učebnice chemie pro různé typy škol. Podle představ chemiků patří do odborné komunikace i výuka chemie. Důležitý příklad praktického vymezení hranice mezi aplikací pravidel chemického názvosloví a současnou spisovnou češtinou představuje časopis *Vesmír*. Ten důsledně hájí stanovisko, že je populárně vědeckým časopisem a ne odborným, a používá proto jednoznačně fonetické tvary zápisu názvů chemických látek. Srovnáme-li však úroveň obsahu článků *Vesmíru* s odbornou náročností obsahu učebnic chemie středních a zejména základních škol, vyplyne nám zřejmý závěr, že chápat text učebnic chemie jako odborný text je velmi subjektivní hodnocení. Navíc je okruh čtenářů *Vesmíru* dosti elitní skupinou (především vysokoškoláci s přírodovědným vzděláním), zatímco žáci nižších stupňů škol zahrnují celou populaci své věkové kategorie a většina z nich se později bude s chemickými názvy setkávat nanejvýš v popularizačních textech. Jestliže přesto používáme v učebnicích chemie odbornou verzi zápisu chemických názvů, můžeme to chápat tak, že vlastně naše žáky bereme jako opravdové chemiky a neobracíme se k nim pouze

jako k laikům, jen z vnějšku. To je jistě dobře, i když tím děláme tradičně obtížný vyučovací předmět ještě o trochu těžší.

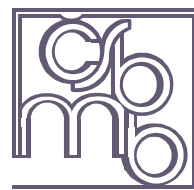
Učebnice chemie pro střední a základní školy zcela jednoznačně používají oficiální formu chemického názvosloví obvyklou v odborných textech. Autoři učebnic chemie jsou tedy jednotní a podporují i jednotný přístup učitelů chemie k používání chemické terminologie. Může se tedy zdát vše v pořádku. Přesto si myslím, že je oprávněné konstatovat, že současná situace ve výuce na středních a základních školách je z hlediska používání organického chemického názvosloví velmi problematická. Učebnice chemie sice používají shodnou variantu chemických názvů, ale je zásadní chybou, že se nijak nevyjadřují k existenci dvou forem zápisu názvů organických sloučenin a ke vztahu mezi formou zápisu používaného v učebnicích chemie a současným českým pravopisem. Většina středoškoláků již tyto problémy nejspíše vnímá (např. na jedné stránce učebnice chemie se mohou setkat s dvojicí slov izomer – isooktan). Jsem přesvědčen, že je nutné při výuce chemie o této otázce opakovaně hovořit.

Největší problém ovšem představuje fakt, že snad všechny učebnice biologie pro gymnázia používají názvy organických sloučenin výhradně ve fonetickém tvaru („glukóza“ a podobně). Je zajímavou otázkou, jak tuto situaci řeší spousta učitelů, kteří vyučují současně biologii i chemii. (Učitelé biologie, kteří nejsou zároveň chemiky, zřejmě respektují autory svých učebnic.) Taková situace je trvale neudržitelná. Spolupráci autorů učebnic biologie a učitelů biologie v oblasti chemického názvosloví nutně potřebujeme. Přitom biologové ve svých odborných textech (včetně úvodních učebnic) přece běžně používají latinské systematické názvy organismů a jistě se je nechystají počesťovat – proto bychom od nich snad mohli očekávat i větší porozumění pro zvláštní postavení chemických odborných názvů.

Miroslav Melichar



SIGMA-ALDRICH



**Sigma-Aldrich konference mladých chemiků,
biochemiků a molekulárních biologů**

17. 5. až 19. 5. 2001

Kamenné Žehrovice

sborník redigovali

Martin Fusek, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

VYUŽITÍ ZRYCHLENÉ EXTRAKCE ROZPOUŠTĚDLEM PRO STANOVENÍ ESTERŮ Kyseliny ftalové a polycyklických aromatických uhlovodíků v půdách a říčních sedimentech

MARTIN ADAM, KAREL VENTURA

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická,
Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice,
e-mail: Martin.Adam@upce.cz*

Při analytickém procesu hraje velmi významnou roli příprava vzorků pro analýzu. Tento krok je považován za časově nejnáročnější a je zdrojem mnoha chyb. Při analýze tuhých vzorků je často třeba analyt vhodným způsobem izolovat od původní matrice a současně jej co možná nejvíce nakonzentrovat.

Potřeba zvýšení produktivity, snížení spotřeby organických rozpouštědel, urychlení extrakce tuhých vzorků a v neposlední řadě i možnost automatizace vyžadovala vyvinout nové extrakční techniky.

Jako velmi perspektivní se jeví zrychlená extrakce rozpouštědlem, jejíž popis byl publikován jako U.S. EPA metoda 3545 – Accelerated Solvent Extraction. V principu se jedná o proces v systému tuhá látka–kapalina, který je prováděn při teplotách nad atmosférickým bodem varu použitých rozpouštědel a při vyšších tlacích, jejichž úkolem je udržet kapalný stav extrakčních činidel. Díky zachování kapalného stavu je tak možné použít prakticky libovolnou směs rozpouštědel. Celý extrakční proces trvá ve srovnání s klasickými extrakčními postupy jen několik minut při minimalizaci objemu rozpouštědel.

Možnost použití metody zrychlené extrakce rozpouštědlem pro analýzu vzorků životního prostředí byla prověřena na stanovení obsahu esterů kyseliny ftalové ze vzorků půd a říčních sedimentů a polycyklických aromatických uhlovodíků ze vzorků říčních sedimentů. Extrakce byly prováděny na přístroji FastEx 01, který byl ve spolupráci s Univerzitou Pardubice vyvinut na Ústavu analytické chemie v Brně a v roce 1998 vyroben v jeho dílnách.

Jako analytická koncovka byla zvolena metoda plynové chromatografie s hmotnostním detektorem. Analýza extraktů byla prováděna na přístroji GC 17A s detektorem QP 5050A (Shimadzu, Japonsko), který byl vybaven kapilární kolonou DB 5 (30 m × 0,25 μm, tloušťka filmu fenylmethylsilikonu 0,25 mm).

Při extrakci obou uvedených typů sloučenin (ftaláty a PAH) bylo dosaženo výsledků s nízkou hodnotou relativní směrodatné odchylky (do 5 %). U vzorků při stanovení PAH byly získány výsledky srovnatelné s certifikovaným obsahem sledovaných sloučenin. Uvedených výsledků bylo dosaženo s nízkou spotřebou organických rozpouštědel a současně při krátké době extrakce, což vyhovuje současným požadavkům na zpracování vzorků před vlastní analýzou.

Práce byla provedena za podpory projektů MŠMT ČR (projekt VS-96058), MŽP ČR (projekt MR/14/95) a GA ČR (projekt 203/99/0044).

STRUKTURA A FUNKCE RECEPTORŮ SPŘAŽENÝCH S G PROTEINŮ, MAPOVÁNÍ KONTAKTNÍCH MÍST S Gα -PROTEINŮ

JAROSLAV BLAHOŠ, MICHAELA HAVLIČKOVÁ

*Laboratoř Molekulární Fyziologie, 3. LF UK a FgU AV ČR,
Ke Karlovu 4, 120 00 Praha 2*

Přibližně 1 % savčího genomu kóduje receptory spřažené s G-proteiny (G-Protein Coupled Receptors – GPCR). Přes odlišnou primární strukturu různých GPCR existují společné charakteristické znaky jako je sedm α-helixů křížujících buněčnou stěnu. Jednotlivé GPCR se dají zařadit do několika rodin. Třetí rodinu tvoří metabotropní glutamátové receptory (mGluR), GABA_B receptory, Ca-sensing receptory a další. Charakteristický je zde velký extracelulární N-terminus tvořící vazebné místo pro agonisty. Typická je také dimerizace. mGlu receptory a Ca-sensing receptory se vyskytují v homodimerické formě, GABA_B receptor je heteromer tvořený proteiny GB1 a GB2.

Zmapovali jsme části G-proteinů které jsou rozlišovány mGlu a GABA_B receptory. Jedním úsekem je karboxylový konec Gα-proteinu, především pak čtvrtá aminokyselina od konce^{1,2}. Dále jsme popsali nové kontaktní místo s GPCR na Gα-proteinu, které se nachází poblíž N-terminu. Navíc jsme potvrdili, že stejně jako receptory z první a druhé rodiny GPCR, mGluR rozlišují oblast Gα-proteinu zvaný L9 loop (oblast mezi β4 a α6)⁴.

Projekty jež jsou zaměřené na studium aktivace GABA_B receptorů popisují principy vazby ligandů extracelulární částí receptoru³. Dále jsme se podíleli na studiu procesu heterodimerizace⁵ a aktivace G-proteinů GABA_B receptory. Pomocí mutagenese a heterologní exprese s funkčními testy byla odhalena podjednotka GABA_B receptoru rozlišující a aktivující G-proteiny⁶.

LITERATURA

1. Blahoš J., Mary S., Perroy J., de Colle C., Brabet I., Bockaert J., Pin J-P.: *J. Biol. Chem.* 273, 25765 (1998).
2. Franek M., Pagano A., Kaupmann K., Bettler B., Pin J-P., Blahoš J.: *Neuropharm.* 38, 1657 (1999).
3. Galvez T., Prézeau L., Milioti G., Franek M., Joly C., Froestl W., Bettler B., Bertrand H-O., Blahoš J., Pin J-P.: *J. Biol. Chem.* 52, 41166 (2000).
4. Blahoš J., Fischer T., Brabet I., Stauffer D., Rovelli G., Bockaert J., Pin J-P.: *J. Biol. Chem.* 276, 3262 (2001).
5. Pagano A., et al.: *J. Neurosci.* 24, 1189 (2001).
6. Galvez T., Duthey B., Kniazeff J., Blahos J., Rovelli G., Bettler B., Prézeau L., Pin J-P.: *EMBO J.* (2001), in press.

MODELOVÉ DIBLOKOVÉ KOPOLYMERY PEG S DEGRADOVATELNOU ESTEROVOU VAZBOU

A. BRAUNOVÁ, M. PECHAR, K. ULBRICH

Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6

Běžně používaná protirakovinná léčiva setrvávají v krevním řečišti v důsledku své nízké molární hmotnosti pouze krátkou dobu a jsou poměrně rychle vylučována z organismu glomerulární filtrací. Navázáním nízkomolekulárního léčiva na makromolekulární nosič je možné dosáhnout snížení rychlosti vylučování léčiva z organismu, snížení množství léčiva, potřebného k dosažení terapeutického efektu, a zároveň zvýšení rychlosti ukládání léčiva v řadě pevných nádorů v důsledku EPR (enhanced permeability and retention) efektu. Zvýšená koncentrace léčiva v nádoru vede ve svém důsledku ke zvýšení specifity a efektivity léčby. Námi studované diblokové kopolymery, obsahující hydrolyticky štěpitelné esterové a amidické vazby mezi bloky PEG, slouží jako modely pro přípravu vysokomolekulárních blokových kopolymerů na bázi PEG, umožňujících prodlouženou cirkulaci léčiva v organismu a jeho pronikání do nádorové tkáně na základě EPR efektu. Při přípravě diblokových kopolymerů byl monofunkční PEG ($M = 2000$) modifikován alifatickými dikarboxylovými kyselinami (malonová, jantarová, glutarová, maleinová) na monokarboxylový polymer, obsahující esterovou vazbu, který poté kondenzací s diaminem vytvořil polymer o dvojnásobné molární hmotnosti ($M = 4000$). Takto připravené polymery byly použity pro studium vztahu mezi strukturou a rychlostí hydrolytické degradace esterové vazby, která je součástí sekvence spojující dva bloky PEG. Bylo zjištěno, že rychlost hydrolyzy esterové vazby, vzniklé zabudováním nasycených kyselin do spojky mezi bloky, závisí na pH prostředí. V mírně alkalickém prostředí (pH 7,4 a 8,0) je rychlost hydrolyzy značná a se vzrůstajícím pH roste. Stejně významný je i vliv struktury spojky. Prodloužením původní kyseliny o jednu methylenovou skupinu se zpomaluje rychlost hydrolyzy esterové vazby přibližně třikrát. V oblasti pH 5,5 k hydrolyze esterové vazby prakticky nedochází. Bylo prokázáno, že přítomnost dvojné vazby v těsném sousedství vazby esterové silně zvyšuje její schopnost hydrolyzy nejen v alkalické, ale i v kyselé oblasti pH. Kopolymery na bázi PEG budou i nadále studovány jako vhodné degradabilní nosiče kancerostatik pro léčbu nádorových onemocnění v oblasti močových cest a zažívacího traktu.

Tento projekt je financován Grantovou agenturou České republiky (grant č. 307/96/K226).

REGULACE VAZBY NÁDOROVÉHO SUPRESORU PROTEINU P53 K CÍLOVÝM SEKVENCÍM V SUPERHELIKÁLNÍ DNA

VÁCLAV BRÁZDA, EVA JAGELSKÁ, LENKA KARLOVSKÁ, EMIL PALEČEK

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, e-mail: vaclav@ibp.cz

Normální funkcí proteinu p53 je udržování homeostasy kontrolou buněčné proliferace, ukončení diferenciace buněk a programové řízení buněčné smrti – apoptóza. Tyto regulační funkce proteinu p53 jsou způsobeny především sekvencí specifickou transkripční aktivací celé řady genů. Mutace genu *p53* je nejčastější somatickou mutací nalezenou ve zhubných nádorech člověka. Protein p53 se váže na cílovou sekvenci 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (p53CON) a jak jsme ukázali také na superhelikální DNA (scDNA). Identifikovaná přirozená vazebná místa pro p53 jsou značně heterogenní. Připravili jsme proto sadu plazmidových konstruktů lišících se pouze cílovými sekvencemi, které jsme vybrali z promotorů některých významných proteinem p53 regulovaných genů (RGC, p21, mdm2, GADD). Tyto konstrukty jsme podrobili analýze, při které jsme sledovali vazebné vlastnosti proteinu p53 izolovaného z bakteriálního a bakulovirového expresního systému na jeho cílové sekvence na plazmidech s negativním nadšroubovicovým vinutím a nativní nadšroubovicovou hustotou. Ukázalo se, že superhelicitu může významně ovlivňovat přístupnost cílových sekvencí k vazbě proteinu p53. Vazebná aktivita proteinu p53 může být regulována různými způsoby, například fosforylací kasein kinasou II, protein kinasou C či vazbou jiných proteinů a monoklonálních protilátek (Mab). Metodou snížení pohyblivosti komplexu p53/Mab/DNA v agarózovém gelu jsme ukázali, že vazba proteinu na cílovou sekvenci v scDNA je aktivována Mab Bp53-6.1, Bp53-10.1, Bp53-30.1, zatímco jiné Mab – DO-1, DO-13, Ica 9 tuto vazbu neaktivují. Nicméně mohou způsobit změnu konformace proteinu p53 zabraňující jeho další aktivaci pro vazbu na cílové sekvence.

PREFERENČNÍ VAZBA DOMÉN PROTEINU P53 NA SUPERHELIKÁLNÍ DNA

M. BRÁZDOVÁ^a, J. PALEČEK^a, M. FOJTA^a, S. BILLOVÁ^a, V. SUBRAMANIAM^b, T. M. JOVIN^b, E. PALEČEK^a

^aBiofyzikální ústav AV ČR, 612 65 Brno, Česká republika, ^bDepartment of Molecular Biology, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, D-37018 Göttingen, Germany

Funkce genu p53, často označovaného za strážce genomu¹, je úzce spjata se specifickou vazbou jeho produktu, nádorového supresoru proteinu p53, na cílovou sekvenci (p53CON). Nedávno jsme ukázali, že celý lidský protein se silně váže na negativně nadšroubovicovou DNA (superhelikální, scDNA) obsahující či neobsahující cílovou sekvenci^{2,3}. V přírodě nacházíme DNA, od malých bakteriálních plazmidů po ohromné

eukaryotické chromozomy, s nadšroubovicovou strukturou.

Naše výsledky²⁻⁵ naznačily, že vazba celého proteinu p53 na scDNA představuje jeden z nových vazebných motivů označovaný za superhelikálně selektivní vazbu. Pomocí elektroforetických a imunochemických metod jsme porovnávali vazbu bakteriálně exprimovaných delečních mutantů na scDNA s vazbou celého lidského proteinu (flp53, aminokyseliny 1-393). Pro detekci superhelikálně selektivní vazby byl využit kompetiční experiment, při kterém se proteiny vázaly na plazmidovou scDNA v přítomnosti stejného množství jeho linearizované formy. Silná preferenční superhelikálně selektivní vazba byla pozorována kromě flp53 i u konstruktů aa44-393 a aa320-393. Delece posledních 30 aa zredukovala tuto vazbu na jen velmi slabě preferenční. Z porovnání chování jednotlivých konstruktů s flp53 vyplývá, že C-terminální část (aa320-393) je nezbytná pro superhelikálně selektivní vazbu flp53 na scDNA (cit.⁶). Poznání úlohy jednotlivých proteinových domén při interakci s scDNA může přinést informace o úloze p53 při procesech transkripce a rekombinace.

LITERATURA

1. Hupp T. R.: *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 88 (1999).
2. Palecek E., et al.: *Oncogene* 15, 2201 (1997).
3. Palecek E., et al.: *Oncogene* 18, 3617 (1999).
4. Fojta M., et al.: *J. Biol. Chem.* 274, 25749 (1999).
5. Palecek E., et al.: *Eur. J. Biochem.* 268, 573 (2001).
6. Brazdová M., Paleček J., Fojta M., Billová S., Paleček E.: in preparation.

MODIFIED TFO (TRIPLEX FORMING OLIGONUCLEOTIDES): NEW APPROACH IN ANTIVIRAL GENE THERAPY

MARTIN BUNČEK

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Prague, Czech Republic

Our project employs two novel technologies: targeting oligonucleotides to double-stranded (ds) DNA sequences capable of forming triplex structures (TFO's) and conjugating these to DNA-destruction molecules activated by red shifted wavelengths. This strategy is not limited to dsDNA viruses, circular or folded TFO's can be used to target single stranded nucleic acids. In this project we focused only to dsDNA viruses which are associated with human diseases. Conjugates of TFO and DNA-destruction molecules successful in antiviral therapy must specifically bind to the conserved DNA sequences and destroy them. The binding properties of TFO's are evaluated using electrophoretic mobility shift analyses and spectrophotometrically determined melting temperatures. This approach allows a K_D determination.

In the course of our project, we identified triplex target sites in the dsDNA viruses (HIV, HSV and HPV), constructed corresponding TFO's and tested their binding properties *in vitro*. Cleavage profile of dsDNA carrying these target sequences by TFO's conjugated to photoactivable DNA-destructing molecules is also determined.

This work is supported by: MŠMT ČR project nr.: LN00B125; IGA MZ CR grant nr.: NI/6180-3; Charles University internal grant nr.: 112/2000/B BIO /FaF; Generi Biotech s.r.o.

AMIDICKÉ LIGANDY A JEJICH KOMPLEXY S ANIONY

MICHAL ČAJAN

Národní centrum pro výzkum biomolekul a Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: cajan@chemi.muni.cz

Chemii receptorů pro selektivní vazbu anionů je v posledních letech věnováno značné úsilí. Do kategorie neutrálních ligandů schopných komplexovat aniony bezesporu patří také molekuly obsahující amidickou funkční skupinu –NHCO–. Kromě stále se rozšiřujícího uplatnění komplexačních vlastností tohoto strukturního motivu ve všech oblastech aplikované chemie je známa také řada biologicky významných funkcí. Příkladem mohou být amidické vodíkové můstky nezbytné pro specifickou vazbu anionů v aktivních místech proteinů či enzymatické reakce zahrnující selektivní přeměny anionů^{1,2}.

Obecným záměrem našeho projektu je studium vlastností amidických ligandů, a především pochopení strukturních a elektronických aspektů ovlivňujících jejich schopnost interagovat s aniony. Experimentální i teoretický popis interakcí v komplexu prokázal přítomnost vodíkové vazby vznikající mezi anionem a amidickým vodíkem³. Je nasnadě, že vhodným výběrem substituentů lze komplexační vlastnosti amidické skupiny modifikovat, a tedy i ovlivňovat sílu této interakce. Kombinací experimentálních strukturně analytických metod s metodami teoretickými byly studovány vlastnosti sady neutrálních ligandů na bázi aromatických amidů a možnosti aktivace jejich amidické skupiny pro interakci s aniony³. Následné studie věnované komplexům umožnily nalezení a vysvětlení řady souvislostí mezi jejich vlastnostmi a vlastnostmi ligandů⁴. Finálním produktem je několik typů modelů umožňujících predikci strukturních vlastností i stability těchto komplexních sloučenin^{4,5}. Značnou výhodou tohoto přístupu je použití relativně málo náročných metod umožňujících částečně eliminovat komplikované a mnohdy málo úspěšné experimentální testy. Praktická aplikace získaných poznatků je potom orientována na řešení problémů souvisejících s vývojem nových, komplikovanějších ligandů se specifickými vlastnostmi a cílovým určením.

Projekt je podporován grantem 203/00/1011 GA ČR.

LITERATURA

1. Luecke H., Quioco F. A.: *Nature* 347, 402 (1990).
2. Schmidtchen F. P., Berger M.: *Chem. Rev.* 97, 1609 (1997).
3. Stibor I., Haffed D. S. M., Lhoták P., Hodačová J., Koča J., Čajan M.: *Gazz. Chim. Ital.* 197, 673 (1997).
4. Čajan M., Stibor I., Koča J.: *J. Phys. Chem., A* 103, 3778 (1999).
5. Čajan M., Damborský J., Stibor I., Koča J.: *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* 40, 1151 (2000).

KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE NITRODERIVÁTŮ NAFTALENU A BIFENYLU

JOSEF CVAČKA, JIŘÍ BAREK, JIŘÍ ZIMA

Katedra analytické chemie, PřF UK, Hlavova 2030, 128 43
Praha 2

Nitroderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků jsou biologicky aktivní sloučeniny, jejichž přítomnost v životním prostředí byla prokázána teprve v posledních letech. Tyto sloučeniny, přítomné v komplexních maticích ve stopových množstvích lze analyzovat kapalinovou chromatografií. Pro analýzu subnanogramových množství 1-nitronaftalenu, 2-nitronaftalenu, 2-nitrobifenyly, 3-nitrobifenyly a 4-nitrobifenyly byla navržena metoda, využívající předřazenou redukci na příslušné aminoderiváty. Výhody tohoto postupu spočívají zejména v detekci, neboť aminoderiváty lze detegovat s podstatně nižší mezí detekce než výchozí nitroderiváty. Pro redukci nitronaftalenů a nitrobifenyly bylo testováno několik postupů, z nichž nejvýhodnější se ukázala být redukce chloridem titanitým v prostředí citronanu sodného. Ke kvantitativní redukci dochází okamžitě po smísení methanolického roztoku analytu ($5 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³) s redukčním činidlem. Směs aminosloučenin vzniklých při redukci se podařilo separovat na chirální koloně Chiradex v ternární mobilní fázi methanol/acetonitril/voda, doba analýzy byla zhruba 30 min. K detekci redukovaných analytů byl využit amperometrický tenkovrstvý i tubulární detektor, chemiluminiscenční detektor a hmotnostní detektor. Tenkovrstvý amperometrický detektor s diamantovou pracovní elektrodou umožňoval detegovat aminosloučeniny až do koncentrace $1 \cdot 10^{-7}$ mol.dm⁻³, amperometrický detektor s tubulární platinovou elektrodou do koncentrace $2 \cdot 10^{-8}$ mol.dm⁻³. Vhodnost hmotnostní detekce je diskutabilní, neboť spektra jednotlivých izomerů jsou téměř identická, navíc mez detekce pro studované sloučeniny je pouze $1 \cdot 10^{-6}$ mol.dm⁻³ v APCI modu. Chemiluminiscenční detekce je zhruba stejně citlivá jako detekce fluorescenční.

IZOLACE A IDENTIFIKACE NOVÝCH DERIVÁTŮ 6-BENZYLAMINOPURINU Z BUNĚK FOTOAUTOTROFNÍ KULTURY *Chenopodium rubrum*

KAREL DOLEŽAL^{a,b}, CRISTER ÅSTOT^b,
JAN HANUŠ^c, GÖRAN SANDBERG^b,
MIROSLAV STRNAD^a

^aLaboratoř růstových regulátorů PřF UP a UEB AV ČR, Šlechtitelů 11, 783 79 Olomouc, ^bKatedra lesnické genetiky a rostlinné fyziologie SLU 901 83 Umeå, Švédsko, ^cIsotopová laboratoř UEB AV ČR Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Ve spolupráci s pracovníky Švédské zemědělské univerzity byl vypracován originální postup derivatizace cytokininů¹. To umožnilo vyvinout dostatečně citlivou metodu izolace, purifikace a identifikace nových látek cytokininové povahy z buněk fotoautotrofní kultury *Chenopodium rubrum* pomocí kapilární HPLC-frit/FAB-MS. S využitím této metody byly

identifikovány ze studované buněčné kultury 6-[2-(β-D-glukopyranosyloxy)benzylamino]purin a 6-[2-(β-D-glukopyranosyloxy)benzylamino]-2-methylthio-purin. Standardy identifikovaných sloučenin byly připraveny metodami organické syntézy. Srovnáním výsledků fyzikálně-chemického studia izolovaných látek se standardy byla dokončena jejich identifikace. Nově vyvinutá metoda pro identifikaci a kvantifikaci cytokininů pomocí kapilární HPLC-frit/FAB-MS se také ukázala být vhodnou pro kvantitativní sledování biosyntézy cytokininů prostřednictvím *in vivo* inkorporace deuteria z D₂O do cytokininů a jejich konjugátů^{2,3}. Tímto originálním postupem se také podařilo kvantifikovat rychlost biosyntézy nově objevených sloučenin a prokázat jejich endogenní původ.

LITERATURA

1. Åstot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: J. Mass Spectrom. 33, 892 (1998).
2. Åstot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: J. Mass Spectrom. 35, 13 (2000).
3. Åstot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N. H., Sandberg G.: PNAS 97, 14778 (2000).

SYNTEZA (3S)-1-JOD-3-METHYLHEPTAN-3-OLU

KATEŘINA DUDOVÁ, VÁCLAV KOZMÍK

Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, n. Čs.
Legii 565, 532 10 Pardubice

Požadovaný (3S)-1-jod-3-methyl-heptan-3-ol je prekurzorem biologicky aktivního enantiomeru methylesteru (+/-)-15-deoxy-16-hydroxy-16-methyl-prostaglandinu E₁, který je účinnou látkou v klinické praxi zavedeného preparátu s generickým názvem „Misoprostol (dosud používaný ve formě racemátu). Biologické testy ale prokázaly, že účinnou složkou racemického Misoprostolu je pouze enantiomer konfigurace (11R,16S), jehož stereogenní centra mají konfiguraci totožnou s přírodními prostaglandiny řady E₁. Ve světě, v souladu s doporučením světové zdravotnické organizace WHO, však narůstá trend důsledně používat u nově zaváděných léčiv jen jejich účinné enantiomery.

V této práci byly ověřeny nové metody přípravy racemického 1-jod-3-methyl-heptan-3-olu z ekonomicky dostupných surovin. Pro získání požadovaného (S)-enantiomeru titulní sloučeniny byly studovány možnosti štěpení racemických meziproduktů těchto syntéz:

1. Enzymatické resoluce klíčových intermediátů 2-methylhexan-1,2-diolu a 3-methylheptan-1,3-diolu dostupnými lipasami a proteasami.
2. Štěpení 2-hydroxy-2-methylhexanové kyseliny a 3-hydroxy-3-methyl-heptanové kyseliny krystalizací s dostupnými opticky aktivními bázemi.

Sharplessovou oxidací 2-butyprop-2-en-1-olu byl připraven opticky aktivní (2S)-2-methylhexan-1,2-diol jehož transformací byl získán požadovaný (3S)-1-jod-3-methyl-heptan-3-ol.

EFFECT OF COLCHICEINE ON HUMAN HEPATOCYTE: PROMISING RESULTS FOR ITS THERAPEUTIC USE

ZDENĚK DVOŘÁK

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty of Palacky University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

The development of new drugs to protect the liver against damage of various aetiology remains an important issue for biochemical and toxicological research. Colchicine (EIN) was recently reported to be a hepatoprotective agent against carbon tetrachloride in rats. Besides the *in vivo* experiments, however, there is little information about the biological activity of EIN. EIN forms complexes with divalent cations and its antimetabolic activity is negligible in comparison with that of colchicine. Recently, we published that EIN increases the levels of CYP2C9, 2E1 and 3A4 proteins in human hepatocytes, but had no effect on the levels CYP1A2, 2A6 and 2C19 (ref.¹).

In the present work, we examined the effect of EIN on CYP protein expression in primary human hepatocyte cultures. CYP mRNAs, protein levels and specific activities of CYP2C9, 2C19 and 3A4 were determined in hepatocyte cultures exposed to EIN (10 μ M). The toxicity of EIN (up to 100 μ M) was evaluated in parallel.

Based on *in vitro* experiments, we can conclude that: 1/EIN was not cytotoxic at concentration up to 10 μ M, 2/ EIN did not induce CYP2C9, 2C19 and 3A4 mRNAs, 3/EIN did not increase the catalytic activities of CYP2C9, 2C19 and 3A4 as well, 4/EIN had no effect on CYP2C19 protein level; it increased slightly the level of CYP2C9 protein. This increase can be explained by protein stabilisation and its mechanism is presently being investigated.

These data imply that the use of EIN in human medicine may be generally safe at potential therapeutic doses with CYP-induced drug-drug interactions unlikely.

This work was supported by projects GA CR 303/99/P002 and MSM 151100003.

REFERENCES

1. Dvořák Z., Ulrichová J., Modrianský M., Maurel P.: Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med. 143, 47 (2000).

BIODEGRADACE FENOLU BAKTERIÍ *Rhodococcus erythropolis* A KVASINKOU *Candida maltosa*

ARIANA FIALOVÁ, ALENA ČEJKOVÁ, JAN MASÁK

Vysoká škola chemicko-technologická, ÚKCHB, Technická 5, 166 28 Praha 6

Produkce fenolických sloučenin jako odpadních látek z průmyslových procesů způsobuje vážné zatížení životního prostředí. Fenolickými látkami znečištěné lokality je možno de-

kontaminovat tradičními fyzikálně-chemickými technikami, ale nynější biodegradční metody nabízejí relativně nízké náklady a také možnost úplné mineralizace těchto toxických sloučenin. Porozumění mechanismům enzymové katalýzy v degradční dráze fenolu je tudíž důležitou součástí komplexního studia biodegradace fenolu.

Tato práce je zaměřena na biodegradční procesy u mikroorganismů využívajících fenol (*Rhodococcus erythropolis* a *Candida maltosa*).

Půdní bakterie *R. erythropolis* a kvasinka *C. maltosa* hydroxylují fenol v reakci katalyzované nikotinamid adenin dinukleotid fosfát FAD – dependentní monooxygenasou. Tato reakce je první v metabolické sekvenci utilizace dané aromatické sloučeniny jako jediného zdroje uhlíku a energie. Fenolhydroxylasa hydroxyluje fenol na katechol a katechol 1,2-dioxygenasa poté katalyzuje reakci katecholu na *cis,cis*-mukonát.

Biodegradční schopnost daných mikroorganismů byla testována ve vztahu k podmínkám vnějšího prostředí (typ média, teplota) a ve vztahu k prvním enzymům degradční dráhy fenolu (fenolhydroxylasa EC 1.14.13.7, katechol 1,2-dioxygenasa EC 1.13.11.1). Byla sledována účinnost dezintegrace a vliv použitého typu procesu dezintegrace na dané enzymové aktivity. Také byla studována závislost koncentrace fenolu a fáze růstu mikroorganismů na aktivitu fenolhydroxylasy, která byla měřena během kultivace.

Naměřené výsledky jsou jednak podkladem pro další výzkumy v oblasti enzymového vybavení kvasinky *C. maltosa* a bakterie *R. erythropolis* a jednak pro potenciální praktické využití těchto mikroorganismů pro dekontaminaci fenolickými látkami znečištěných lokalit.

SUBSTRATE SPECIFICITY OF β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES OF VARIOUS ORIGIN

P. FIALOVÁ, L. HUŠÁKOVÁ, Z. HUNKOVÁ, M. KUZMA, L. WEIGNEROVÁ, V. KRÉN

Institute of Microbiology, Laboratory of Biotransformation, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic, e-mail: fialovap@biomed.cas.cz

Glycosyltransferases and also glycosidases are able to use various unnatural (modified) substrates. We have recently demonstrated that some β -N-acetylhexosaminidases accept 6-O-acylated glycosyl donors and even catalyse their transglycosylation giving yield to modified oligosaccharides¹.

We are just investigating the influence of N-acyl modification on the activity of β -N-acetylhexosaminidases concerning the affinity to the modified structures and possibly the transglycosylation potential. Some scarce information on this topic has also appeared in the literature.² For the aim of this project, we synthesised *p*-nitrophenyl 2-(trifluoroacetyl)amido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside starting from GlcNH₂.HCl. The synthesis route includes several steps *via* 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl chloride rearranged to 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-amino-2-deoxy- α -D-glucopyranoside hydrochloride, which was selectively N-trifluoroacetylated,

converted to a bromide and consequently to a *p*-nitrophenyl glycoside (Ag_2CO_3 , lutidine).

A wide enzymatic screening comprising our enzymatic library of fungal glycosidases and several animal and plant enzymes for the possible cleavage and activation or inhibition effects of this substrate was performed. With some enzymes (esp. β -*N*-acetylhexosaminidase from bovine epididymis and from jack beans) this substrate caused a significant increase in the affinity to the standard substrate (*p*-NP- β -GlcNAc). Furthermore, β -*N*-acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum* was able to hydrolyze it slightly. Our proposed mechanism for this behaviour is that β -*N*-acetylhexosaminidase willingly accepts this substrate into its active site but is unable to split its glycosidic bond effectively enough and, therefore, exhibits a certain level of inhibition.

These results indicate that although the substrate specificity of β -*N*-acetylhexosaminidases is low enough to accept and even transglycosylate some significantly modified substrates, the replacement of an *N*-acetyl group by a sterically similar *N*-trifluoroacetyl group is unacceptable. However, glycosyl fluorides are widely used in enzymatic reactions for the study of reaction mechanisms and in glycosylations.

Support by the grant 303/99/1382 from the Grant agency of the Czech Republic is highly acknowledged.

REFERENCES

1. Hušáková L., et al.: Carbohydr. Res., in press (2001).
2. Mariam G., et al.: Carbohydr. Res. 47, 188 (1976).

FOTOAFINITNÍ ZNAČENÍ AKTIVNÍHO CENTRA CYP2E1 FLUORONITROANISOLY

TOMÁŠ FRONĚK, PETR HODEK, MARIE STIBOROVÁ

Přírodovědecká fakulta UK, katedra biochemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2

Cytochromy P450 (CYP) jsou majoritní enzymy biotransformující xenobiotika. Poznání architektury aktivního centra CYP umožňuje předpovídat, jakým způsobem bude xenobiotikum v organismu CYP přeměňováno. To je stěžejní pro předpovězení jeho potenciální toxicity, karcinogenity či mutagenity. Umožňuje rovněž konstrukci léčiv s protražovaným účinkem nebo léčiv inhibujících CYP.

Jedna z účinných metod vhodných pro studium aktivního centra CYP je metoda fotoafinitního značení. Ta umožňuje pomocí tzv. fotoafinitní sondy identifikovat aminokyseliny aktivního centra izoformy CYP, pro něž je sonda substrátem.

Poznání fotoafinitních sond CYP2E1 je středem zájmu řady laboratoří, jelikož *i*) CYP2E1 je jeden z nejdůležitějších CYP, který se účastní chemické kancerogeneze a *ii*) dosud nebyly nalezeny žádné vhodné sondy pro značení tohoto CYP.

Na základě metabolických studií s nitroanisoly, jenž jsou specifické substráty pro CYP2E1, jsme jako fotoafinitní sondy navrhli 2-fluoro-4-nitroanisol (2FNA) a 4-fluoro-2-nitroanisol (4FNA), které jsou potenciálně fotolabilní.

V prvním kroku byly prováděny metabolické studie za účelem zjištění, zda jsou 2FNA a 4FNA skutečně substráty CYP2E1 nebo jiné izoformy CYP. Neefektivněji byly 2FNA a 4FNA metabolizovány, v souladu s našimi předpoklady, mikrosomy izolovanými z jater potkana či králíka obsahujícími CYP2E1, dále pak mikrosomy obsahujícími CYP2B. Tyto výsledky byly potvrzeny inhibičními experimenty se specifickými inhibitory jednotlivých izoformem CYP a též sledováním ovlivnění přeměny specifických substrátů jednotlivých izoformem CYP testovanými fluoronitroanisoly. Dále byly testovány fotochemické vlastnosti studovaných fluoronitroanisolů. 2FNA se projevil jako látka vysoce fotolabilní, která již po velmi krátké expozici UV zářením poskytuje fotosubstituční produkt s nukleofily (proteiny). Naopak 4FNA vykazuje podstatně horší fotochemické vlastnosti.

Z výsledků vyplývá, že 2FNA je unikátní sonda potenciálně velmi vhodná pro modifikaci aktivního centra CYP2E1, popř. CYP2B. Poznání aminokyselin katalytické domény těchto enzymů modifikovaných nalezenou selektivní sondou, je stěžejní pro vyřešení architektury aktivního centra obou cytochromů P450.

Podporováno GAUK (246/1999) a MŠMT ČR (MSM 1131 00001).

POUŽITÍ METODY LFER K CHARAKTERIZACI INTERAKČNÍCH MECHANISMŮ V ELEKTROMIGRAČNÍCH SEPARAČNÍCH METODÁCH

KATEŘINA GOGO VÁ

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, PřF UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Kapilární elektroforéza je již řadu let stěžejní separační metodou v oblasti ionogenních látek (rutinně pro klinické aplikace, analýzy DNA, chirální analýzy a analýzy kovů). Její použití se nadále významně rozšířilo s vývojem elektrochromatografických metod, kde jsou výhodně kombinovány elektro-migrační principy s chromatografickými (vysoká účinnost elektro-migračních metod s vysokou selektivitou stacionárních nebo nabitých látek mezi volný roztok a micely využívá micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Dalším slibným směrem se zdá být použití nabitých lineárních polymerů, které mohou ovlivňovat migraci analytů i tehdy, nejsou-li zesíťovány či přítomny ve formě micel.

Zaměřili jsme se na srovnání selektivity separace v systémech s nabitým lineárním polymerem (poly(diallyldimethylamonium chlorid), PDA) a monomery podobného chemického složení (trimethylamonium chlorid, TMA, triethylamonium chlorid, TEA, dimethylpyrolidinium chlorid, DMP). Z experimentálně získaných retenčních faktorů plyne, že ačkoliv i monomerní aditiva vnášejí do systému retenci, polymerní struktura je rozhodujícím faktorem při separaci. Pro srovnání selektivity separace v systému s nabitým lineárním polymerem (Polybrene) a micelárním systémem (oktyltrimethylamonium bromide, OTMA, pod i nad krickou micelární

koncentrací) jsme použili model „linear free energy relationship“ (LFER). Model vychází z korelace experimentálně získaných výsledků (zde retenční faktor, nebo enzymová aktivita apod.) a solvatačních parametrů jednotlivých analytů (dostupné v literatuře). Výsledkem jsou pak parametry charakterizující vlastnosti pseudostacionární fáze (hydrofobicitu a další typy možných interakcí). Pro polymerní systém je významná π - π interakce a interakce n - n elektronů, v případě micelárního systému přistupuje ještě parametr charakterizující hydrofobicitu a schopnost tvorby kavity, což je v souladu s micelární teorií.

7-HYDROXYLOVANÉ EPIMERY DEHYDROEPIANDROSTERONU V LIDSKÉM SÉRU A VE SLINÁCH: SROVNÁNÍ GC/MS A RADIOIMUNOANALÝZY

H. HAVLÍKOVÁ^a, M. HILL^a, O. LAPČÍK^a,
R. MORFIN^b, R. HAMPL^a

^aInstitute of Endocrinology, 116 98 Praha 1, ^bConservatoire National des Arts et Metiers, Paris

Citlivá a přesná metoda stanovení 7-hydroxylovaných epimerů dehydroepiandrosteronu (7-OH-DHEA) je předpokladem ke studiu jejich biologických funkcí zahrnujících antiglukokortikoidní a imunomodulační účinky, nebo aktivační účinky jejich 7-oxo metabolitů v respiračním řetězci. Hladina těchto steroidů v lidském séru vykazuje pohlavní a věkovou závislost. Zvýšená hladina 7 α -OH-DHEA byla nalezena v séru pacientů trpících Alzheimerovou chorobou. V této souvislosti se nabízí studium role těchto steroidů v centrálním nervovém systému a u pacientů s autoimunitním onemocněním.

Byla tedy vytvořena a ověřena nová metodika GC/MS stanovení 7-OH-DHEA, a ta byla porovnána s dříve popsanou

metodou radioimunoanalytickou. Hladiny 7 α -OH-DHEA a 7 β -OH-DHEA byly měřeny nejen v lidském séru, ale také ve slinách, kde byly nalezeny asi pětikrát nižší koncentrace. V obou tělních tekutinách byla prokázána silná korelace mezi hladinami epimerů 7-OH-DHEA. Ve slinách mužů byly naměřeny vyšší hladiny obou epimerů než u žen analogicky k vyšším hladinám jejich steroidního prekurzoru DHEA v séru. V této souvislosti se nabízí neinvazivní stanovení 7 α -OH-DHEA a 7 β -OH-DHEA ve slinách při hodnocení imunitní odpovědi organismu jako vhodná alternativa ke stanovení v séru.

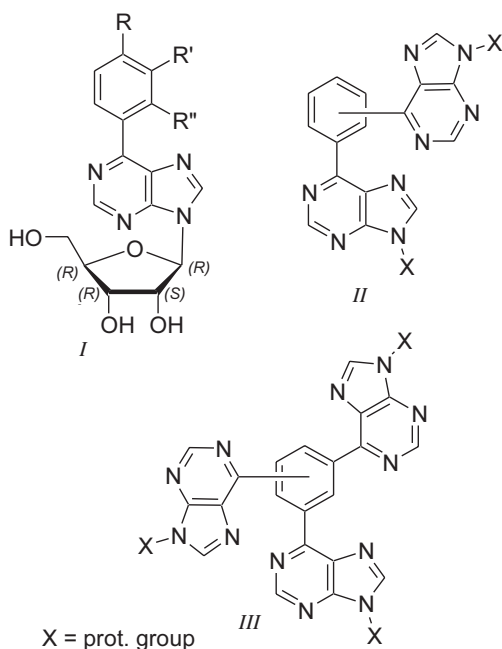
ANALÝZA PLAZMIDOVÉ DNA BAKTERIÁLNÍHO KMENE *Alcaligenes* sp. a8

VĚRA HEJKALOVÁ, PAVEL ULBRICH,
HYNEK STRNAD, VÁCLAV PAČES

Centrum molekulární genetiky, Ústav molekulární genetiky,
VŠCHT AV ČR, Praha

Polychlorované bifenylly (PCBs) jsou závažnými xenobiotiky životního prostředí. Při jejich bakteriálním odbourávání vznikají limitní meziproducty – chlorbenzoáty (CBs). Bakteriální kmen rodu *Alcaligenes* sp. A8 byl izolován pro svou schopnost degradovat chlorbenzoáty, konkrétně 2,5-dichlorobenzoát. Bylo prokázáno, že geny kódující proteiny podílející se na degradaci CBs jsou lokalizovány na plazmidové DNA. Jedná se o geny dolní metabolické dráhy odbourávání PCBs (tzv. „ortho cleavage pathway“), kdy dochází ke štěpení aromatického jádra a odbourání CBs až na trikarboxylové kyseliny. Získání úplné genetické informace uložené v plazmidové DNA a charakterizace degradační dráhy by mohlo přispět k osvětlení mechanismu regulace těchto genů a umožnit další cílené manipulace vedoucí ke zlepšení degradability i jiných vlastností tohoto kmene.

Pro získání úplné sekvence plazmidové DNA je třeba vycházet z dostatečného množství čisté DNA. Byla optimalizována metoda izolace a purifikace megaplazmidu. Čistá plazmidová DNA byla získána metodou izolace pomocí CTAB a purifikace centrifugací v CsCl gradientu. Pro získání nukleotidové sekvence plazmidové DNA byly zvoleny dvě vzájemně se doplňující strategie. První spočívá ve vytvoření plazmidové (pUC19) knihovny (SacI, HindIII.) o velikosti fragmentů 4–15 kb. Tyto plazmidové klony jsou dále sekvencovány metodou shotgunového sekvenování. V druhé strategii je celkově izolovaná DNA parciálně štěpena restrikcí endonukleasami (Sau 3A, Hin PI) a fragmenty o vhodné velikosti (1–2 kb) jsou ligovány do linearizovaných (Bam HI, Acc I) sekvenčních vektorů pUC19 a M13mp18. Sekvence je prováděna Sangerovou dideoxy metodou s použitím fluorescenčně značených primerů a automatického sekvenátoru A.L.F. Express sequencer (Pharmacia). Sekvenční data jsou dále editována, skládána do kontigů a analyzována. Nyní je projekt ve fázi skládání jednotlivých kontigů a jejich následné analýzy (vyhledávání ORFů, porovnání jejich aminokyselinové sekvence s aktuální databankou všech proteinů.). Byl identifikován klastr genů tzv. „ortho cleavage pathway“, které jsou zodpovědné za biodegradační schopnosti kmene *Alcaligenes* sp. A8.



**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY
OF 6-ARYLPURINES: NUCLEOSIDES
AND ANALOGUES OF BASE-PAIRS OR TRIPLETS**

**MICHAL HOCEK^{a*}, DALIMIL DVOŘÁK^b,
MARTINA HAVELKOVÁ^b, ANTONÍN HOLÝ^a**

^a*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 166 10 Prague 6, e-mail: hocek@uochb.cas.cz,* ^b*Prague Institute of Chemical Technology, 166 28 Prague 6*

Structural modifications of biogenic purine bases and nucleosides very often lead to their antimetabolites displaying diverse types of biological activity (antiviral, antitumor etc.). Within the framework of our systematic investigation¹ of purine derivatives bearing carbon substituents in the position 6 we have developed a new facile and efficient method for the synthesis² of 6-arylpurines based on the Suzuki-Miyaura reactions of 6-halopurines with arylboronic acids. A significant cytostatic activity has been discovered³ in several substituted 6-phenylpurine ribonucleosides 1. The series of nucleosides of this type has recently been extended to sugar- (deoxy- and acyclonucleosides)⁴ and base-modified (6-aryl-, 6-hetaryl- and 6-benzylpurine derivatives) analogues. Synthesis and structure-activity relationship of this class of compounds will be discussed in the first part of the presentation. In another direction of our current research we focus on the synthesis of novel covalently linked analogues of Watson-Crick base pairs or Hoogsteen triplets consisting of two or three purine and/or pyrimidine rings linked by diverse types of carbon linkers (e.g. phenylene, alkylidene etc.) as shown in two very recent examples: syntheses of bis(purin-6-yl)benzenes 2 and tris(purin-6-yl)benzenes 3 making use of double Stille coupling of bis(tri-alkylstannyl)benzenes with 6-halopurines or cyclotrimerizations⁵ of 6-alkynylpurines, respectively. Synthetic approaches to these and many other types of base-pairs/triplets analogues will be the subject of the second part of the presentation.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grants No. 203/98/P027, 203/00/0036 and 203/96/K001). It was performed within the framework of the Research Project Z4 055 905.

REFERENCES

1. Hocek M: Chem. Listy 94, 978 (2000).
2. Havelková M., Hocek M., Česnek M., Dvořák D.: Synlett 1999, 1145.
3. Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: J. Med. Chem. 43, 1817 (2000).
4. Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 1683 (2000).
5. Hocek M., Starý I., Stará I. G., Dvořáková H.: Tetrahedron Lett. 42, 519 (2001).

**KOMBINATORICKÁ CESTA K PIKOMOLÁRNÍMU
INHIBITORU LÉKOVÉ REZISTENTNÍCH HIV-1
PROTEAS**

**MARTIN HRADÍLEK, CYRIL BAŘINKA,
MARKÉTA RINNOVÁ, JAN WEBER,
MILAN SOUČEK, JAN KONVALINKA**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Navrhli, a s využitím Fmoc/*terc*.Bu orthogonálního chránění, jsme na Rink-Amid MBHA pryskyřici syntetizovali knihovnu pseudopeptidů s obecným vzorcem Cbz-izoster-Aaa-Xxx-NH₂. Použili jsme celkem šest izosterů a v pozicích Aaa a Xxx 48 různých α-aminokyselin (Aaa = jednotlivé aminokyseliny; Xxx = ekvimolární směs všech 48 aminokyselin). Bylo tak připraveno celkem 6 podknihoven, přičemž každá obsahovala 48 směsí 48 různých pseudopeptidů.

U jednotlivých směsí pak byla zjišťována inhibiční aktivita k čtyřem HIV-1 proteasám: Přirozené (wild type) HIV-1 PR^{WT}, a dále k proteasám rezistentním vůči používaným léčivům: Saquinaviru HIV-1 PR^{SAQ} (mutace G98V, L90M); Indinaviru HIV-1 PR^{IND} (mutace V82A); Ritonaviru HIV-1 PR^{RIT} (mutace A71V, V82T, I84V).

Po vyhodnocení výsledků byly syntetizovány jednotlivé složky těch směsí, které vykazovaly inhibiční aktivitu k jednotlivým proteasám. S využitím stejných syntetických metod, jako v případě směsí, bylo připraveno šest řad pseudopeptidů, celkem 288 jednotlivých látek.

Syntetizované pseudopeptidy byly jednotlivě podrobeny testování se čtyřmi zmíněnými proteasami.

Tři neaktivnější sloučeniny byly vyčištěny HPLC a byla přesně stanovena jejich inhibiční aktivita k přirozené i k mutantním proteasám. Všechny tři látky jsou subnanomolárními inhibitory HIV-1 PR^{WT} při pH 4,7 a vykazují značnou inhibiční aktivitu i vůči rezistentním mutantním proteasám. Neaktivnější sloučenina Cbz-Pst-Glu-Hph-NH₂ je pikomolárním inhibítorem přirozené HIV proteasy a subnanomolárním inhibítorem všech testovaných rezistentních proteas.

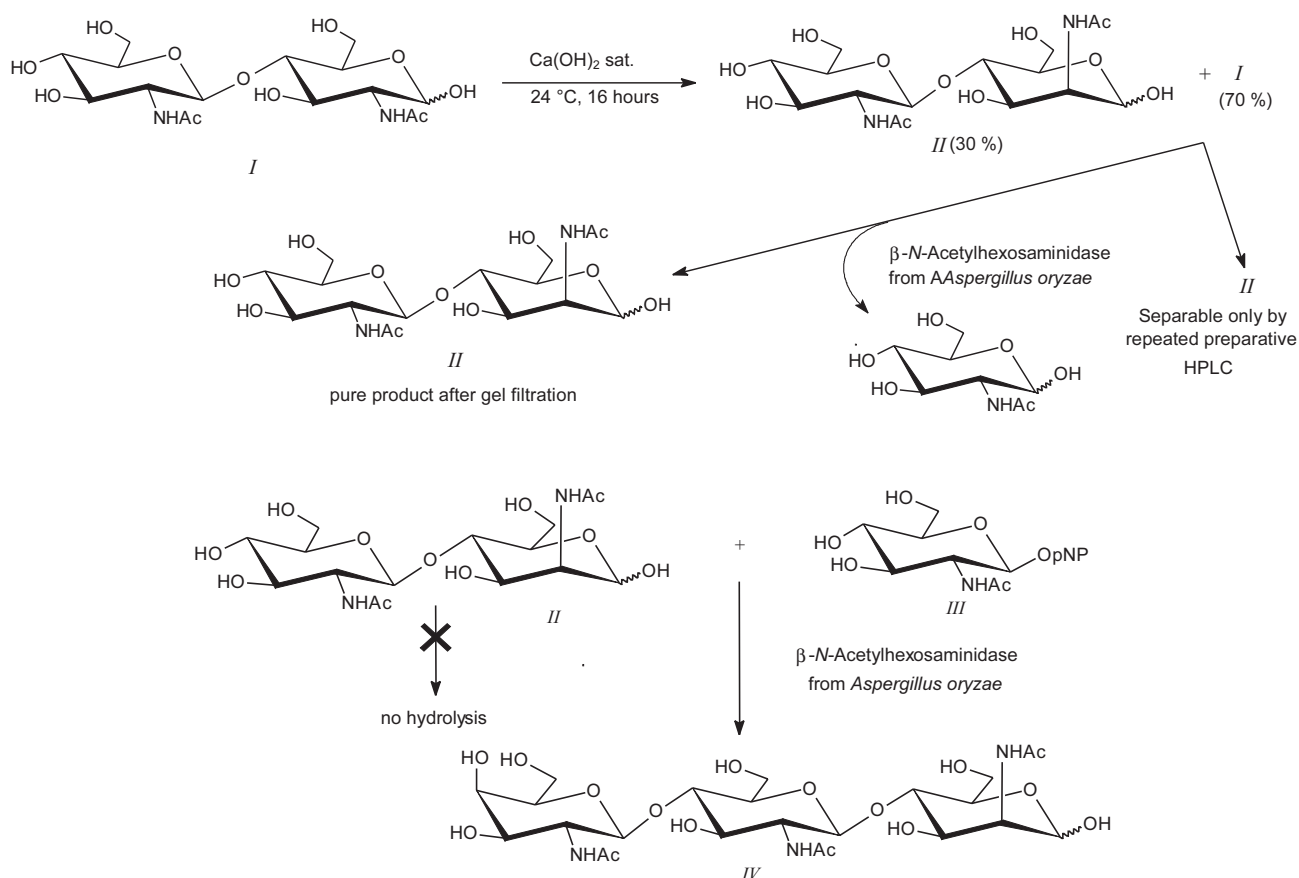
Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.

**ENZYMATIC SYNTHESIS
OF N-ACETYLMANNOSAMINE
CONTAINING OLIGOSACCHARIDES
AND THEIR IMMUNOACTIVITY**

**L. HUŠÁKOVÁ^a, V. KŘEN^a, M. KUZMA^a,
E. HERKOMEROVÁ^a, K. BEZOUŠKA^b**

^a*Institute of Microbiology, Laboratory of Biotransformation, 142 20 Prague 4,* ^b*Faculty of Science, Charles University Prague, 128 40 Prague 2, e-mail: husakova@biomed.cas.cz*

ManNAc containing oligosaccharides are important immunodeterminants of some pathogenic bacteria. Occurrence of ManNAc is often linked to virulence and evading from the immunity surveillance.



GlcNAc β 1 \rightarrow 4ManNAc (*II*) was prepared from chitobiose (*I*) by Lobry de Bruyn – Alberda van Ekenstein rearrangement under catalysis of Ca(OH)₂. Resulting mixture is separable with difficulty only by analytical HPLC. Chitobiose in reaction mixture was selectively removed by hydrolysis by β -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*; GlcNAc β 1 \rightarrow 4ManNAc is resistant to the enzyme hydrolysis. Resulting disaccharide can be easily isolated by gel filtration. Analogous epimerization of GalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc is possible as well.

Trisaccharide GalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4ManNAc (*IV*) was prepared by enzymatic transglycosylation of pNP-GalNAc (*III*) onto GlcNAc β 1 \rightarrow 4ManNAc (*II*) catalyzed by β -N-acetylhexosaminidase from *A. oryzae*. Hybrid linear trisaccharide was identified as one of the strongest oligosaccharidic ligands of NK-cell activating receptor NKR-P1.

VYUŽITÍ KOMPATIVNÍ PCR PŘI MONITOROVÁNÍ B-LYMFOPROLIFERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ

R. IVÁNEK, J. ČERNÝ, A. SLAVÍČKOVÁ

1. Interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha

Přítomnost molekulárních markerů u mnohých hematologických onemocnění umožňuje využití vysoce citlivé metody PCR k sledování léčby a detekci minimální reziduální choro-

by. Avšak vzhledem k možnému přetrvávání pozitivitu, která může být nadto způsobena např. rezidui buněk po chemoterapii, je vhodnější použít některou z metod kvantitativní PCR (Q-PCR), a tak včas odhalit možnou klonální expanzi. K metodám Q-PCR dobře aplikovatelným na klinických pracovištích patří komparativní PCR, což je koamplifikace sekvence specifické pro chorobu a sekvence interního standardu systémem rozdílných primerů, nazývanou též multiplex PCR.

Touto prací prezentujeme možnost kvantifikace klonálního přeskupení genů pro těžký imunoglobulinový řetězec (IgH) jakožto markeru B-lymfoproliferativního onemocnění a srovnávacího markeru – 61. exon H-ras (Harvyho ras) protoonkogeny. Metoda vychází z porovnávání dvou nebo více diagnostických vzorků z různých období léčby pacienta v jedné PCR. Množství produktů amplifikace jsou kvantifikována softwarovou analýzou digitalizovaného záznamu elektroforetického gelu, přičemž je možno dojít buď k relativním výsledkům popisujícím vzestup nebo pokles markeru maligních buněk v porovnávaných vzorcích nebo i k absolutním výsledkům odečteným z kalibrační křivky, která je získána amplifikací DNA linie nesoucí stejný specifický marker v téže PCR. Pro ověření klinického významu byly výsledky komparativní PCR IgH/ras porovnávány s ostatními konvenčními laboratorními vyšetřeními a korelovány s klinickým stavem pacientů. Z našich pozorování vyplývá, že tato metoda by mohla najít uplatnění při terapeutických rozhodnutích.

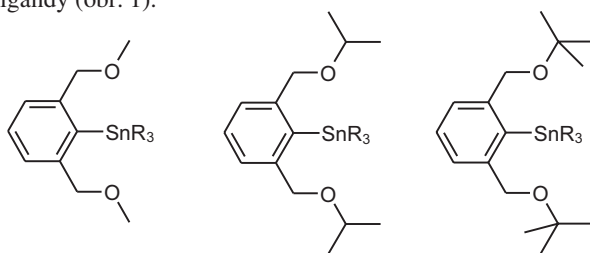
Tato práce je podporována grantem MŠMT CEZ: J13/98: 1111/00004.

STUDIUM STRUKTURY ORGANOCÍNIČITÝCH SLOUČENIN OBSAHUJÍCÍCH O, C, O-,PINCER“ LIGANDY

ROMAN JAMBOR, ALEŠ RŮŽIČKA,
LIBOR DOSTÁL, JAROSLAV HOLEČEK

Katedra obecné a anorganické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, e-mail: roman.jambor@upce.cz

V současné době je naše studium zaměřeno na strukturní vlastnosti organocíničitých součenin obsahujících potenciaální terdentální Y, C, Y-chelátující ligandy (Y = N, O, P). Velmi málo výsledků je známo v naší zkoumané oblasti organocíničitých sloučenin obsahujících O, C, O-,pincer“ ligandy (obr. 1).



R = aryl, halogen

Obr. 1. Studované organocíničité sloučeniny

Studované sloučeniny vykazují řadu velice zajímavých vlastností, zejména strukturních a fyzikálních. Strukturní vlastnosti byly studovány zejména pomocí RTG difrakce na monokrystalickém materiálu, NMR v roztocích a tuhé fázi a některých dalších metodik.

LITERATURA

1. Mehring M., Schürmann M., Jurkschat K.: *Organometallics* 17, 1227 (1998).
2. Císařová I., Jambor R., Růžička A., Holeček J.: *Acta Cryst., Sect. C*, v tisku.
3. Jambor R., Růžička A., Brus J., Císařová I., Holeček J.: *Inorg. Chem. Commun.*, v redakci.

SERINE PROTEINASE INHIBITORS IN AGGREGATED FORMS OF BOAR SEMINAL PLASMA PROTEINS

P. JELÍNKOVÁ^a, P. MAŇÁSKOVÁ^a, M. TICHÁ^b,
V. JONÁKOVÁ^a

^aInstitute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ^bDepartment of Biochemistry, Charles University, Prague, Czech Republic

Under physiological conditions most boar seminal plasma proteins are present as aggregates (Jonáková et al., 2000). Only a small portion of proteins was found in the low molecular

weight fraction corresponding to monomers or dimers. Study of the composition of protein-aggregated forms containing serine proteinase inhibitors is the subject of the present communication. Boar seminal plasma proteins were separated by gel chromatography into five fractions. Most inhibitors were found in fraction V ($M_r \sim 5\,000\text{--}20\,000$), less in fraction I ($M_r > 150\,000$). Fraction V was further separated by RP HPLC. Isolated proteins were characterized by SDS-PAGE and immunoblotting, N-terminal amino acid sequencing and the determination of proteinase inhibition activity. The following protein components were identified:

Fraction V	M_r	N-terminal sequence	Immuno-detection
β -Micro-seminoprotein	10 000	ZCYFIP ...	–
Proteinase inhibitor	7 500	KKTRKEPD...	–
AQN 1 spermadhesin	13 000	AQNKGPBK...	anti-AQN 1
Lactoferrin	70 000	anti-lactoferrin

To study the possible complexes of proteinase inhibitors, fraction V was separated by gel chromatography. Proteinase inhibitor ($M_r \sim 7\,500$) was eluted either alone or with the spermadhesin AQN 1. This fact might indicate the formation of an associated form of these two components.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grants Nos. 303/99/0357 and 524/96/K162; grant No. MSM 113100001.

FUNKČNÍ ANALÝZA C-KONCE PROTEINU NHA1 Z KVASINKY *Saccharomyces cerevisiae*

OLGA KINCLOVÁ

Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, kinclova@biomed.cas.cz

Pro všechny živé organismy je nezbytné zachovávat stále hladiny iontů uvnitř buněk. Jedním z nejdůležitějších kationtů buněčné cytoplazmy kvasinek je K^+ , který se účastní mnoha fyziologických procesů (např. regulace buněčného objemu a vnitrobuněčného pH). Naopak vysoká koncentrace Na^+ či Li^+ je pro většinu buněk toxická. Na^+/H^+ antiportery patří mezi transportní systémy, které antiportním mechanismem využívajícím gradient protonů přes membránu efektivně eliminují toxické kationty z buněk. Gen *NHA1* kvasinky *S. cerevisiae* kóduje Na^+/H^+ antiporter plazmatické membrány dlouhý 985 aa. Na rozdíl od homologních Na^+/H^+ antiporterů z jiných kvasinek, protein *Nha1* má extrémně dlouhý hydrofilní C-konec (554 aa, 56,2 % z celého proteinu) a transportuje přes membránu kromě Na^+ a Li^+ také K^+ a Rb^+ . Pro zjištění funkce C-konce *Nha1p* a jeho vlivu na aktivitu a substrátovou specifitu přenašeče bylo zkonstruováno 13 postupně zkracovaných verzí genu *NHA1*, od kompletního (2955 nt, 985 aa) po nejkratší (1416 nt, 472 aa) končící pouze 41 aminokyselinových zbytků za poslední transmembránovou oblastí, které byly

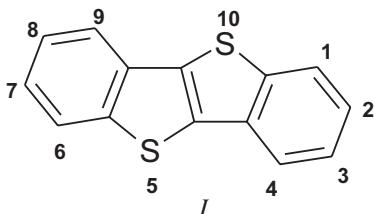
funkčně exprimovány v kmeni *S. cerevisiae* citlivém k alkalickým kationtům (B31, genotyp *nha1Δena1-4Δ*). Pomocí fluorescenčního značení GFP (green fluorescent protein) byly příslušné proteiny lokalizovány v plazmatické membráně. Testováním buněk nesoucích různé verze Nha1p na toleranci k vysokým koncentracím alkalických kationtů a měřením výstupu kationtů z buněk byla identifikována oblast C-konce Nha1p důležitá pro zachování maximální transportní aktivity Nha1p pro ionty Na⁺, Li⁺ a Rb⁺. Na druhou stranu bylo zjištěno, že C-konec proteinu Nha1 není důležitý pro toleranci buněk k vysokým vnějším koncentracím K⁺. Hraje však významnou roli 1) v regulaci obsahu vnitrobuněčného K⁺, čímž přenašeč přispívá k zachování objemu a cytoplazmatického pH buňky, a 2) v buněčné odpovědi k náhlým změnám osmolarity prostředí.

SYNTÉZA, REAKTIVITA A APLIKACE [1]BENZOTHIENO[3,2-*b*][1]BENZOTHIOFENU

**BEDŘICH KOŠATA, VÁCLAV KOZMÍK,
JÍŘÍ SVOBODA**

Ústav organické chemie, VŠCHT, 166 28 Praha 6, e-mail: kosatab@vscht.cz

Systematický výzkum v oblasti kondenzovaných heteropentalenů¹⁻³ vedl k návrhu [1]benzothieno[3,2-*b*][1]benzothiofenu (*I*) jako potenciálního jádra látek s kapalně krystalickými vlastnostmi. V této práci shrnujeme výsledky studia jak syntézy tak reaktivity heterocyklu 1.



Prokázali jsme, že elektrofilní substituce probíhají v látce 1 do poloh 2 a 4. Regioselektivitu substituce lze řídit reakčními podmínkami za tvorby 2-substituovaných derivátů. Substituce do druhého stupně pak vedou přednostně k 2,7-disubstituovaným sloučeninám. Nitroderiváty byly využity k syntéze alkoxy substituovaných derivátů heterocyklu 1 nukleofilními substitucemi. Metalace látky 1 následovaná reakcí s vhodným elektrofilem je cestou pro selektivní přípravu 1-substituovaných derivátů.

Výsledky studia reaktivity [1]benzothieno[3,2-*b*][1]benzothiofenu jsme aplikovali na přípravu série 2,7-diacyl- a 2,7-dialkylderivátů. Bylo zjištěno, že v této sérii tvoří některé deriváty jednu a více kapalně krystalických mezofází⁴.

LITERATURA

1. Váchal P., Pihera P., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 62, 1468 (1997).
2. Pihera P., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 58 (2000).

3. Pihera P., Paleček J., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 63, 681 (1998).
4. Košata B., Kozmík V., Svoboda J., Novotná V., Vaněk P., Glogarová M.: 6th European Conference on Liquid Crystals, March 25–30, 2001, Halle, Germany.

OPTIMALIZACE SYNTÉZY PREKURZORŮ ANALOGŮ HMYZÍCH JUVENILNÍCH HORMONŮ¹

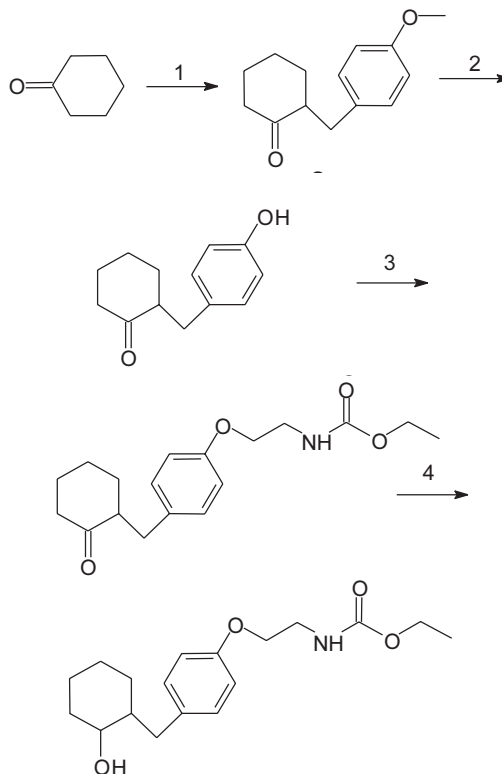
P. KRATINA^a, J. MORAVCOVÁ^a, Z. WIMMER^b

^aVŠCHT, Technická 5, 160 28 Praha 6, ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Juvenilní hormony i jejich syntetické analogy hrají důležitou úlohu při vývoji a rozmnožování hmyzu. Pro tuto vlastnost v současné době zastupují skupinu účinných novodobých insekticidů².

Příprava jedné ze základních struktur je znázorněna ve schématu. Reakce 2, ochrání fenolové skupiny, probíhala³ s malou výtěžností (do 50 %) a produkt byl obtížně izolovatelný. Hydrolyza etherické vazby se prováděla působením konc. HBr v prostředí acetonhydridu. Produkt se zpracovával přidáním vody a CaCO₃ a extrahoval se do diethyl etheru. Extrakce byla znepříjemněna přítomností suspenze anorganických solí ve vodné i organické fázi. Při optimalizaci syntézy jsme navrhli použití PTC (Phase Transfer Catalyst) pro usnadnění kontaktu reaktantů. Vybrali jsme tributylamonium sulfát a tetrabutylfosfonium bromid. Reakce⁴ probíhaly bez rozpouštědla, výtěžek vzrostl nad 80 %.

Následující cíle jsou ověřit reakce 3 a 4 a dále navrhnout přípravu alkyl-*O*-glykosidů.



Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.

LITERATURA

1. Projekt COST D10/0005/98 (D10.10).
2. Hrdý I., Kuldová J., Wimmer Z.: *Vesmír* 79, 636 (2000).
3. Wimmer Z., Romaňuk M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 46, 2573 (1981).
4. Hwang K., Park S.: *Syn. Commun.* 1993, 2845.

KONSTRUKCE A EVALUACE MODELU SAVČÍHO CYTOCHROMU P450 2B4

B. KUBÍČKOVÁ, L. ANTONOVIČ, B. SOPKO, P. HODEK

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny účastníci se metabolismu např. hormonů, léčiv, polutantů, kancerogenů. Přeměna těchto látek cytochromy P450 vede k exkreci z organismu nebo jejich toxifikaci či aktivaci na mutageny. Proto jsou tyto enzymy předmětem intenzivního výzkumu. Odhalení struktury jejich aktivního centra, kde dochází k metabolické přeměně substrátů, má zásadní význam pro pochopení vztahu struktury a funkce CYP v procesu aktivace kancerogenů a metabolismu léčiv. Naš výzkum je proto zaměřen na konstrukce 3D modelu aktivního centra CYP 2B4 a jeho validace metodou fotoafinitního značení.

Technika homologního modelování je založena na předpokladu podobnosti globální struktury námi studovaných savčích a mikrobiálních CYP, jejichž struktura je díky X-paprskové krystalografii známa. Jako templát pro modelování byl tedy použit mikrobiální CYP 102, který je považován za strukturně nejbližší savčím CYP. Po predikci sekundární struktury CYP 2B4 bylo provedeno vzájemné přiřazení sekvencí s CYP 102 (zohledňující globální podobnosti). S použitím strukturálního templátu (CYP 102) byl konstruován 3D model CYP 2B4 a „dokován“ hem. Energetickou optimalizací byl získán homologní 3D model CYP 2B4.

Model CYP 2B4 byl ověřován dokováním specifického substrátu CYP 2B4, diamantanu. Nalezená orientace diamantanu v aktivním centru (vzhledem k hemu) je v souladu s experimentálně prokázanou hydroxylací této látky v poloze 3. K dalšímu potvrzení modelu byly využity výsledky získané z fotoafinitního značení aktivního centra CYP 2B4 pomocí tří sond: *N*-(*p*-azidobenzyl)-*N*-methyl-*p*-aminobenzylamin (I), *N*-(*p*-azidobenzyl)-*N*-methyl-*p*-aminophenethylamin (II) a *N*-(*p*-azidophenethyl)-*N*-methyl-*p*-aminophenethylamin (III). Vzhledem k tomu, že lze předpokládat vazbu těchto sond na hem CYP, je možno identifikovat aminokyselinové zbytky ve vzdálenosti dané délkou molekuly sondy od atomu železa hemu. Pomocí sondy II se podařilo identifikovat Arg 197 nacházející se v helixu F ve správné vzdálenosti od hemu. Neschopnost sond I a III označit aminokyselinové zbytky je v souladu s nepřítomností určujících aminokyselin v exponované oblasti aktivního centra. Získané experimentální výsledky potvrzují správnost modelu CYP 2B4.

NH₃ SIGNALIZACE: ÚLOHA AMINOKYSELIN A JEJICH PERMEAS

MARTIN KUTHAN

Katedra genetiky a mikrobiologie, PŘF UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2

Role amoniaku jako signální molekuly je zatím málo prozkoumána, ale již nyní je známo, že hraje úlohu v důležitých biologických procesech (např. při diferenciaci hlenky *Dictyostelium discoideum* či dokonce při přenosu signálů v nervové tkáni).

V naší laboratoři byla objevena a popsána signalizace mezi kvasinkovými koloniemi, využívajícími plynou signální molekulu NH₃. Amoniak je produkován v pulzech a jeho produkce je výrazně zesílena u sousedících kolonií, které se navíc asymetricky inhibují v růstu. Narozdíl od komplexního média, nedochází při růstu kvasinkových kolonií na minimálním médiu k produkci amoniaku ani k asymetrické inhibici růstu. Oba efekty byly obnoveny po přidání směsi aminokyselin do minimálního média. Navíc mutant kvasinky *Saccharomyces cerevisiae shr3*, defektní v permeasách transportujících aminokyseliny, amoniak neprodukuje. Dalším potvrzením role aminokyselin bylo zjištění, že kmen *S. cerevisiae* defektní v nízkofinitní permease aminokyselin (*Gap1*), má výrazně sníženou produkci amoniaku. Tato zjištění naznačovala, že v procesu NH₃ signalizace hrají nějakou úlohu aminokyseliny. Sledovali jsme proto vliv přítomnosti jednotlivých aminokyselin v minimálním médiu na produkci amoniaku koloniemi *Candida mogii*. Na základě našich experimentů jsme byli schopni rozdělit aminokyseliny na ty, jejichž přítomnost v minimálním médiu vede k vysoké produkci amoniaku (Asn, Pro, Asp, Ala, Glu, Arg, Gly a Ser) a aminokyseliny, v jejichž přítomnosti kolonie *C. mogii* amoniak téměř neprodukuje. Produkce resp. absence produkce amoniaku výrazně ovlivňuje morfologii kolonií a asymetrickou inhibici růstu. Kolonie „produkující“ amoniak jsou tvořeny pseudohyfy i kvasinkovými buňkami, přičemž kvasinkové buňky převládají zejména v části kolonie rostoucí směrem k partnerské kolonii, tedy v oblasti, kde by mělo docházet k maximální indukci produkce amoniaku. Kolonie „neprodukující“ amoniak, jsou tvořeny převážně pseudohyfy a hyfy.

VYUŽITÍ VLASTNÍ MODIFIKACE ANALÝZY KATECHOLAMINŮ POMOCÍ HPLC PŘI DIAGNOSTICE FEOCHROMOCYTOMU U PACIENTŮ SE SEKUNDÁRNÍ HYPERTENZÍ

HANA LENOBELOVÁ^a, RENÉ LENOBEL^b, SYLVA DOSTÁLOVÁ^a, RENATA JURÁKOVÁ^a, DAVID STEJSKAL^{a,c}, IVO ORAL^c

^aOddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk, ^bLaboratoř růstových regulátorů UP Olomouc, ^cInterní oddělení Nemocnice Šternberk

Feo chromocytom je malý tumor dřeně nadledvin, který se klinicky manifestuje řadou rozdílných symptomů (malig-

ní hypertenzí, ortostatickou hypotenzí, hypermetabolismem a neuropsychickou labilitou). Příčinou těchto symptomů je nadprodukce katecholaminů a jejich prekurzorů. Diagnostický algoritmus u pacientů s podezřením na feochromocytom spočívá v klinickém vyšetření (se zaměřením na typické symptomy), zobrazovací diagnostice (CT, NMR, scintigrafie) a laboratorní analýze (katecholaminy a jejich metabolity v plazmě i moči, neuron specifická enolasa v séru). Protože feochromocytom může být uložen také extraadrenálně a laboratorní vyšetření se v běžné klinické praxi velice zobecňují (běžně se stanovuje pouze kyselina vanilmandlová v moči), zůstává podle některých autorů až 75 % pacientů s feochromocytomem nediodagnostikováno.

Na našem oddělení jsme z tohoto důvodu zavedli vlastní modifikaci stanovení katecholaminů a jejich metabolitů (adrenalin, noradrenalin, dopamin, normetanefrin, metanefrin, kyselina vanilmandlová, kyselina homovanilinová). Analýzy provádíme v plazmě nebo moči vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s fluorescenční detekcí (RP-HPLC-FD) po vhodné úpravě vzorku. Izolace noradrenalinu, adrenalinu a dopaminu v moči i plazmě se provádí extrakcí na oxidu hlinitém s následnou derivatizací fluorescenční značkou. Získané fluorescenční deriváty se dělí na RP-HPLC-FD. Izolace metanefrinu a normetanefrinu v moči se provádí dvoustupeňovou ionexovou chromatografií s následnou kvantifikací pomocí nativní fluorescence na RP-HPLC-FD. Izolace kyseliny vanilmandlové a homovanilinové v moči probíhá jedностupňovou ionexovou chromatografií s následnou kvantifikací pomocí nativní fluorescence metodou RP-HPLC-FD. U pacientů s podezřením na feochromocytom používáme následující „biochemický“ algoritmus:

- při nízkém klinickém podezření nebo jako screening vyšetřujeme metanefrin a kyselinu vanilmandlovou v moči (diagnostická specifita i senzitivita této kombinace se pohybuje kolem 99 %),
- při vysokém klinickém suspiciu, patologických nálezích metabolitů v moči, nebo při normálním screeningu a vysokém klinickém suspiciu provádíme stanovení dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu v moči i plazmě za hospitalizace, stanovení kyseliny homovanilinové v moči, event. provádíme clonidinový test (100 % diagnostická specifita i senzitivita).

Za poslední dva roky jsme na našem oddělení vyšetřili 289 pacientů z celého regionu Severní Moravy s podezřením na feochromocytom (na jiných pracovištích této oblasti se t.č. rutinní stanovení katecholaminů neprovádí). U 11 probandů tohoto souboru (4 %) jsme diagnostikovali feochromocytom, který byl následně operačně odstraněn; u všech probandů došlo k ústupu klinických obtíží. Prokázali jsme poměrně nízkou senzitivitu i specifitu kyseliny vanilmandlové (senzitivita 90 %, specifita 79 %), vysokou senzitivitu i specifitu metanefrinu (97 % senzitivita, 100 % specifita) a absolutní specifitu i senzitivitu komplexního vyšetření vč. clonidinového testu.

V současné době provádíme výše uvedená vyšetření pro zdravotnická zařízení celé severní Moravy; analýzy provádějí 3 vysokoškolsky vzdělaní pracovníci. Výsledky vydáváme 1x měsíčně.

STRUKTURNÍ A DYNAMICKÁ POČÍTAČOVÁ ANALÝZA VAZBY INHIBITORŮ K PROTEASE VIRU HIV-1

MARTIN LEPSŠÍK

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Inhibitory HIV proteasy jsou látky, které jsou součástí směsí používaných k léčbě AIDS. Jejich použití ovšem komplikuje fakt, že proteasa v průběhu terapie mutuje a získává k léčivu rezistenci. Fenomén rezistence je proto nutné ze strukturního i dynamického hlediska dobře prozkoumat, aby bylo možné přikročit k návrhu nových účinnějších léků.

Jedním z velice vhodných nástrojů pro takovou analýzu je použití molekulové mechaniky a dynamiky. Jedná se o výpočetní metody, které s pomocí sady parametrů (potenciálu) dokáží minimalizovat energii chemického systému, resp. sledovat jeho časový vývoj.

V této práci jsme vycházeli z modelů komplexů proteasy s různými inhibitory založených na krystalových strukturách. Rezistentní mutanty byly modelovány pomocí molekulové dynamiky. Rozpouštědlo bylo simulováno použitím dielektrika závislého na vzdálenosti. Ze strukturních charakteristik byla sledována přítomnost vodíkových můstků a van der Waalsovských kontaktů mezi inhibitory a proteasou. Z dynamických vlastností jsme se zabývali zanikáním a znovuvytvářením vodíkových můstků a stálostí, resp. nestálostí van der Waalsovských kontaktů.

Porovnání uvedených charakteristik u komplexů jednotlivých inhibitorů nám umožňuje vysvětlit účinek určitého inhibitoru jak na proteasu divokého typu, tak i na její mutanty. Tímto způsobem se tato práce snaží přispět k vysvětlení mechanismů rezistence.

Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.

POTKANÍ HYPODAKTYLNÍ MUTACE – GENETICKÉ MAPOVÁNÍ A CHARAKTERIZACE KONGENNÍCH KMENŮ

FRANTIŠEK LIŠKA

Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 4, 120 00 Praha 2

V současné době se u savců předpokládá až 4000 genů, jejichž zárodečné mutace mohou vést k autosomálně recesivně dědičné samčí infertilitě. Tyto mutace mají často pleiotropní efekt i na další orgánové systémy. Jedna z těchto mutací je předmětem našeho výzkumu. Potkaní hypodaktylie (Hd) je autosomálně recesivní postižení vývoje končetin a spermatogeneze. Projevuje se variabilní redukcí počtu prstů a článků prstů na preaxiální straně předních i zadních končetin. Postižení končetin samců a samic je stejné. Všichni homozygotní samci jsou infertilní. Mají zmenšená varlata a nadvarlata a zmenšené množství morfologicky abnormálních a nepohyblivých spermií. Mutovaný gen byl lokalizován na potkaní

chromozom 10 pomocí 152 zpětných kříženců (samice originálního kmene Wistar Hd (WHD) a samec F1 (WHDxBrown Norway)). Jemnější mapování provádíme pomocí populace F2 hybridů WHDxBN (Brown Norway). Kritický segment chromosomu 10, kde se nachází Hd mutace, se tak podařilo zúžit na cca 1,7 cm mezi mikrosatelitními markery D10Rat116 a D10Rat160. Zároveň byla pozorována úplná vazba Hd se skupinou markerů D10Mit8 (v genu pro synaptobrevin 2), D10Wox12 (v genu pro sex hormone binding globulin), D10Wox14 (v genu pro asialoglykoproteinový receptor) a s dvěma anonymními markery. Kritický segment však zřejmě obsahuje i další geny, které mohou být poziciálními kandidáty Hd. Přenesením alely Hd na genetické pozadí inbredních kmenů SHR (spontaneously hypertensive rat) a BN jsme vyvinuli kongenní kmene SHR-Hd a BN-Hd. U SHR-Hd je snížena penetrance a expresivita postižení končetin, zatímco u kmene BN-Hd je těžké postižení končetin, dokonce větší než u kmene WHD. Homozygotní samci obou kongenních kmenů jsou sterilní, avšak hmotnost varlat, nadvarlat i počet spermií je významně vyšší než u kmene WHD. Tato pozorování svědčí pro vliv modifikujících genů na expresi Hd. Naše další práce bude směřovat k identifikaci mutantního genu, případně i k mapování modifikujících minor genů.

OXIDACE ALKOHOLŮ ENZYMOVÝM SYSTÉMEM FEROMONOVÉ ŽLÁZY LIŠAJE TABÁKOVÉHO

ANNA LUXOVÁ, ALEŠ SVATOŠ

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

Využití enzymatické katalýzy v organické syntéze patří mezi standardní postupy organické chemie. Dosud nebyl popsán enzym katalyzující oxidaci alkoholů na aldehydy. Konečným krokem biosyntézy sexuálního feromonu u samic lišaje tabákového (*Manduca sexta*) je oxidace hexadec-11-en-1-olu a hexadeca-10,12-dien-1-olu na odpovídající aldehydy. Tato přeměna je katalyzována enzymovým oxidačním systémem lokalizovaným ve feromonové žláze motýla na spodní části abdomenu. Z předběžných výsledků bylo patrné, že vypreparovaný abdomen jak v intaktní, tak v homogenizované formě, katalyzuje oxidaci dalších strukturálních typů alkoholů, které nejsou přirozeným prekurzorem feromonu. Na základě tohoto zjištění jsme začali studovat vlastnosti enzymu týkající se jeho využití v organické syntéze. A to především substrátovou specifitu a stabilitu za různých podmínek. Studovaný enzymatický systém je za *in vitro* podmínek (hexan/fosfátový pufr) velmi robustní s tepelnou stabilitou do 50 °C (teplotní optimum 30 °C) a je možné jej recyklovat (5×). Jeho substrátová specifita byla určena na různých alkoholech: 1) s lineárním nerozvětveným řetězcem, 2) nenasycené, 3) s aromatickým jádrem v postranním řetězci, 4) sekundární. Zjištěné pořadí reaktivity je 3>1>2>>4. Primární alkoholy 1, 2, 3 lze selektivně oxidovat ve směsi se sekundárními alkoholy. Dalším zajímavým zjištěním je profil výtěžků oxidace homologické řady primárních nasyčených alkoholů od šesti do dvaceti uhlíků. Nejmenší konverze přeměny alkohol–aldehyd byla zjištěna u hexadekanolu. U enzymového systému nyní určujeme jeho základní biochemické charakteristiky a pokusíme

se o izolaci a podrobnější strukturální charakterizaci. Budoucnost však spatřujeme v produkci oxidasy geneticky modifikovaných mikroorganismy, do kterých bude vnesen gen kódující proteosyntézu našeho enzymu.

Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.

SELEKTIVITA OXIDACE KARCINOGENNÍHO 1-FENYLAZO-2-HYDROXYNAFTALENU (SUDAN I, C.I. SOLVENT YELLOW 14) CYTOCHROMEM P450 1A1

VÁCLAV MARTÍNEK, MARIE STIBOROVÁ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Sudan I je karcinogenem jater a močového měchýře studovaným jako modelové karcinogenní azobarvivo, které neobsahuje aminoskupiny ve své molekule. Je metabolizován cytochromy P450 (CYP), které jej oxidují na C-hydroxy a C-dihydroxyderiváty nebo oxidačně štěpí na benzendiazoniový ion (BDI). BDI je reaktivním intermediátem vázajícím se kovalentně na DNA. Majoritní adukt tvořený v DNA z BDI byl identifikován jako 8-(fenyloazo)guanin¹.

V práci identifikujeme CYP oxidující Sudan I. Nejlépe Sudan I oxidují CYP1A mikrosomů indukovaných β-naftoflavonem (β-NF) (82 %), méně pak CYP2B PB mikrosomů a enzymy mikrosomů indukovaných etanolem či mikrosomů neindukovaných zvířat (všechny – 15 %). Přitom je tato oxidace efektivně inhibována inhibitorem CYP1A1/2 α-NF, zatímco inhibitorem CYP1A2 furafyllinem ovlivněna není. Přeměna Sudanu I CYP1A1 byla potvrzena použitím potkaního rekombinantního enzymu (CYP1A1) rekonstituovaného s NADPH:CYP reduktasou. Studovaný karcinogen je rovněž oxidován v rekonstituovaném systému obsahujícím lidský rekombinantní CYP1A2, ale účinnost oxidace je asi dvacetiprocentní oproti CYP1A1. Vzhledem k tomu, že CYP experimentálních zvířat nemusí být vždy vhodným modelem simulující katalytické vlastnosti lidských enzymů, potvrzujeme výsledky i s enzymy lidskými. Použity byly mikrosomy obsahující lidské rekombinantní CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 a CYP3A4 s cytochromem b₅, tzv. SupersomesTM. Sudan I je opět neúčinněji oxidován lidským CYP1A1. K charakterizaci oxidace Sudanu I CYP1A1 bylo rovněž použito kinetických studií.

V práci prokazujeme, že lidský CYP1A1 je neefektivnějším cytochromem P450 oxidujícím karcinogenní azobarvivo Sudan I. Výsledky jsou interpretovány z hlediska potenciálního rizika vystavení lidské populace studovanému karcinogenu.

Podporováno granty MŠMT ČR (MSM 1131 00001) a GA ČR (203/99/1003 a 203/99/1628).

LITERATURA

1. Stiborová M., Asfaw B., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M.: Chem. Res. Toxicol. 8, 489 (1995)

**POZNÁNÍ MECHANISMU KARCINOGENITY
o-ANISIDINU, KANCEROGENU S DOSUD
NEVYJASNĚNÝMI PRINCIPY ÚČINKU**

MARKĚTA MIKŠANOVÁ, MARIE STIBOROVÁ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

o-Anisidin (2-methoxyanilin) je intenzivně používán jako intermediát při výrobě azobarviv. Jde o silný karcinogen močového měchýře. Studium mechanismu jeho karcinogenity je středem zájmu řady laboratoří. Je tomu tak proto, že se jedná nejen o nebezpečný polutant pracovního prostředí chemických provozů, ale navíc, že principy jeho účinku zůstávají dosud neodhaleny. K vysvětlení karcinogenního účinku *o*-anisidinu je nezbytné *i*) poznání enzymů, kterými je metabolizován, *ii*) identifikace struktury reakčních metabolitů a *iii*) poznání, zda metabolity zasahují do iniciační a progresní fáze kancerogeneze, tedy zda tvoří adukty v DNA.

Metabolismus studovaného karcinogenu je zprostředkován hydroxylačními reakcemi katalyzovanými cytochromy P450 a v močovém měchýři i jedno-elektronovými radikálovými oxidacemi peroxidas, jenž jsou v močovém měchýři bohatě zastoupeny. Majoritním produktem oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450, izolovaným pomocí HPLC a určeným MS-MS spektrometrií, je derivát *N*-hydroxy-2-methoxyanilin. Efektivněji než cytochromy P450 je *o*-anisidin oxidován laktoperoxidasou, křenovou peroxidasou a prostaglandin H syntasou. Unikátním výsledkem je identifikace produktů oxidace *o*-anisidinu peroxidasami. Pomocí MS-MS spektrometrie bylo poprvé přímo zjištěno, že primárně tvořený radikál *o*-anisidinu poskytuje čtyři majoritní barevné produkty diimin, chinonimin, azodimer a sloučeninu obsahující tři methoxybenzenové kruhy, jejíž přesná struktura dosud nebyla určena.

Výsledky přinášejí i odpověď na otázku mechanismu karcinogenního působení *o*-anisidinu. V průběhu oxidace *o*-anisidinu peroxidasami dochází k vazbě reaktivních metabolitů na DNA. Analýzou pomocí metody „³²P-postlabellingu“ byla prokázána tvorba kovalentních aduktů v DNA, přičemž cílovými deoxynukleosidy jsou zbytky deoxyguanosinu. Diimin generovaný z primárně tvořeného N-centrovaného radikálu *o*-anisidinu peroxidasou je právě tím metabolitem, který kovalentně modifikuje deoxyguanosin v DNA. Výsledky jasně prokazují, že *o*-anisidin je genotoxickým karcinogenem zasahujícím do iniciační fáze kancerogeneze.

Autorky děkují za podporu MŠMT ČR (MSM 1131 00001) a GA ČR (grant 203/99/1003).

**VLIV ACETYLACE HISTONŮ NA DIFERENCIACI
MONOBLASTŮ TRANSFORMOVANÝCH
ONKOGENEM *v-myb***

A. NEMAJEROVÁ^{a,b}, J. ŠMARDA^b, J. ŠMARDOVÁ^a

^aMasarykův onkologický ústav, Oddělení buněčné a molekulární onkologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, ^bKatedra genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Protein CBP (CREB-binding protein) je koaktivátor transkripce, který je schopen interagovat s mnoha transkripčními

faktory (*c-fos*, Myb, CREB, *c-Fos*, *c-fos*-Jun, p53, jadernými receptory a dalšími proteiny). CBP je histon-acetyltransferasa a acetylací histonů aktivně zasahuje do procesu transkripce. cDNA kódující lidský protein CBP jsme klonovali do expresního vektoru pMT-IRES-CD4, který umožňuje inducibilní expresi genu CBP z metalothioneinového promotoru v hostitelských buňkách a zároveň jejich účinnou purifikaci prostřednictvím dicistronicky exprimovaného markerového genu CD4. Po stabilní transfekci buněk BM2 plazmidem pMT-CBP-IRES-CD4 technikou lipofekce jsme selektovali stabilní transfektanty.

V buňkách BM2CBP jsme ověřili expresi genu CBP na úrovni RNA a proteinů a potvrdili jsme tvorbu komplexu mezi proteiny CBP a *v-Myb*. Samotná indukce exprese CBP sice nezměnila morfologii buněk BM2 ani proliferační rychlost, ale ovlivnila jejich reakci na některé vnější induktory diferenciace jako je forbolový ester TPA a inhibitor histon-deacetylasy trichostatin A (TSA). Ukázali jsme, že působení TSA vede v buňkách BM2 i BM2CBP k hyperacetylaci histonů a k zastavení buněčného cyklu ve fázi G1. Buňky BM2CBP (v menší míře i BM2) tvoří působením TSA mnohojaderné buňky, které svou morfologií významně připomínají osteoklasty. Proto jsme v buňkách BM2CBP po působení TSA testovali některé pro osteoklasty specifické markery. Prokázali jsme, že se nejedná ani o osteoklasty ani o osteoklastům podobné buňky. TSA indukuje diferenciaci buněk BM2 a BM2CBP na makrofágové polykaryony, které se účastní zánětlivých procesů.

Tato práce byla podporována granty IGA MZ ČR č. NM-16/3 a MZ0002980501

**TESTOVACÍ SYSTÉM PRO STUDIUM ODEZVY
ROSTLIN NA STRES**

**PETRA NEŠNĚROVÁ, ALEŠ SVATOŠ,
TOMÁŠ MACEK**

ÚOCHB AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6, e-mail: Petra_Nesnerova@yahoo.com

Zkoumání vztahů mezi vnějším prostředím a stresem v rostlinách je v poslední době věnována stále větší pozornost, stejně tak, jako studiu mechanismů, které jsou odezvou na stresový faktor a pomocí nichž se rostlina proti vzniklému stresu brání. Metody používané ke studiu stresových reakcí většinou neumožňují získání výsledků bez poranění rostlin. Proto se snažíme navrhnout nový testovací model, při jehož využití je možné pracovat s intaktními rostlinami a získat objektivnější a reprodukovatelné výsledky (na pozadí se neprojeví vliv mechanického poranění). Stresovou reakcí lze u rostlin navodit mj. aplikací jasmonové kyseliny (JA) nebo jejího methyl-esteru (MJ), která slouží při studiu obranných mechanismů jako endogenní signál vyvolávající u rostlin reakce velmi podobné reakcím vyvolaným mechanickým poraněním, býložravci nebo hmyzem. Jako modelovou rostlinu používáme netransformované rostliny *Nicotiana tabacum* (L). K porovnání odezvy a optimalizaci byly používány celé rostliny nebo jednotlivé listy rostlin (*in vitro* nebo *in vivo*), malé rostliny

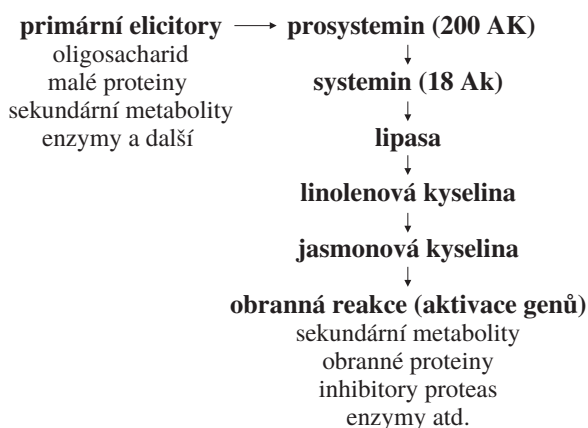


Schéma 1. Signální kaskáda u rostlin

(stáří 2–9 týdnů) pěstované ze semínka, kalusu a buněčná suspenze. Jako elicitor stresu je používán racemický MJ a JA v intervalu koncentrací, jehož spodní mez je srovnatelná s koncentrací těchto látek produkovaných poraněnou rostlinou v přírodních podmínkách. Těkavé látky (ocimen, elemen, drimadien) vylučované poraněnými rostlinami do ovzduší jsou uvnitř měřicí aparatury extrahovány přímo ze vzorku pomocí mikroextrakce na pevnou fázi (SPME) na vlákno potažené polymethylsilikonovou fází. Látky jsou analyzovány pomocí plynové chromatografie a identifikovány hmotnostní spektrometrií. Optimalizací podmínek byly jako nejvhodnější pro použití malých rostlin a indukci MJ stanoveny tyto podmínky: stáří rostlin – 6 týdnů, koncentrace MJ – 5 µg na jednu rostlinu, měření na GC – 20–24 hodin od začátku indukce. Daný modelový systém je možné využít v základním i aplikovaném výzkumu (při studiu vlivu různých látek na rostliny, např. fytohormony a jim podobné látky).

Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.

PŘÍPRAVA FENYL-HYDROXYETHYL DERIVÁTŮ GUANINU JAKO STANDARDŮ PRO DIAGNOSTIKU POŠKOZENÍ DNA

JAN NOVÁK, IGOR LINHART

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Poškození DNA alkylujícími látkami lze diagnostikovat detekcí příslušných derivátů purinových basí v moči a nukleotidových derivátů v leukocytech vysoce citlivými analytickými metodami.

U lidí exponovaných styrenu jsou fenyl-hydroxyethyl deriváty guaninu významnými indikátory poškození¹. V práci je popsána příprava *O*⁶-derivátů guaninu metodou aktivace 2-amino-6-chlor purinu 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanem². Vzniklý 2-amino-6-(1-azonia-4-azabicyklo[2.2.2]-1-oktyl)purin („DABCO-purin“) reaguje snadno s natrium 1-fenylethan-1,2-diolátem za vzniku dvou regiosomerních produktů, *O*⁶-(1-fenyl-2-

-hydroxyethyl)-guaninu (α -adukt) a *O*⁶-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)guaninu (β -adukt). Jako majoritní byl získán β -adukt. Dále byly zkoumány alkylační reakce 2-amino-6-chlorpurinu s 2-brom-2-fenylethanolem a s 2-brom-1-fenylethanolem s cílem připravit deriváty substituované v poloze 7. Struktura připravených látek byla ověřena pomocí NMR, UV a hmotnostními spektry.

Práce byla podporována granty MSM 223100001 ministerstva školství ČR a 313/99/1460 GA ČR.

LITERATURA

1. Vodička P., Vodičková L., Trejblová K., Šrám R. J., Hemminki K.: *Carcinogenesis* 15, 1949 (1994).
2. Linn J. A., McLean Ed W., Kelley J. L.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 8, 913 (1994).

A METHODOLOGY TO ASSESS RISK OF ORGANIC COMPOUNDS IN THE UNDERGROUND ENVIRONMENT

**JAROSLAV NOVÁK^a, RICHARD TYKVA^a,
 VĚRA VLASÁKOVÁ^b, STANISLAV FORMAN^c,
 TOMÁŠ RUML^c**

^aInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Science of the Czech Republic, ^bInstitute of Experimental Botany, Academy of Science of the Czech Republic, ^cDepartment of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic

Organic compounds used in modern industry and agriculture represent a serious environmental risk. Therefore, it is necessary to observe the toxicity of such compounds in the underground environment (e.g., uptake by plant roots, pollution of groundwater, etc.). The complex environmental toxicity of such a compound consists of two components, namely that of the analyzed compound and another one of its soil degradation products.

Our methodology includes isolation of microbial strains from the sites where the investigated organic compound(s) should be used, biodegradation analyses and measurement of the toxicity of the parent compound and its biodegradation products.

The described methodology was tested using a carbamate juvenile with oostatic activity after application to flies *Sarcophaga bullata*. Microbial strains from soil samples were isolated and those which degraded the tested compound were selected. Biodegradation experiments consist of incubation of the radiolabeled juvenile with the selected microorganisms in liquid media followed by radio-HPLC where four radioactive peaks were isolated. The main degradation product was identified, and two other fractions represent mixtures of degradation products. In relation to the parent compound, we found lower toxicity for all three fractions representing biodegradation products.

Another application of the developed methodology is in preparation for commercially available pesticides, in which we will extend the method with experiments on soil columns in

cooperation with Germany (GSF, Neuherberg) including identification of degradation products by radio-HPLC/MS.

This work was performed under the Research Project Z4 055 905.

JE „DNA ŽEBŘÍČEK“ SPOLEHLIVOU ZNÁMKOU APOPTÓZY?

**JAN PEYCHL, EMIL RUDOLF, JAN NOVÁK,
JIRÍ HUSÁK**

Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové

Internukleosomová fragmentace DNA je považována za jednu z charakteristických známek programované buněčné smrti – apoptózy. Lze ji detekovat pomocí metody horizontální elektroforézy v agarózovém gelu jako tzv. DNA žebříček (DNA ladder assay). Proto jsme tuto metodu zařadili do našich studií buněčné smrti indukované *in vitro*. Jako model jsme zvolili buňky stabilizované buněčné linie Hep 2 odvozené z lidského karcinomu laryngu a buňky stabilizované buněčné linie HL 60 odvozené z lidské promyelocytární leukémie. K indukci apoptózy jsme použili 24 hodinové ovlivnění buněk etoposidem (inhibitor topoisomerasy II) v koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po izolaci a elektroforéze DNA z ovlivněných buněk jsme typický DNA žebříček našli pouze u DNA buněk linie HL 60. U buněk linie Hep 2 jsme tento typ fragmentace DNA nezachytili. Pomocí mikroskopických metod jsme však u ovlivněných buněk obou buněčných linií prokázali typické morfologické projevy apoptózy: pohyb výběžků cytoplazmatické membrány, svrštění buněk, kondenzaci a fragmentaci chromatinu. Etoposidem ovlivněné buňky linie Hep 2 vykázaly rovněž pozitivitu v imunohistochemických vyšetřeních na přítomnost kaspasy 3, která je součástí apoptotické kaskády. Naše výsledky naznačují, že internukleosomová fragmentace DNA není zcela spolehlivou známkou apoptózy indukované *in vitro* u buněk různého původu.

Práce vznikla za podpory Výzkumných záměrů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy FD MSM 111500002 a FD MSM 111500004

MECHANISMY REGULUJÍCÍ AKTIVITU NÁDOROVÉHO SUPRESORU PROTEINU P53 A MOŽNOSTI AKTIVACE JEHO NEFUNKČNÍCH FOREM V NÁDOROVÉ BUŇCE

**ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ^a, VÁCLAV BRÁZDA^b,
PETR MÜLLER^a, EMIL PALEČEK^b,
BOŘIVOJ VOJTĚŠEK^a**

^aMasarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno,

^bBiofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Procesy buněčné proliferace a diferenciace jsou v buňce přesně regulovány řadou extracelulárních i intracelulárních

mechanismů, jejichž narušení má zpravidla za následek maligní transformaci buňky. K nejvýznamnějším faktorům podílejícím se na regulaci buněčného cyklu patří protein p53, nádorový supresor indukovaný buněčným stresem, který v závislosti na míře poškození genetické informace indukuje buď zastavení buněčného cyklu v G₁ fázi, které umožní reparaci poškozené DNA před její další syntézou, a nebo spouští mechanismy vedoucí k programované smrti buňky – apoptóze. Mutace v genu pro p53 byly nalezeny u více než 50 % lidských malignit, což dokazuje jeho nepostradatelnou úlohu v regulaci buněčného cyklu a ochraně buňky proti nádorovému bujení. Z tohoto důvodu je protein p53 nazýván jako „strážce genu“.

Lidský protein p53 je jaderný fosfoprotein o velikosti 393 aminokyselin, jehož mechanismus působení je realizován jeho schopností vázat se na specifické sekvence DNA (tzv. p53 consensus sekvence) a fungovat jako sekvencně specifický transkripční faktor. Za fyziologických podmínek se protein p53 nachází v buňkách převážně v latentní konformaci (nevykazuje DNA-vazebnou aktivitu) a jeho hladina je velmi nízká a teprve při odpovědi buňky na stresové podmínky (např. expozici buňky faktorům poškozujícím DNA) dochází k jeho aktivaci a stabilizaci. Aktivace latentního proteinu p53 k vazbě na DNA je zpravidla zprostředkovávána alosterickou modifikací jeho C-koncové regulační domény a může se při ní uplatnit několik mechanismů, např. vazba monoklonálních protilátek rozpoznávajících epitopy v C-koncové doméně proteinu. Významným fyziologickým mechanismem aktivace latentního proteinu p53 jsou jeho post-translační modifikace, především fosforylace na specifických Ser a Thr, které zprostředkovávají odpověď buňky na extracelulární nebo intracelulární stresové faktory. V naší práci jsme se zabývali vlivem jednotlivých post-translačních modifikací na DNA-vazebnou aktivitu proteinu a podařilo se nám prokázat, že fosforylace proteinu cdk2/cyklin A na Ser 315, Protein kinasou C na Ser 378 a Casein kinasou II na Ser 392 mají na rozdíl od modifikací N-koncové domény proteinu schopnost indukovat přechod p53 z latentní do aktivní konformace, což se projeví výrazným zvýšením vazby p53 na promotorové sekvence DNA. Přítomnost těchto post-translačních modifikací jsme prokázali také *in vivo*, přičemž míra modifikace se u různých nádorových buněčných linií výrazně liší a může být indukována poškozením DNA.

Post-translační modifikace se tedy jeví být jedním ze základních regulačních mechanismů aktivity p53, přičemž fosforylace Ser 315, 378 a 392 pravděpodobně patří mezi klíčové regulační signály zprostředkovávající reakci na poškození DNA a buněčný stres. Z těchto poznatků vyplývá, že nejen mutace v genu pro p53, ale také narušení biochemických drah zprostředkovávající jeho post-translační modifikace, mají zásadní vliv na aktivitu proteinu p53 a musí být zohledněny v případné protinádorové terapii založené na obnově funkčního proteinu p53.

Tato práce byla financována z grantových projektů GA ČR 301/00/P094 a 312/99/1550 a IGA MZ ČR 4783-3.

NOSIČE GENOVÉ INFORMACE NA BÁZI POLYELEKTROLYTOVÝCH KOMPLEXŮ POLYKATIONT/DNA

**T. RESCHEL^a, Č. KOŇÁK^a, K. ULBRICH^a,
D. OUPICKÝ^a, L. W. SEYMOUR^b**

^aÚstav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6, ^bCRC Institute for Cancer Studies, University of Birmingham B15 2TA, Birmingham

Genová terapie, jejímž hlavním úkolem je doprava specifického genu do vybraných buněk nebo tkání a zajištění jeho transkripce a tím i terapeutického účinku, byla navržena jako jedna z možností léčby řady onemocnění. V současné době se výzkum soustřeďuje na vývoj tří typů vektorů vhodných pro dopravu genů – virální nosiče DNA, komplexy DNA s kationtovými liposomy a komplexy se syntetickými polykationty. Aby tyto systémy byly aktivní *in vivo*, je nutné zajistit jejich stabilitu v krevním řečišti, eliminovat interakci s komponentami retikuloendotelálního systému, zajistit prodlouženou cirkulaci, dostatečně malý rozměr pro účinnou extravasaci, umožnit cílené směřování a transport přes buněčnou membránu, ochránit DNA před degradací lysosomálními enzymy a zajistit účinný přepis genetického materiálu v jádře buňky. Námí studovaný systém, který by měl splňovat výše uvedené požadavky, vychází z použití komplexů plazmidové DNA s polykationty povrchově modifikovanými hydrofilními polymery nesoucími funkční molekuly (směřovatelné jednotky, fusogenní skupiny atd.).

Pro všechny typy studovaných polykationtů byla fluorescenční metodou ověřena jejich schopnost tvořit polyelektrolytové komplexy s DNA (PEC) a byl studován vliv podmínek přípravy na vlastnosti PEC (poměr +/- náboje, pH pufru, rychlost míchání, teplota).

Biofyzikální vlastnosti komplexů polykationt/DNA jsou ovlivněny typem a molekulovou vahou použitého polykationtu. Bylo prokázáno, že stabilita komplexů vůči disociaci v roztoku NaCl vzrůstá v řadě od kvarterních bazí přes terciární aminy k aminům primárním. Dalším faktorem, který přispívá ke zvýšené stabilitě komplexů, je zvýšení molekulové hmotnosti polykationtu použitého pro přípravu PEC. Ve stejné řadě také vzrůstá *in vitro* transkripční aktivita komplexů polykationtů s plazmidovou DNA.

Tento projekt je financován GA ČR (grant č. 307/96/K226) a European Union Biotechnology Program (IC20CT97005).

STRUCTURAL BASIS OF THE HIV-1 AND HIV-2 PROTEASE INHIBITION BY A MONOCLONAL ANTIBODY

**PAVLÍNA ŘEZÁČOVÁ^a, JULIEN LESCAR^b,
JÍŘÍ BRYNDA^a, MILAN FÁBRY^a,
MAGDA HOŘEJŠÍ^a, RENATA ŠTOURAČOVÁ^a,
GRAHAM BENTLEY^a, JURAJ SEDLÁČEK^a**

^aDepartment of Gene Manipulation, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences, 166 37 Prague 6, Czech Republic, ^bESRF, BP220, 38043 Grenoble, ^cUnité d'Immunologie Structurale, Dept. d'Immunologie, Institut Pasteur, 75724 Paris, France

The HIV protease (HIV PR) is a homodimeric enzyme belonging to the family of aspartyl proteases. This enzyme plays an essential role in the HIV life cycle, and is thus one of the most attractive targets for design of specific inhibitors. The murine monoclonal antibody (mAb) 1696, produced by immunisation with the HIV-1 protease, inhibits the catalytic activity of the enzyme of both the HIV-1 and HIV-2 isolates, with inhibition constants in the low nanomolar range. This antibody cross-reacts with peptides that include the N-terminus of the enzyme (residues 1–7), a region which is highly conserved in sequence among different viral strains and which, furthermore, is crucial for homodimerization to the active enzymatic form.

We report here the crystal structure of a recombinant single-chain Fv fragment of mAb 1696, expressed in *E. coli*, as a complex with a cross-reactive peptide from the HIV-1 protease at 2.7 Å resolution.

The antibody-antigen interactions observed in this complex provide a structural basis for understanding the origin of the broad reactivity observed between mAb 1696 with the HIV-1 and HIV-2 proteases and their respective N-terminal peptides. In addition, a possible mechanism of HIV protease inhibition by mAb 1696 is proposed that could help the design of inhibitors aimed at binding inactive monomeric species.

STUDIUM KUMULACE TĚŽKÝCH KOVŮ V ROSTLINÁCH

**IVANA ŠPIROCHOVÁ^a, TOMÁŠ VANĚK^b,
PETR SOUDEK^b, ZDENĚK KAFKA^a,
JANA PUNČOCHÁŘOVÁ^a**

^aFakulta technologie ochrany prostředí, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bOddělení explantátových kultur, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Díky intenzivní činnosti člověka se do životního prostředí dostávají stále vyšší koncentrace škodlivých látek, které se v přírodě běžně nevyskytovaly. Důsledkem toho je znečištěná půda, voda i vzduch s dopadem na živé organismy včetně člověka. Ve snaze zvrátit tento trend hledá člověk metody remediací (ozdravení) založené na fyzikálních, chemických i biologických principech. V některých případech se ukazuje, že i rostliny mohou být, díky svým specifickým vlastnostem,

při tomto procesu užitečné. Těchto jejich vlastností by bylo možno využít pro remediaci půd znečištěných těmito nebezpečnými kontaminanty, ať už organickými či anorganickými.

Cílem této práce je sledování podmínek kumulace těžkých kovů konkrétně Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} . Sledování je prováděno na intaktních rostlinách *in vitro* kultury hybridu osiky (*Populus tremula* x *tremuloidaes*). Předběžné výsledky ukazují, že kultura osiky kumuluje olovnaté ionty, aniž by se projevil negativní dopad kontaminace na růst rostlin. Měření dokonce prokázala progresivní nárůst biomasy.

Vedle těchto pokusů byly realizovány experimenty na lokalitě kontaminované těžkými kovy (konkrétně Pb, Zn). Zde byly použity rostliny slunečnice a kukuřice, které byly vysázeny na kontaminovanou lokalitu a za 4 měsíce sklizeny separovány a analyzovány. Výsledky tohoto experimentu byly překvapivé a naznačily, že koncentrace kontaminujícího kovu v zemině (nebo půdní vodě) nemusí být základním faktorem ovlivňující intenzitu kumulace kovu v rostlině.

Tato práce je podporována projektem COST 837.10. Byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.

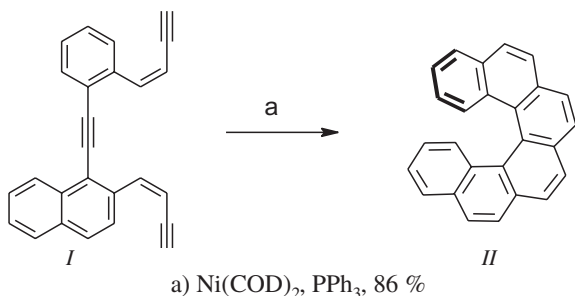
HELICENY – PŘÍMÁ SYNTÉZA IZOMERACÍ AROMATICKÝCH *cis,cis*-DIENTRIINŮ

FILIP TEPLÝ, IRENA G. STARÁ,
ADRIAN KOLLÁROVIČ, IVO STARÝ,
DAVID ŠAMAN

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: fteply@uochb.cas.cz

Vyvinuli jsme nový syntetický přístup k [5]-, [6]- a [7]helicenu, které reprezentují unikátní π -konjugované inherentně chirální molekuly. Klíčovým stupněm přípravy je intramolekulární [2+2+2] cykloizomerace aromatických *cis,cis*-dienetriinů v přítomnosti $Ni(COD)_2$ nebo $CpCo(CO)_2$. Při této reakci, která zahrnuje posun 6 π -elektronů, dochází k simultánnímu uzavření tří aromatických kruhů (pro [5]helicenu $\Delta H = -136$ kcal.mol⁻¹, AM1 výpočet) a vybudování úplného helicenového skeletu. V přítomnosti $Ni(COD)_2$ byl [5]-, [6]- a [7]helicenu izolován ve výtěžku 83 % ([5]), 86 % ([6], 1→2) a 60 % ([7]).

Konvergentní syntéza *cis,cis*-dienetriinu 1 vychází ze známého (Z)- β , α -dibromstyrenu¹ a 1-brom-2-naftaldehdu². Obecné využití tohoto postupu, který odpovídá principu atomové ekonomie a při němž vzrůstá komplexita molekuly v posledním stupni syntézy, je předmětem dalšího studia stejně jako enantioselektivní verze klíčové cykloizomerace.



Tato práce byla podporována GA ČR (grant č. 203/99/1448). Byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.

LITERATURA

1. Yasuike S., Shiratori S., Kurita J., Tsuchiya T.: Chem. Pharm. Bull. 47, 1108 (1999).
2. Weber E., Csöregy I., Stensland B., Czugler M.: J. Am. Chem. Soc. 106, 3297 (1984).

PURIFIKACE, KRYSTALIZACE A RENTGENOVÁ STRUKTURNÍ ANALÝZA KUKUŘIČNÉ CYTOKININ-GLUKOSID-SPECIFICKÉ β -GLUKOSIDASY

JITKA VÉVODOVÁ

Národní centrum pro výzkum biomolekul a Laboratoř funkční genomiky a proteomiky rostlin, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: vevod@chemi.muni.cz

Kukuřičná cytokinin-glukosid-specifická β -glukosidasa, Zm-p60.1, náleží do třídy β -glukosidas, které jsou součástí rodiny I glykosyl hydrolas. β -glukosidasy jsou důležitou skupinou enzymů, které štěpí glykosidickou vazbu disacharidů, oligosacharidů nebo konjugovaných glykosidů. β -Glukosidasa Zm-p60.1 je považována za jeden z klíčových enzymů podílejících se na regulaci růstu a vývoje rostlin díky své schopnosti štěpit biologicky aktivní cytokiny z jejich zásobních a transportních forem. Enzym Zm-p60.1 se v rostlinách vyskytuje jako homodimer lokalizovaný v plastidech (chloroplastech).

Pro pochopení katalytické aktivity, specifity a obecně i funkce enzymů v biologickém systému je zcela nezbytná znalost jejich třídídimenzionální struktury. V současné době je k řešení tohoto problému zpravidla používána proteinová krystalografie. Tato moderní metoda umožňuje pomocí rentgenové strukturní analýzy velmi přesně určit prostorovou strukturu makromolekulárních systémů, jejichž molekulová hmotnost může dosahovat několika desítek až stovek kD.

Postup analýzy třídídimenzionální struktury enzymu lze rozdělit do několika fází. Prvním krokem byla nadprodukce proteinu v *E. coli* a jeho purifikace pomocí afinitní chromatografie a gelové filtrace. Následovalo hledání a optimalizace podmínek vhodných pro přípravu krystalů proteinu. Po získání a zpracování difrakčních dat¹ byla struktura enzymu určena metodou molekulárního nahrazení. Jako model byla použita β -glukosidasa z *T. repens*². Strukturu Zm-p60.1 tvoří jednodoménový (β/α)₈ barel s aktivním centrem v podobě solvovaného kapsy, uvnitř které se váží pravděpodobně 2–3 molekuly glycerolu. V souladu se „zádržným“ mechanismem enzymatické hydrolyzy glykosidické vazby se v aktivním centru vyskytují residua tvořící katalytický pár – donor protonu Glu186 a nukleofil Glu401 (cit.³).

LITERATURA

1. Vévodová J., Marek J., Zouhar J., Brzobohatý B., Su X.-D.: Acta Cryst. D 57, 140 (2001).

- Barett T., Suresh C. G., Tolley S. P., Dodson E. J., Hughes M. A.: *Structure* 3, 951 (1995).
- Vévodová J., et al.: připraveno k publikaci.

CARCINOGENIC AND NEPHROTOXIC ALKALOIDS ARISTOLOCHIC ACIDS ARE ACTIVATED BY D,T-DIAPHORASE: ³²P-POSTLABELING ANALYSIS OF DNA ADDUCT FORMATION

HANA VOŠMIKOVÁ, MARIE STIBOROVÁ

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2

Aristolochic acid (AA), a naturally occurring nephrotoxin and carcinogen, is implicated in a unique type of renal fibrosis, designated Chinese herbs nephropathy (CHN) (Ref.1). We identified the AA-DNA adducts in kidneys and in a ureter obtained after renal transplantation. One major DNA-adduct of AA, 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)-aristolactam I and two minor adducts, 7-(deoxyguanosin-*N*²-yl)-aristolactam I and 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)-aristolactam II were detected¹. Understanding which enzymes are involved in AA activation and/or detoxication is important in the assessment of an individual susceptibility to this natural carcinogen. We have identified xanthine oxidase and CYP1A1, CYP1A2 as well as NADPH: CYP reductase as activating systems capable of reductively activating AA to the same DNA adducts observed in CHN patients. Here we examine the ability of another enzyme, D,T-diaphorase, to activate AA to metabolites forming DNA adducts with the nuclease P1 version of the ³²P-postlabeling assay.

Hepatic cytosols of rats generated AA-DNA adduct patterns reproducing those found in renal tissue in CHN patients. The efficiency of cytosols to form AA-DNA adducts was increased by pretreatment of rats with inducers of D,T-diaphorase, and what is more interesting, also with AA. Dicumarol, an inhibitor of D,T-diaphorase, significantly decreased the amounts of adducts formed by cytosols. Likewise, cofactors of D,T-diaphorase, NADH and NADPH, supported the DNA adduct formation of AA. These results demonstrate an important role of this enzyme in activation of AA in the cytosolic system and were corroborated with purified enzyme that we isolated from rat hepatic cytosol. Using a structural modeling of AA binding to active center of D,T-diaphorase, we contribute to explanation of the mechanism of AA activation by this enzyme. The results are the first report demonstrating AA activation by D,T-diaphorase.

Supported by GA CR (303/99/0893) and MECR (MSM 1131 00001).

REFERENCES

- Bieler C. A., Stiborová M., Wiessler M., Cosyns J.-P., van Ypersele de Strihou C., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* 18, 1063 (1997).

FOTOCYKLIZACE 2-AMINOAZOBENZENU KATALYZOVANÁ ROZTOKEM HgI₂

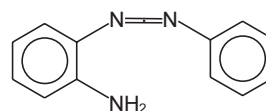
MARTIN ZEMAN

KTFCH PřF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: zemanm@chemi.muni.cz

Při zkoumání fotokatalytických účinků práškových polovodičů v alkoholu se ukázalo, že jodid rtuťnatý, který je v ethanolu značně rozpustný, katalyzuje cyklizaci 2-aminoazobenzenu i v případě, že je zfiltrován. Roztoky byly analyzovány hlavně pomocí HPLC a DP polarografie. Dosavadní závěry jsou následující:

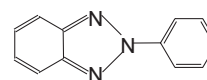
Reakce je roztoková a je ovlivněna koncentrací jodidu rtuťnatého. Koncentrace katalyzátoru má vliv nejen na reakční rychlost, ale i na zastoupení produktů. Reakce neprobíhá ve vodně-alkoholickém roztoku na práškovém HgI₂, který je v přítomnosti vody nerozpustný. Osvětlením nevrátí mění vlastnosti HgI₂ na HPLC koloně. Nadměrná koncentrace reaktantu zbrzdí fotokatalyzovanou reakci, patrně z důvodu absorpce světla.

Reaktant:

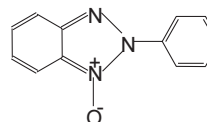


2-aminoazobenzen

Produkty:



2-fenylbenzotriazol



2-fenylbenzotriazol-*N*-oxid

POUŽITELNOST DAPSONU A CISAPRIDU JAKO LIGANDŮ PŘI IZOLACI CYTOCHROMŮ P450 AFINITNÍ CHROMATOGRÁFIÍ

ROMAN ZUBER^a, EVA ANZENBACHEROVÁ^b, PAVEL ANZENBACHER^a

^aÚstav farmakologie a ^bLékařské chemie LF UP, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Jaterní cytochromy P450 u savců jsou nejdůležitějšími enzymy metabolismu cizorodých látek. V lidských játrech je přítomno několik forem P450; přítomná forma 3A4 se podílí na biotransformaci téměř poloviny všech používaných léčiv. Po-

dobná forma P450 3A je přítomna i u miniprasat, potenciálních dárců jater/hepatocytů pro xenotransplantace nebo konstrukci bioarteficiálních jaterních náhrad. Cílem bylo izolovat tuto formu z miniprasečích jater a charakterizovat ji z hlediska substrátové selektivity a struktury aktivního místa.

Izolace forem P450 je vzhledem k jejich počtu a podobným vlastnostem nesnadná. Proto bylo využito možností afinitní chromatografie. Byly připraveny dva typy afinitních nosičů s ligandy dapsonem a cisapridem (substráty formy 3A4, navíc pro přítomnost aminoskupiny vhodné pro navázání na epoxy-aktivovanou sepharosu CL-6B).

Nosič s navázaným cisapridem je schopen selektivně zadržovat formu P450 3A, jak bylo prokázáno pomocí SDS-PAGE a Western blotu. V případě nosiče s navázaným dapsonem naproti tomu nedošlo k vazbě P450 3A, vázaly se však jiné formy P450.

Oba nosiče mají tedy afinitu k cytochromům P450, ale odlišnou selektivitu. Cisaprid se zdá být vhodný jako afinitní ligand při purifikaci cytochromu P450 3A z jater miniprasat.

Autoři děkují GA ČR za finanční podporu grantu č. 203/99/0277.

REJSTŘÍK AUTORŮ (podtrženi jsou přednášející)

<u>Adam</u> M.	318	<u>Hušáková</u> L.	322, 325	<u>Pospíšilová</u> Š.	334
Antonovič L.	329			<u>Punčochářová</u> J.	335
Anzenbacher P.	337	<u>Ivánek</u> R.	326		
Anzenbacherová E.	337			<u>Reschel</u> T.	335
Ástot C.	321	Jagelská E.	319	Rinnová M.	325
		<u>Jambor</u> R.	327	Rudolf E.	334
Barek J.	321	<u>Jelínková</u> P.	327	Ruml T.	333
Bařinka C.	325	Jonáková V.	327	Růžička A.	327
Bentley G.	335	Jovin T. M.	319		
Bezouška K.	325	Juráková R.	329	<u>Řezáčová</u> P.	335
Billová S.	319				
<u>Blahoš</u> J.	318	Kafka Z.	335	Sandberg G.	321
<u>Braunová</u> A.	319	Karlovská L.	319	Sedláček J.	335
<u>Brázda</u> V.	319, 334	<u>Kinclová</u> O.	327	Seymour L. W.	335
<u>Brázdová</u> M.	319	Kollárovič A.	336	Slavičková A.	326
Brynda J.	335	Koňák Č.	335	Sopko B.	329
<u>Bunčec</u> M.	320	Konvalinka J.	325	Souček M.	325
		<u>Košata</u> B.	328	Soudek P.	335
<u>Cvačka</u> J.	321	Kozmík V.	321, 328	Stará I. G.	336
		<u>Kratina</u> P.	328	Starý I.	336
<u>Čajan</u> M.	320	Křen V.	322, 325	Stejskal D.	329
Čejková A.	322	<u>Kubíčková</u> B.	329	Stiborová M.	323, 331, 332, 337
Černý J.	326	<u>Kuthan</u> M.	329	Strnad M.	321
		Kuzma M.	322, 325	Strnad H.	324
<u>Doležal</u> K.	321			Subramaniam V.	319
Dostál L.	327	Lapčík O.	324	Svatoš A.	321, 322
Dostálová S.	329	Lenobel R.	329	Svoboda J.	328
Dudová K.	321	<u>Lenobelová</u> H.	329		
<u>Dvořák</u> Z.	322	<u>Lepšík</u> M.	330	Šaman D.	336
Dvořák D.	325	Lescar J.	335	Šmarda J.	332
		Linhart I.	333	Šmardová J.	332
Fábry M.	335	<u>Liška</u> F.	330	<u>Špirochová</u> I.	335
Fialová A.	322	<u>Luxová</u> A.	331	Štouračová R.	335
<u>Fialová</u> P.	332				
Fojta M.	319	Macek T.	332	<u>Teplý</u> F.	336
Forman S.	333	Maňásková P.	327	Tichá M.	327
<u>Froněk</u> T.	323	<u>Martínek</u> V.	331	Tykva R.	333
		Masák J.	322		
<u>Gogová</u> K.	323	<u>Mikšanová</u> M.	332	Ulbrich K.	319, 335
		Moravcová J.	328	Ulbrich P.	324
Hampl R.	324	Morfin R.	324		
Hanuš J.	321	Müller P.	334	Vaněk T.	335
Havelková M.	325			Ventura K.	318
Havličková M.	318	<u>Nemajerová</u> A.	332	<u>Vévodová</u> J.	336
<u>Havlíková</u> H.	324	<u>Nešněrová</u> P.	332	Vlasáková V.	333
<u>Hejkalová</u> V.	324	<u>Novák</u> J.	333, 334	Vojtěšek B.	334
Herkomerová E.	325	<u>Novák</u> J.	334	<u>Vošmiková</u> H.	337
Hill M.	324				
<u>Hocek</u> M.	325	Oral I.	329	Weber J.	325
Hodek P.	323, 329	Oupický D.	335	Weignerová L.	322
Holeček J.	327			Wimmer Z.	328
Holý A.	325	Pačes V.	324		
Hořejší M.	335	Paleček E.	319, 334	<u>Zeman</u> M.	337
<u>Hradílek</u> M.	325	Paleček J.	319	Zima J.	321
Hunková Z.	322	Pechar M.	319	<u>Zuber</u> R.	337
Husák J.	334	<u>Pechl</u> J.	334		

OBSAH

ÚVODNÍK	269
REFERÁTY	
Vysokoučinné separační metody při analýze benzenkarboxylových kyselin	270
M. Wurst, V. Pacáková a K. Štulík	
Meerweinova-Ponndorf-Verleyova redukce a Oppenauerova oxidace katalyzované heterogenními katalyzátory	278
M. Bartošová, L. Červený a B. Wichterlová	
Praktické zkušenosti se simulací složitých chemických kontinuálních procesů	283
J. Poživil	
Metody hodnocení náhrad kakaového másla pro výrobu čokolád	288
J. Čopíková, H. Nováková, J. Tůma a A. Sinica	
Inhibitory cyklin-dependentních kinas	295
V. Kryštof a M. Strnad	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Stanovení ethopabátu v premixech doplňkových látek a finálních krmivech metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Mezilaboratorní porovnávací zkouška metody	301
M. Douša	
Stanovení dextromethorfanu a jeho metabolitů v plazmě metodou HPLC	306
G. Zimová, J. Chládek, J. Martínková a M. Beránek	
Trojrozměrné fluorescenční spektra – řešitelný problém aj pro starší přístroje	310
Katarína Dubayová, Jaroslav Kušnýr a Miloš Hanus	
OSOBNÍ ZPRÁVY	314
DISKUSE	316
SIGMA-ALDRICH KONFERENCE – SBORNÍK	317

CONTENTS

EDITORIAL	269
REVIEW ARTICLES	
High-Performance Separation Methods in Analysis of Benzenecarboxylic Acids	270
M. Wurst, V. Pacáková, and K. Štulík	
Meerwein-Ponndorf-Verley Reduction and Oppenauer Oxidation Catalyzed by Heterogeneous Catalysts	278
M. Bartošová, L. Červený, and B. Wichterlová	
Practical Experience with Simulation of Complex Chemical Continuous Processes	283
J. Poživil	
Methods of Evaluation of Cocoa Butter Substitutes for Chocolate Production	288
J. Čopíková, H. Nováková, J. Tůma, and A. Sinica	
Inhibitors of Cyclin-dependent Kinases	295
V. Kryštof and M. Strnad	
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Determination of Ethopabate in Admixture Premixes and in Final Fodders by HPLC with Fluorescence Detection. Interlaboratory Comparative Test of the Method	301
M. Douša	
HPLC Determination of Dextromethorphan and Its Metabolites in Plasma	306
G. Zimová, J. Chládek, J. Martínková, and M. Beránek	
Three-dimensional Fluorescence Spectra – A Resolvable Problem also with Old Instruments	310
Katarína Dubayová, Jaroslav Kušnýr, and Miloš Hanus	
PERSONAL NEWS	314
DISCUSSION	316
SIGMA-ALDRICH CONFERENCE – ABSTRACTS	317

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 95 (2001), čís./no. 5 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 125, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 111 • ČASOPIS ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ • Bulletin roč./vol. 32 • Vydává Česká společnost chemická ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, s Českou společností průmyslové chemie a Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt PG 97142), Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Gut, J. Hetflejš, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke, M. Bláhová (Bulletin), M. Ferles (Bulletin), B. Valter (Bulletin), I. Valterová (Bulletin), R. Liboska (webové stránky), P. Zámstný (webové stránky) • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), J. Soušek (Olomouc), J. Šibor (Brno) • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: C. Jiráťová • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, M. Drdák, J. Hanika, J. Churáček, Č. Jech, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ, INZERCI, INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY A PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420(2) 2108 2370, fax +420(2) 2222 0184, e-mail: jiratova@csvts.cz, IČO 444715 • SOUHRNÝ NA INTERNETU/PREPUBLISHED ABSTRACTS ON URL: http://staff.vscht.cz/chem_listy/index.html • TISK: PORS 052, Školní náměstí 11, 537 33 Chrudim; SAZBA: SF SOFT, Jinonická 329, 158 00 Praha 5 • Copyright © 2001 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 100 Kč, roční předplatné 2001 (12 čísel) 1034 Kč. Předplatné ve Slovenské republice 2310 Kč. Pro členy ČSCH je sleva 50 %, pro studenty 70 % • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2001 (12 issues) DEM 440 • Podávání novinových zásilek povoleno ČP s.p. OZ VČ, č.j. PP/I 5333/95 • 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 7/97 na straně 492, nebo budou zaslány na požádání, zkratky odb. časopisů viz 10/97 str. 911 • Instructions for authors will be sent on request. • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zaslány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu. V rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností. SAZBA BULLETINU: B. Valter, SEKRETARIÁT ČSCH: Novotného lávka 5, tel., fax +420(2) 2222 0184, e-mail: mblahova@csvts.cz