

Chemické listy v roce 2000

„Inovuj nebo zemři“ – jedno ze základních podnikatelských pravidel, které platí i pro Chemické listy. Inovace Chemických listů v roce 2000 začíná novým grafickým zpracováním obálky. Magická dvojka v posledním roce druhého milénia k této změně přímo vybízela a kolegové v redakci si již zvykli, že obálka našeho časopisu je mojí prvořadou libůstkou. V zásadě šlo o to, nalézt k naší tradičně slušivé zelené módní barevné doplňky. V minulém roce se nám to dařilo více či méně úspěšně a navíc redakce byla neustále zaměstnávána sháněním vhodných motivů na obálku. Více zatím neprozradím, snad jen poznamenám, že Chemické listy nepatří k časopisům s mnohaletou tradiční obálkou (jako např. Collection) a proto je nutné sledovat nové grafické trendy i v této oblasti.

Domovská stránka Chemických listů také zaznamenala změny a zaznamená další úpravy. Elektronická podoba našeho časopisu se, podle předpokladu, stává čím dál více důležitější. Chemické listy budou i nadále zobrazovány na doméně VŠCHT (http://staff.vscht.cz/chem_listy/index.html), zatímco Bulletin rychle doplníme do současnosti a zobrazíme ho na doméně ÚOCHB AV ČR (<http://www.uochb.cas.cz/bulletin.html>). Na dřívější linku (<http://www.uochb.cas.cz/ChemListy/chemlisty.html>) dáme přesměrování. Tento symetrický vztah Chemické listy – Bulletin, mezi doménami VŠCHT a ÚOCHB, bude respektován i na domovské stránce České společnosti chemické (<http://www.csch.cz/journ.htm>).

To, že čísla 1, 4, 7, 10 budou i v roce 2000 obsahovat Bulletin, je snad již zbytečné připomínat. Jednička je vždy slavnostním vykořeněním, čtyřka se nám stylizuje do aprílové

podoby, sedmičku po loňské dobré zkušenosti opět věnujeme chemickému průmyslu a letos navíc jubileu prof. Paška (tak jsme se dohodli s reprezentacemi České společnosti průmyslové chemie, České společnosti chemického inženýrství a Svazem chemického průmyslu České republiky) a desítka je již několik let zaměřena na životní prostředí. Osmička bude sborníkem příspěvků sjezdu České a Slovenské společnosti pro biochemii a molekulární biologii, devítka bude věnována 52. sjezdu chemických společností v Českých Budějovicích a do jedenáctky již tradičně zanoříme populární organickou, bioorganickou a farmaceutickou konferenci v Liblicích.

I v letošním roce, jako v letech minulých, se budeme snažit průběžně snižovat výrobní náklady. V loňském roce jste jistě zaznamenali vyšší hustotu tisku, zmenšení písma a snížení gramáže papíru. Průběžně optimalizujeme poštovní služby a náklad časopisu. Dovolte mi připomenout, že Bulletinová čísla budeme zasílat pouze těm, kteří o to již projevíli a projeví zájem. Při neustále rostoucím počtu členů ČSCH to ani nelze dělat jinak. Vyvážená ekonomická bilance Chemických listů je prioritní záležitostí a hledání nových finančních zdrojů nikdy nekončící aktivitou členů redakčního kolektivu a funkcionářů České společnosti chemické.

Závěrem doufám, že Chemické listy se přehoupnou do nového tisíciletí ve zdraví, jako časopis stavějící na své 124leté tradici, ale také jako moderní a neustále se rozvíjející periodikum naší široké chemické komunity.

Bohumil Kratochvíl

Redakce časopisu

**Chemické
listy**

uděluje cenu Karla Preise za rok 1999

Petře KUČEROVÉ^a, Martině MACKOVÉ^a a Tomáši MACKOVI^b

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR

za práci

**Perspektivy fytořediace při odstraňování organických polutantů
a xenobiotik z životního prostředí**

Chem. Listy 93, 19–26 (1999)

SRDEČNĚ BLAHOPŘEJEME

AB INITIO VÝPOČTY CHEMICKÝCH POSUNŮ V BIOMOLEKULÁCH

JIŘÍ CZERNEK A VLADIMÍR SKLENÁŘ*

Laboratoř struktury a dynamiky biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: sklenar@chemi.muni.cz, czernek@chemi.muni.cz

Došlo dne 9.II.1999

Klíčová slova: výpočty *ab initio*, chemické posuny, biomolekuly

Obsah

1. Úvod
2. Teoretická část
 - 2.1. Chemický posun
 - 2.2. Přehled výpočetních metod
3. Studované problémy
 - 3.1. Výpočty pro peptidy a báze nukleových kyselin
 - 3.2. Konformační závislost chemických posunů
 - 3.3. Vliv vodíkových vazeb
4. Výhled do budoucna

1. Úvod

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) patří již řadu let k hlavním experimentálním nástrojům studia struktury biomolekul a dynamiky procesů v nich probíhající. Jednou z nejdůležitějších informací, kterou NMR spektrum obsahuje, jsou chemické posuny. Tuto informaci je však možné pro strukturní studie molekul využít jen ve speciálních případech. Uvedená skutečnost je důsledkem toho, že chemické posuny, jak uvidíme v následující kapitole, přímo souvisí s elektronovou strukturou, a jsou tedy ovlivněny ději, jež způsobují změnu distribuce elektronů v molekule. Mezi nejdůležitější z nich patří interní flexibilita (experimentálně zjištěný posun je průměrem přes hodnoty příslušné geometrickým uspořádáním nabytým během trvání experimentu NMR) a intermolekulární interakce (blíže v kapitolách 3.2. a 3.3.). V obou případech není závislost posunu na těchto procesech obecně popsána.

Atraktivní možností, jak výše uvedené vlivy studovat, je provedení výpočtu *ab initio*, tj. neempirického výpočtu, který využívá pouze kvantovou mechaniku a základní fyzikální konstanty. V 90. letech došlo v oblasti výpočtu chemických posunů k prudkému nárůstu počtu publikací jak metodického (přehledný článek¹), tak aplikačního rázu (viz např. ročenky²). Díky rozvoji kvantové chemické teorie jsou současné přístupy *ab initio* schopny poskytnout údaje o chemickém stínění v malých molekulách s poměrně velkou přesností. Rozvoj moder-

ních počítačových technologií v 90. letech zpřístupnil širokému okruhu zájemců pracovní stanice a víceprocesorové superpočítače s výkonem řádu Gflop. Tato technologie se tak stala běžnou součástí vybavení akademických i průmyslových laboratoří. Tyto příznivé okolnosti vedou k rostoucímu zájmu o studium chemických posunů, případně faktorů, jež je ovlivňují, nejen u malých organických molekul, ale i systémů o větší molekulové hmotnosti a fragmentů biomakromolekul jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Jako příklad lze uvést vyčíslení posunů ¹³C v molekule taxolu (C₄₇H₅₁NO₁₄, použito 1037 básových funkcí) se střední kvadratickou odchylkou³ 6,4 ppm a popis vlivu sekundární a terciární struktury na chemické posuny izotopů ¹H, ¹³C, ¹⁵N a ¹⁹F v bílkovinách^{4,5}.

Tento referát shrnuje základní metody výpočtů *ab initio* chemických posunů. Na vybraných příkladech jsou demonstrovány možnosti aplikací těchto výpočtů a diskutovány některé problémy spojené s jejich realizací. Problematika zvoleného tématu je mezioborová. Schopnost nejen přesného vyčíslení absolutního stínění malých molekul, ale reprodukce rozdílů posunů v biologicky zajímavých, komplikovaných systémech je velkou výzvou teoretickým chemikům. Detailní znalost vztahu mezi strukturou a posunem či vlivem mezimolekulárních interakcí na chemické stínění může v mnoha případech usnadnit interpretaci experimentálních NMR dat.

2. Teoretická část

2.1. Chemický posun

Jádra v molekule jsou obklopeny elektrony, jejichž tok ve vnějším magnetickém poli B indukuje vznik lokálního pole \vec{B}^{lok} . Toto pole způsobuje, že dvě NMR aktivní jádra s odlišným chemickým okolím rezonují při různých frekvencích. Indukci na daném jádře lze vyjádřit vztahem

$$\vec{B}_\alpha^{\text{lok}} = (1 - \sigma_{\alpha\beta}) \vec{B}_\beta \quad (1)$$

kde $\vec{B}_\alpha^{\text{lok}}$ je složka magnetického pole ve směru α indukovaná tokem elektronů, který je důsledkem působení vnějšího magnetického pole ve směru β . Chemické stínění je vzhledem k asymetrii rozložení elektronů obecně tenzorovou veličinou charakterizovanou tenzorem druhého řádu $\sigma_{\alpha\beta}$ s devíti elementy. Vhodnou volbou souřadnicové soustavy je možné tento tenzor převést do tvaru, v němž diagonální členy σ_{xx} , σ_{yy} , σ_{zz} jsou jeho hlavními složkami. Jejich průměr

$$\sigma^{\text{izo}} = 1/3 (\sigma_{xx} + \sigma_{yy} + \sigma_{zz}) \quad (2)$$

potom reprezentuje izotropní stínění daného jádra. Zatímco v pevné fázi je v případě studia jednotlivých krystalů možné anizotropní tenzor chemického stínění plně charakterizovat,

* Korespondující autor

v plynné a kapalně fází dochází následkem rychlého a neuspořádaného pohybu k zprůměrování jeho jednotlivých složek. Za předpokladu, že všechny orientace molekuly vzhledem ke směru vnějšího magnetického pole jsou stejně pravděpodobné, je měřitelná pouze veličina σ^{izo} . Izotropní stínění se charakterizuje nejběžněji parametrem δ , nazývaným chemický posun, který je vyjádřen rozdílem rezonanční frekvence měřeného jádra $\nu = \gamma \cdot (1 - \sigma^{\text{izo}})$. B_0 a frekvence zvoleného standardu $\nu_{\text{st}} = \gamma \cdot (1 - \sigma_{\text{st}}^{\text{izo}})$. B_0 normalizovaným vzhledem k indukci vnějšího magnetického pole

$$\delta = (\nu - \nu_{\text{st}}) / \nu_{\text{st}} = (\sigma_{\text{st}}^{\text{izo}} - \sigma^{\text{izo}}) / (1 - \sigma_{\text{st}}^{\text{izo}}) \quad (3)$$

Při teoretickém výpočtu chemického posunu postupujeme tak, že nejprve některou z metod popsanych dále určíme σ^{izo} vybraného jádra. Poté tuto hodnotu odečteme od izotropního stínění standardu získaného buď teoreticky nebo experimentálně; např. stínící konstanta uhlíku ^{13}C v jednom z nejběžnějších standardů, tetramethylsilanu, (TMS) $\sigma^{\text{izo}}(^{13}\text{C})$ je 186,4 ppm (cit.⁶). Takto získaný chemický posun můžeme pak porovnávat s naměřenou hodnotou.

Základy kvantové mechanické teorie chemického stínění pochází ze začátku 50. let (cit.^{7,8}). Stručně a srozumitelně jsou popsány ve sborníku⁹. Jelikož podstata stínění je elektronická, vychází se při výpočtu pro atomové jádro s magnetickým momentem $\vec{\mu}$ ve vnějším magnetickém poli \vec{B} z celkového hamiltoniánu $\hat{H}(\vec{\mu}, \vec{B})$. Energie jádra $E(\vec{\mu}, \vec{B})$ závisí na indukci vnějšího magnetického pole \vec{B} a velikosti $\vec{\mu}$. S použitím Rayleighovy-Schrödingerovy poruchové teorie lze obdržet rozvoj energie $E(\vec{\mu}, \vec{B})$ podle $\vec{\mu}$ a \vec{B} a posléze seřazením členů úměrných současně $\vec{\mu}$ i \vec{B} separovat dva příspěvky ke stínění, a to diamagnetickou a paramagnetickou složku:

$$\sigma_{\alpha\beta} = (\sigma_{\alpha\beta}^{\text{dia}} + \sigma_{\alpha\beta}^{\text{para}}) \quad (4)$$

Diamagnetická část tenzoru chemického stínění popisuje schopnost vnějšího magnetického pole způsobovat proudění náboje v základním elektronickém stavu systému. Její směr je obecně opačný než směr vnějšího magnetického pole, proto zvyšuje stínění daného jádra a tím způsobuje posun jeho rezonančního signálu k menším hodnotám δ . Hodnotu diamagnetické složky lze vypočítat na základě znalosti vlnové funkce základního stavu molekuly $|0\rangle$:

$$\sigma^{\text{dia}} \propto \left\langle 0 \left| \frac{\mathbf{r}_j \mathbf{r}_p}{r_j^3} \right| 0 \right\rangle \quad (5)$$

kde \mathbf{r}_j udává polohu elektronů vzhledem ke studovanému jádru a \mathbf{r}_p vzhledem k počátku vektorového potenciálu vnějšího magnetického pole (viz dále). Jelikož výsledek je málo citlivý ke kvalitě použité báze výpočtu *ab initio* a rychle konverguje při jejím rozšiřování, je jeho získání pro kvantovou chemii relativně snadným úkolem. Vážnější problém představuje výpočet paramagnetické složky. Paramagnetické stínění lze interpretovat jako schopnost vnějšího magnetického pole vyvolávat tok elektronů molekulou, a to využitím orbitalů, jež nejsou obsazeny v základním stavu. σ^{para} působí ve směru blízkém k orientaci \vec{B} a je zodpovědné za zvyšování chemického posunu. Hodnota σ^{para} je dána součtem

$$\sigma^{\text{para}} \propto - \sum_q \frac{1}{E_q - E_0} \left(\langle \mathbf{q} | \frac{\mathbf{L}_j}{r_j^3} | 0 \rangle \langle 0 | \mathbf{L}_p | \mathbf{q} \rangle \right) \quad (6)$$

přes excitované stavy \mathbf{q} systému; E_q a $|\mathbf{q}\rangle$ jsou vlastní energie resp. vlnové funkce jednotlivých stavů a \mathbf{L} je operátor úhlového momentu. Při výpočtu se obvykle postupuje tak, že excitované stavy jsou popsány virtuálními orbitaly přibližné vlnové funkce. Tato povětšinou drastická aproximace (přesnou hodnotu σ^{para} je možné obdržet pouze použitím kompletní báze¹⁰) vede k podstatným chybám. Je užitečné si všimnout, že velikost paramagnetického členu je nepřímo úměrná rozdílu energií základního a příslušného excitovaného stavu. V orbitalové formulaci je tento jev vyjádřen energetickými rozdíly mezi obsazenými a neobsazenými orbitaly. Obecně, pokud molekula má nízko ležící excitovaný stav (resp. malý rozdíl nejvyššího obsazeného a nejnižšího neobsazeného orbitalu), paramagnetické stínění příslušných atomů bude velké.

Vnější magnetické pole \vec{B} vstupuje do výpočtu *ab initio* chemického stínění prostřednictvím vektorového potenciálu \vec{A} tohoto pole. Ve vztazích (5) a (6) se objevují členy závislé na počátku vektorového potenciálu. Polohu tohoto počátku lze umístit do libovolného bodu. Ačkoliv v případě přesného výpočtu by provedená volba vliv na výsledek mít neměla, hodnotu přibližného kvantově chemického řešení výrazně ovlivňuje. Při posunu by součet σ^{dia} a σ^{para} měl zůstat konstantní. V praxi však je chyba vzniklá při výpočtu σ^{para} větší než v případě σ^{dia} a pro různě zvolené počátky \vec{A} tak dostáváme rozdílné hodnoty chemického stínění vybraného atomu studované molekuly. Tento artefakt se anglicky označuje jako gauge [geidž] problem. Podle způsobu, jak se k tomuto problému přistupuje, lze kvantově chemické metodiky výpočtu chemického stínění rozdělit do několika skupin.

2.2. Přehled výpočetních metod

První přístupy^{11,12} vycházející z celkového hamiltoniánu $\hat{H}(\vec{\mu}, \vec{B})$ a označované jako Common Origin Approach (COA) neřešily gauge problem. Složky tenzoru studovaného jádra se počítaly vzhledem k počátku na tomto jádře. Tento přístup vyžaduje pro dosažení shody s experimentem použití obrovské báze. Je možné dokázat, že s kompletní bází poskytuje COA přesné výsledky^{13,14}. Prakticky je tato metoda však použitelná pouze pro dvouatomové molekuly. Pro studium větších systémů bylo vypracováno několik metod, které nejsou závislé na volbě počátku souřadnic vektorového potenciálu. V souvislosti s výpočty biomolekul je třeba zmínit GIAO^{15,16} (Gauge Including Atomic Orbitals) a IGLO^{17,18} (Independent Gauge for Molecular Orbitals) (na nasazení v této oblasti zatím čekají LORG^{19,20} a CSGT^{21,22}). Jejich podstatou je explicitní zahrnutí vektorového potenciálu do atomových (v případě GIAO) resp. lokalizovaných molekulových (IGLO) orbitalů. Z praktického hlediska je důležité, že metoda GIAO, jež byla pro výpočty molekul s biologickou relevancí použita ve většině případů, při rozšiřování báze konverguje k přesnému řešení rychleji. Získané výsledky jsou tedy s využitím srovnatelné báze většinou lepší než při aplikaci přístupu IGLO.

Metodiky pro výpočet chemického stínění lze rovněž rozdělit podle způsobu, kterým počítají jednotlivé složky tenzoru $\sigma_{\alpha\beta}$. Většinou jsou založeny na konečné poruchové teorii. Ta při popisu chemického stínění vychází z definičního vztahu

$$\sigma_{\alpha\beta} = \left. \frac{\partial^2 E(\vec{\mu}, \vec{B})}{\partial \vec{\mu}_\alpha \partial \vec{B}_\beta} \right|_{\vec{\mu}=0, \vec{B}=0} \quad (8)$$

Prakticky lze $\sigma_{\alpha\beta}$ vypočítat ze vztahu

$$\sigma_{\alpha\beta} = h_{\alpha\beta}^{11} P^0 + h_{\alpha\beta}^{01} P^1 \quad (9)$$

Tvary operátorů $h_{\alpha\beta}^{11}$ a $h_{\alpha\beta}^{01}$ jsou uvedeny v již citovaném sborníku⁹. P^0 je matice hustoty neporušeného systému, P^1 matice hustoty prvního řádu popisující míchání obsazených a neobsazených orbitalů v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Výpočet P^0 je rutinní záležitostí, P^1 se získává řešením sprážených Hartreeho-Fockových (HF) rovnic s magnetickým polem jako poruchou (Coupled Perturbed Hartree-Fock Equations). Základním kvantově chemickým přístupem pro nalezení vlnové funkce systému a jeho energetických hladin je Hartreeho-Fockova metoda selfkonzistentního pole (SCF), tj. použití jednodeterminantového přiblížení a hledání efektivního pole pro odpuzování elektronů. Konečná poruchová teorie chemického stínění ve spojení s takto nalezenou vlnovou funkcí a některou z metod nezávislých na volbě počátku vektorového potenciálu (např. GIAO) tvoří příslušný přístup CHF (např. CHF-GIAO). Jím získané hodnoty jsou v literatuře často označovány jen jako data HF resp. SCF.

Elektronová korelace, tj. rozdíl repulse elektronů vyjádřené pomocí efektivního pole a vypočítané přesně, má v některých případech zásadní vliv na popis stínění. Pro některé molekuly (včetně malých, např. dusík) ani použití rozsáhlé báze v rámci žádného z přístupů CHF neposkytne posuny blízké experimentálním hodnotám. Pro výpočty chemického stínění fragmentů biomolekul byly použity dvě metodiky zahrnující elektronovou korelaci (korelované). K přesnému popisu menších systémů je možno využít Møllerovu-Plessetovu (MP) poruchovou teorii. Její podstatou je, že rozdíl mezi výpočtem se zahrnutím přesné elektronové repulse a s využitím efektivního pole v rovnicích HF se vyjadřuje formou poruchy různých řádů. Nejznámější je poruchová teorie druhého řádu (MP2), která je důležitá např. při výpočtu přesných molekulárních geometrií. Výpočet stínění metodou MP používá matic hustoty a postupu naznačeného rovnicí (9). Výpočetní vyjádření odpovídajících matic hustoty bylo však nalezeno teprve v 90. letech^{23,24}.

Další korelované metody jsou založeny na teorii funkcionálu hustoty²⁵ (Density Functional Theory, DFT). Tato teorie popisuje přímo elektronovou hustotou, jež automaticky určuje počet elektronů a ostatní elektronické charakteristiky – tedy i chemické stínění. Formálně je podobná teorii SCF. Orbitály a jím odpovídající energie hledá pomocí rovnic Kohnových-Shamových (KS), jež jsou obdobou rovnic HF; pro systém s poruchou používá rovnice CPKS (Coupled Perturbed Kohn Sham Equations). Z několika implementací DFT pro výpočet stínění se jeví jako nejatraktivnější SOS-DFPT^{26,27} (Sum-Over-States Density Functional Perturbation Theory) ve spojení s metodikou IGLO. Po nalezení orbitalů KS neřeší rovnice s poruchou jako alternativní přiblížení UDFT³ (Uncoupled DFT, nespřážená teorie funkcionálu hustoty pro popis chemického stínění). Tím je metodika SOS-DFPT-IGLO tzv. proces

N^3 . Toto označení zjednodušeně znamená, že výpočetní čas roste s třetí mocninou počtu bázevých funkcí. UDFT a CHF mají závislost N^4 a poruchová teorie MP2 je dokonce proces N^5 . Tato skutečnost ve spojení s přesností danou zahrnutím elektronové korelace činí použití SOS-DFPT-IGLO pro biomolekuly velmi přitažlivým (viz např.^{28,29}).

3. Studované problémy

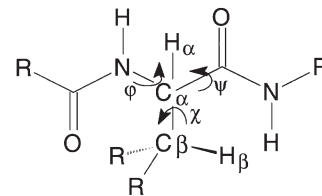
3.1. Výpočty pro peptidy a báze nukleových kyselin

Následující část je věnována využití výše uvedené teorie při studiu vybraných stavebních jednotek biopolymerů, a to bází nukleových kyselin, aminokyselin a modelů peptidů a bílkovin. Místo detailního citování konkrétních výsledků (podrobnosti viz uvedená literatura) hledá text spíše odpovědi na následující otázky: Jaké jsou velikosti změn chemických posunů různých atomů v závislosti na změnách struktury, geometrie a okolí studovaných molekul; které metody je třeba použít pro postihnání těchto změn (jsou přístupy SCF dostatečné nebo zahrnutí korelační energie poskytne jiný obraz?) a konečně, jakou geometrii je vhodné použít pro daný výpočet *ab initio*?

Systematické studium stínění atomů bází nukleových kyselin bylo cílem pouze jediné studie³⁰. Jedná se o výpočty přístupem IGLO bez zahrnutí korelační energie a s použitím relativně malých (kvality přibližně triple zeta) bází. Obě tyto okolnosti přispěly k odchylkám od experimentu velikosti až 13 ppm pro uhlíkové a 30 ppm pro dusíkové posuny. V současné době lze metodami DFT ve větších bázích dosáhnout podstatně přesnějších výsledků³¹. Detailně byly prostudovány dusíky uracilu³²; o této práci se zmíníme při diskusi vlivu vodíkových vazeb na posun v další kapitole.

Odlišná situace panuje v oblasti složek bílkovin – aminokyselin resp. peptidů. Dvě významné empirické studie se zabývaly statistickými korelacemi mezi posuny uhlíků páteře bílkoviny (obr. 1) a její sekundární strukturou^{33,34}. Je zřejmé, že pochopení a schopnost předpovědi těchto závislostí by usnadnila řešení struktur bílkovin. Proto se také několik nezávisle pracujících skupin autorů snažilo o rozřešení otázek uvedených na začátku této kapitoly^{26,35-47}.

Základním údajem, jež do výpočtu *ab initio* vstupuje, jsou vnitřní souřadnice dané molekuly. Experimentální údaje, pro větší molekuly získávané zpravidla z dat rentgenové strukturní nebo NMR analýzy, jsou ovlivněny konkrétním uspořádáním v krystalu nebo interakcemi v roztoku (více v kapitole 3.3.). Jejich přesnost není mnohdy dostatečná a pro modelové systémy jsou tato data povětšinou nedostupná. Proto se obvyk-



Obr. 1. Schématické znázornění vazebné struktury peptidického řetězce. Dihedrální úhly páteře ϕ , resp. ψ jsou definovány jako $C^O-N-C_\alpha-C^O$ resp. $N-C_\alpha-C^O-N$, χ označuje dihedrální úhel bočního řetězce $H_\beta-C_\beta-C_\alpha-H_\alpha$

le provádí optimalizace geometrie. Tento výpočet představuje samostatný problém se specifickými požadavky na volbu metody a použití vhodné báze. Kvalita geometrie je velmi důležitá pro získání správných hodnot absolutního stínění atomů aminokyselin. Přístupem CHF-GIAO s kvalitníází byly vypočteny³⁵ závislosti stínění na vazebných délkách r a vazebných úhlech ϑ . Nalezené hodnoty jsou řádu 10^1 ppm. A^{-1} pro $d\sigma/dr$ a 10^{-1} ppm. $(1^\circ)^{-1}$ pro $d\sigma/d\vartheta$. Je známo, že směrnice závislosti $d\sigma/dr$ je záporná, protože s rostoucí vazebnou délkou klesají příslušné excitační energie. Výsledkem je zvětšení paramagnetického členu, který je záporný. Z tohoto důvodu způsobuje podhodnocení vazebné délky nadhodnocení stínění. Porovnáme-li výsledky získané metodami HF a MP2 s využitím střední báze pro optimalizaci geometrie, jsou vazebné délky z HF výpočtů kratší než při použití metody MP2. Ukazuje se však, že nadhodnocení stínění v důsledku použití méně správné HF geometrie je systematické, tzn. že rozdíly posunů mezi jednotlivými atomy zůstávají zachovány^{38,43}. Při sledování vlivu dihedrálního úhlu na stínění lze přispěvek změny vazebných délek a úhlů jako výsledek geometrické optimalizace zanedbat, poněvadž pro aminokyseliny a modely peptidů jsou změny stínění z více než 90 % určovány příslušným dihedrálním úhlem³⁸.

Obecně platí, že HF metody nadhodnocují energetické rozdíly mezi obsazenými a virtuálními orbitály, což vede (vztah (6)) k podhodnocení paramagnetického členu a ve svém důsledku ke zvýšení chemického stínění ve srovnání s výsledky korelovaných metod. Orbitály π peptidické skupiny mají tendenci ležet vysoko v souboru obsazených orbitalů. Současně jak nevazebné orbitály typu n volných elektronových párů karboxylového kyslíku a amidického dusíku, tak orbitály π^* patří mezi nejnižší ležící neobsazené orbitály. Proto se použití přístupu SCF na absolutním stínění tohoto fragmentu dramaticky projeví (např. CHF-GIAO nadhodnocuje stínění karboxylového uhlíku o cca 20 ppm, ale C_α pouze do 1 ppm, ve srovnání s MP2-GIAO za použití stejné báze pro tutéž geometrii modelového peptidu⁴³). Pro výzkum biomolekul je zásadní, zda teoretické metody jsou s to reprodukovat trendy v chemických posunech při strukturálních změnách. V tomto ohledu je situace příznivá – rozdíly stínění mezi jednotlivými konformacemi lze adekvátně popsat již na úrovni SCF; pro správnější určení absolutních hodnot posunů při různých hodnotách dihedrálního úhlu byl navržen zajímavý postup⁴³. Pro jeden konformer se vypočítá stínění přístupem MP2 a rozdíl $\delta(\text{MP2}) - \delta(\text{HF})$ pro tento úhel je přičten k hodnotám získaným pro všechny studované dihedrální úhly metodou HF.

3.2. Konformační závislost chemických posunů

Experimentálně stanovený chemický posun je průměrem přes všechna prostorová uspořádání molekul během doby snímání NMR signálu. Z teorie vyplývá, že čas, po který je molekula v určité konfiguraci, lze určit na základě znalosti energetické hyperplochy. Hodnota posunu v každé nabyté konfiguraci je dána bodem na hyperploše stínění, která vyjadřuje závislost chemického posunu na uvažovaných vnitřních souřadnicích daného systému. Jak již bylo uvedeno, v případě bílkovin jsou známy empirické korelace mezi posuny a sekundární resp. terciární strukturou. Mezi nejdůležitější patří vyšší posuny ^{13}C na C_α a C_β v α -šroubovici než v β -hřebenu a naopak

zvýšení posunů ^1H α -vodíků při přechodu z α -šroubovice do β -hřebenu. Je proto na místě pokusit se o sestrojení hyperploch stínění bílkovin na základě výpočtů *ab initio*. Ukazuje se, že pro reprodukci hlavních experimentálních trendů stačí uvažovat závislost posunu na několika málo dihedrálních úhlech modelových sloučenin. Konkrétně jde o úhly ϕ a ψ při popisu páteře biomolekuly a úhel χ pro určování příspěvků bočních řetězců. Jako modely byly použity systémy od glycinu až po heptapeptid $\text{HCO} - (\text{Gly})_3 - \text{Ala} - (\text{Gly})_3 - \text{NH}_2$ (cit.³⁸). Postup byl ověřován tak, že pro vybranou bílkovinu (v klíčové práci³⁶ byla zkoumána nukleasa *Staphylococca*), jejíž krystalová struktura (a tedy i úhly ϕ , ψ , χ jednotlivých reziduí) i NMR spektrum jsou známy, se odečítaly δ z vypočtené hyperplochy stínění a porovnávaly s experimentálními údaji pro odpovídající hodnoty torzí. Shoda posunů ^{13}C vypočtených s naměřenými je dobrá (např. pro C_α dvanácti alaninových reziduí byla směrnice závislosti experimentálních hodnot na vypočtených 0,85 s regresním koeficientem 0,94). Shodu teorie s experimentem je možné ještě zlepšit zahrnutím elektrostatických interakcí a vodíkových můstků (viz dále). Diskusi dosud publikovaných dat pro jednotlivé atomy několika aminokyselin lze nalézt v článku³⁵.

Pro správný popis posunů těžších atomů první periody hyperplocha stínění modelového peptidu nestačí. ^{15}N , ^{17}O a ^{19}F jsou (kromě ovlivnění mezimolekulárními interakcemi popsanému v kapitole 3.3.) mnohem citlivější k silám dalekého dosahu. V případě bílkovin je proto stínění těchto jader silně ovlivněno přítomností polárních skupin. V principu samozřejmě lze tento efekt popsat *ab initio*, prakticky však by výpočet hyperplochy stínění velkého fragmentu biomolekuly byl ne-li neproveditelný, tak přinejmenším velmi nákladný. Proto se hledaly strategie, jež by umožnily zahrnutí vlivu interakcí dalekého dosahu bez zvyšování počtu atomů v bázevými funkcemi. Při nejrozšířenějším přibližném popisu³⁶ se celkové stínění σ daného atomu předpokládá ve tvaru součtu

$$\sigma = \sigma_e + \sigma_p + \sigma_o \quad (10)$$

kde σ_e je stínění vypočtené některou z dosud uvedených metod (elektronický příspěvek, nazývaný také příspěvek sil krátkého dosahu, protože se určuje pouze pro malou okolní část kolem daného atomu biomolekuly), σ_p vyjadřuje elektrostatickou polarizaci v okolí jádra (příspěvek sil dalekého dosahu), a σ_o zahrnuje ostatní vlivy na stínění (magnetické – susceptibilitu vzorku, vliv kruhových proudů a pod.). Člen σ_o je pro atomy jiné než vodík malý; mívá hodnoty řádu chyb určení ostatních členů z (10) a proto se zanedbává.

Pro výpočet σ_p se ujalý dvě metody podrobně popsané v práci⁴⁸. První z nich atomy zkoumaného fragmentu, které nepopisuje člen σ_e , aproximuje bodovými náboji. Tyto jsou formou multipólů nižších řádů zahrnuty do hamiltoniánu pro výpočet složek tenzoru stínění. Výsledkem je hodnota, která je součtem σ_e a σ_p . Tento postup je označován jako metoda Charge Field Perturbation (CFP). Druhý přístup, tzv. Multipole Shielding Polarizability (MSP), využívá polarizabilit stínění, tj. derivací stínění podle složek vnějšího elektrostatického pole. Při předpokládaném tvaru závislosti stínění na elektrickém poli lze σ_p stanovit na základě klasicky určené hodnoty elektrostatického pole (a jeho gradientů) v místě studovaného jádra. V práci³⁶ byly studovány obě zmíněné metodiky. Přístup MSP úspěšně reprodukoval ^{15}N stínění amidických dusíků

valinových reziduí a metoda CFP správně určila ^{19}F posuny 5-F-tryptofanů zkoumaných proteinů.

Výpočet trojrozměrné struktury biomakromolekul z NMR dat je možné schematicky popsat takto: Nejprve jsou z více-dimenzionálních NMR spekter přiřazeny jednotlivé signály konkrétním atomům ve studované molekule. S využitím nukleárního Overhauserova efektu (NOE) jsou určeny vzdálenosti vodíkových atomů menší než 5 Å. Ze změřených spin-spinových interakčních konstant jsou stanoveny hodnoty některých dihedrálních úhlů pomocí Karplusových rovnic. Tyto údaje společně se základními molekulárními parametry slouží následně jako vstup pro geometrickou optimalizaci pomocí metod distanční geometrie a molekulové dynamiky. Uvedené metody s využitím poměrně jednoduchých silových polí hledají výsledné struktury nejlépe splňující vstupní vazebné podmínky. V optimálním případě lze naznačeným postupem nalézt globální energetické minimum studovaného systému.

Poněvadž chemický posun je jednoznačně diktován strukturním uspořádáním, nabízí se myšlenka využít hyperploch stínění k vymezení dalších vazebných podmínek pro optimalizaci geometrie. Byly navrženy dva možné postupy⁴⁰:

První z nich využívá naměřených posunů jader pro získání hodnot dihedrálních úhlů. Např. z dat ^{13}C a ^1H je možné v případě aminokyselin zjistit úhly φ , ψ a χ . Pro zahrnutí takto získaných torzí do molekulové dynamiky byla vyvinuta metodika tzv. plochy Z (Z-surface)⁴¹. V obecném případě plocha Z udává pravděpodobnost, s jakou soubor spektroskopických parametrů $\{P_i\}$ (např. ^{13}C chemických posunů) závisí na konkrétním prostorovém uspořádání atomů (např. dihedrálních úhlech φ , ψ bílkoviny). Známe-li funkční závislost $P = P(f(\alpha, \beta, \dots))$, je pravděpodobnost, že experimentální hodnota P_{exp} odpovídá geometrickým parametrům α, β, \dots , definována plochou Z

$$Z = \exp\left(-\frac{P_{\text{exp}} - f(\alpha, \beta, \dots)^2}{W}\right) \quad (11)$$

W je „šířka prohledávání“ vyjadřující výpočetní resp. experimentální nepřesnosti. Při řešení struktury s využitím plochy Z jsou kromě experimentálních dat do výpočtu zahrnuty i dihedrální úhly φ, ψ, χ získané z naměřených chemických posunů. Tyto údaje slouží jako vstupní data pro výpočet molekulové dynamiky programem⁴⁹ X-PLOR, který hledá energetická minima konzistentní s uvedenými daty. Výsledkem tedy jsou mj. nové dihedrální úhly φ', ψ', χ' , pro něž je možno zpětně vypočítat chemické posuny metodami *ab initio* za účelem ověření nalezené geometrie.

Druhou možností je vypočítat pro experimentální úhly hodnoty posunů *ab initio* a tyto posuny zahrnout jako vazebné podmínky minimalizace. Pro tyto účely byla vyvinuta modifikovaná verze X-PLORu označovaná jako DPLORE (cit.⁴⁰). Výslednou strukturu lze opět podrobit kontrole určením teoretických posunů.

3.3. Vliv vodíkových vazeb

Všechny běžné sekundární struktury nalezené v bílkovinných ležích v povolených oblastech konformační mapy torzních úhlů φ, ψ (Ramachandranův diagram). Pokud konformace spadající do některé z těchto oblastí má být sice stericky

povoleným, ale nestálým uspořádáním, musí být stabilizována. Na této stabilizaci se významně podílí vodíkové můstky. Nyní se zmíníme o nejdůležitějších pracích^{32,37,46}, které simulovaly ovlivnění chemického stínění intermolekulárními vodíkovými vazbami mezi strukturními prvky molekul s biologickou relevancí. Autoři nereprodukovali pouze hodnotu izotropního stínění studovaných atomů, ale snažili se získat kompletní informaci, kterou lze analýzou tenzoru chemického stínění obdržet, tj. tři hlavní složky $\sigma_{xx}, \sigma_{yy}, \sigma_{zz}$ a jejich orientaci určenou třemi směrovými kosiny vzhledem ke zvolené soustavě souřadnic molekuly. Experimentálně lze uvedená data získat z NMR měření v pevné fázi. Z teoretického hlediska je při výpočtu podstatné, že k faktorům jako neúplnost báze, chyba metody (např. nezahrnutí korelační energie), kvalita geometrie a vliv mezimolekulárních interakcí je těchto šest hodnot obecně mnohem citlivějších než izotropní stínění σ^{izo} .

Pro studium vlivu mezimolekulárních interakcí existují dva základní přístupy. První z nich do výpočtu *ab initio* explicitně zahrnuje okolní molekuly. V již zmíněné studii³² byly přístupem CHF-GIAO v malé bázi (D95**) reprodukovány hlavní složky tenzoru ^{15}N stínění dusíků uracilu se střední kvadratickou odchylkou 25,1 ppm a směrnici lineární závislosti naměřených hodnot proti vypočteným $-0,94$. Krystal uracilu je uspořádán tak, že dusíkové atomy sousedí s kyslíky okolních molekul mřížky. Vliv tohoto uspořádání na stínění byl simulován přidáním formaldehydu k oběma dusíkům, a to do vzdálenosti stejné jako v krystalové struktuře uracilu. Shoda teorie s experimentem je v případě tohoto postupu ještě lepší (pro uvedenou bázi klesla střední kvadratická odchylka na 16,9 ppm a směrnice byla 1,01).

^{13}C posuny karbonylových uhlíků podobně jako posuny atomů C_α a C_β silně korelují se sekundární strukturou bílkovin – např. alaninová rezidua β -hřebenu jsou v průměru o 4,6 ppm více stíněna oproti α -šroubovicím⁵⁰. Cílem práce³⁷ bylo reprodukovat tento experimentální trend. Jelikož předchozí výpočty *ab initio*, které vliv vodíkových vazeb neuvažovaly, neuspěly^{42,43}, autoři vytvořili jednoduchý model – N-methylacetamid s vodíkovou vazbou na formamid – a pro jeho různé geometrie zkoumali metodou CHF-GIAO s dostatečně velkou (6-311++G(2d,2p)) bází stínění karbonylového uhlíku. Experimentální tendence byla reprodukována. Výborné shody s výše uvedeným empirickým faktem bylo dosaženo pro N-formylpentaalaninamid jako model alaninových reziduí bílkovin. Při použití optimalizované geometrie jeho α -šroubovice a β -hřebenu CHF-GIAO přístup s bází 6-31G předpověděl rozdíl 4,9 ppm.

Aminokyseliny jsou v krystalu přítomny ve formě obojetného iontu, tj. s $-\text{CO}_2^-$ a $-\text{NH}_3^+$ skupinou, u něhož se dá předpokládat silné ovlivnění stínění karbonylových uhlíků mezimolekulárními interakcemi. Práce⁴⁸ zabývající se α -glycinem v pevné fázi toto potvrdila: Výpočet SOS-DFPT-IGLO s adekvátní bází pro izolovaný obojetný ion poskytl ^{13}C posun karbonylového uhlíku zatížen značnou chybou ($\delta_{\text{teor}} = -29,1$ ppm, $\delta_{\text{exp}} = -48,6$ ppm) a dokonce zaměnil pořadí hlavních složek tenzoru chemického stínění. Zahrnutí dvou NH_3^+ molekul v sousedství $-\text{CO}_2^-$ skupiny do výpočtu zlepšilo výsledky jen částečně: $\delta_{\text{teor}} = -35,6$ ppm při správném pořadí hlavních složek. Teprve rozšíření tohoto klastru o dva HCO_2^- fragmenty v okolí $-\text{NH}_3^+$ skupiny glycinu poskytlo pro toto obtížné jádro výsledky v dobré shodě s experimentem ($\delta_{\text{teor}} = -43,8$ ppm, $\delta_{\text{exp}} = -48,6$ ppm).

Do výpočtu *ab initio* je taktéž možno explicitně zahrnout

molekuly rozpouštědla a studovat tak vliv solvatace, která může mít podstatný vliv na chemické stínění některých jader. (Je dobré si uvědomit, že např. hyperplochy stínění zmíněné v kapitole 3.2. byly získány výpočty *ab initio* izolovaných molekul. Použitelnost hyperploch pro popis dvourozměrné struktury je umožněna příznivým faktem, že změny posunů uhlíků C_α a C_β závisí prakticky pouze na lokální struktuře, tj. na hodnotách ϕ a ψ při zanedbatelném vlivu současných změn ostatních vnitřních souřadnic, a nejsou ovlivněny prostředím, v němž se konkrétní reziduum v biomolekule nachází.) Pro peptidy byl vliv solvatace výpočetně studován na úrovni CHF-GIAO (cit.⁴⁵). K modelovému dipeptidu byly postupně přidány dvě molekuly vody, jedna do okolí karbonylového kyslíku, druhá k amidickému protonu, a zkoumány změny tenzoru chemického stínění atomů peptidické vazby. Byla pozorována aditivita vlivu hydratace na složky tenzoru a jeho orientaci (1) (příslušný údaj pro strukturu s dvěma molekulami vody byl přibližně dvojnásobkem hodnoty v monohydrátu) a výrazná změna orientace tenzoru amidického protonu při hydrataci (2). Pokud by uvedené závislosti byly prokázány i pro větší modelové peptidy a vyšší rozsah solvatace, mohly by najít použití při určování stupně solvatace z měření změn posunů (1) či určování geometrie solvatovaného fragmentu na základě znalosti orientace tenzorů chemického stínění (2).

Druhou principiální možností postihnout vlivu mezimolekulárních interakcí na chemické stínění je nasazení výše popsaného přístupu CFP (cit.⁴⁸), což tomto případě znamená zahrnutí bodových nábojů atomů tvořících vodíkové vazby se studovaným fragmentem. V publikaci³⁹ jsou výsledky výpočtů pro threonin a tyrosin v pevné fázi, kde, jak již bylo uvedeno, se aminokyseliny nacházejí ve formě obojetných iontů a jsou proto silně ovlivněny intermolekulárními vodíkovými můstky. Pro složky tenzorů stínění ^{13}C izolovaných obojetných iontů autoři obdrželi střední kvadratickou odchylku mezi teoreticky vypočtenými a experimentálními hodnotami 12,3 ppm. Pro zlepšení výsledku výpočtu byly intermolekulární interakce simulovány tak, že základní buňka obsahující čtyři aminokyseliny byla obklopena dalšími 28 molekulami v geometrické konfiguraci odpovídající uspořádání v krystalové mřížce. Na atomy jedné z aminokyselin základní buňky poté umístili funkce báze 6-31G** a všechny ostatní aminokyseliny reprezentovali bodovými náboji. Střední kvadratická odchylka klesla o polovinu (na 6,4 ppm).

Již dříve zmíněná práce³⁶ využila pro modelování vodíkové vazby také přístupu CFP. Ke kyslíku peptidické skupiny modelového dipeptidu byly umístěny bodové náboje reprezentující amoniak. Byla zkoumána závislost rozdílu mezi ^{15}N stíněním peptidického dusíku v tomto uspořádání a v izolovaném dipeptidu na délce vodíkové vazby. Pro typickou délku vodíkových můstků v bílkovinách 3,0 Å byla hodnota tohoto rozdílu přibližně -1 ppm. Kontrolní výpočet, jenž celý klastr počítal *ab initio*, poskytl hodnotu blízkou -2 ppm. Tento model vlivu vodíkových vazeb na dusíkové stínění je maximálně zjednodušený a reprodukuje pouze znaménko změn (experimentální rozdíly jsou větší než -30 ppm).

4. Výhled do budoucna

Z výše prezentovaného přehledu vyplývá, že v současnosti existuje již několik dobře zvládnutých metod výpočtu chemického stínění použitelných pro rozměrné systémy. Diskutované metodiky dokáží nejenom správně předpovědět hodnotu chemického posunu, ale i teoreticky zkoumat konstituční, geometrické, rozpouštědlové a jiné vlivy ovlivňující chemický posun. Tím umožňují porozumění jeho podstatě a faktorům, na nichž tato důležitá experimentální veličina závisí.

Jelikož se moduly pro výpočet chemického stínění stávají součástí běžně dostupných kvantově chemických programů, není daleko doba, kdy pro fragmenty biomolekul bude možné počítat chemické posuny přímo na pracovních stanicích NMR laboratoří. Velký nárůst aplikací lze očekávat hlavně v případě nukleových kyselin. Jistě se nezastaví ani vývoj teorie. Příznivé důsledky pro výpočty *ab initio* posunů biomolekul bude mít další rozvoj teorie funkcionálu hustoty. V této souvislosti je očekávána hlavně výpočetně efektivní metodika s výměnné korelačním funkcionálem přímo závislejícím na magnetickém poli⁵¹. V budoucnu bude snad možné i pro větší molekuly přesněji předpovědět a lépe pochopit hodnoty chemických posunů, podobně jak lze již dnes určovat jejich geometrie a energie.

LITERATURA

1. Chesnut D. B.: Annu. Rep. NMR Spectrosc. 29, 71 (1994).
2. Jameson C. J., v knize: *Nuclear Magnetic Resonance, Specialist Periodical Reports* (Webb G.A., ed.), sv. 8–25. The Royal Society of Chemistry, London 1980–1996.
3. Cheeseman J. R., Trucks G. W., Keith T. A., Frish M. J.: J. Chem. Phys. 104, 5497 (1996).
4. de Dios A. C., Pearson J. G., Oldfield E.: Science 260, 1491 (1993).
5. de Dios A.C.: J. Prog. Nuc. Magn. Spectrosc. 29, 229 (1996).
6. Jameson A. K., Jameson C. J.: Chem. Phys. Lett. 134, 461 (1987).
7. Ramsey N. F.: Phys. Rev. 78, 699 (1950).
8. Ramsey N. F.: Phys. Rev. 86, 243 (1952).
9. Beveridge D. L., v knize: *Semiempirical Methods of Electronic Structure Calculation* (Segal G. A., ed.), str. 163. Plenum Press, New York 1977.
10. Hehre W. J., Radom L., Schleyer P. v. R., Pople J. A.: *Ab Initio Molecular Orbital Theory*. Wiley, New York 1986.
11. Stevens R. M., Pitzer R. M., Lipscomb W. N.: J. Chem. Phys. 38, 550 (1963).
12. Ditchfield R., Miller D. P., Pople J. A.: J. Chem. Phys. 49, 2960 (1968).
13. Epstein S. T.: J. Chem. Phys. 42, 2897 (1965).
14. Epstein S. T.: J. Chem. Phys. 58, 1592 (1973).
15. Ditchfield R.: Mol. Phys. 27, 789 (1974).
16. Wolinski K., Hinton J. F., Pulay P.: J. Am. Chem. Soc. 112, 8251 (1990).
17. Kutzelnigg W.: Israel J. Chem. 19, 193 (1980).
18. Schindler M., Kutzelnigg W.: J. Chem. Phys. 76, 1919 (1982).
19. Hansen Aa. E., Bouman T. D.: J. Chem. Phys. 82, 5035 (1985).
20. Bouman T. D., Hansen Aa. E.: Chem. Phys. Lett. 82, 510 (1988).
21. Keith T. A., Bader R. F. W.: Chem. Phys. Lett. 210, 223 (1993).

22. Keith T. A., Bader R. F. W.: *J. Chem. Phys.* **99**, 3669 (1993).
23. Gauss J.: *Chem. Phys. Lett.* **191**, 614 (1992).
24. Gauss J.: *Chem. Phys. Lett.* **229**, 198 (1994).
25. Parr R. G., Yang W.: *Density – Functional Theory of Atoms and Molecules*. Clarendon Press, Oxford 1989.
26. Malkin V. G., Malkina O. L., Casida M. E., Salahub D. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5898 (1994).
27. Malkin V. G., Malkina O. L., Eriksson L. A., Salahub D. R., v knize: *Theoretical and Computational Chemistry* (Seminario J. M., Politzer P., ed.), sv. II, str. 273. Elsevier, Amsterdam 1995.
28. Hricovíni M., Malkina O. L., Bízík F., Turi Nagy L., Malkin V. G.: *J. Phys. Chem. A* **101**, 9756 (1997).
29. Case D. A.: *J. Biomol. NMR* **6**, 341 (1995).
30. Schindler M.: *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6623 (1988).
31. Czernek J., Sklenář V.: *J. Phys. Chem. A* **103**, 4089 (1999).
32. Anderson-Altman K. L., Phung C. G., Mavromoustakos S., Zheng Z., Facelli J. C., Poulter C. D., Grant D. M.: *J. Phys. Chem.* **99**, 10454 (1995).
33. Spera S., Bax A.: *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5490 (1991).
34. Wishart D. S., Sykes B. D., Richards F. M.: *J. Mol. Biol.* **222**, 311 (1991).
35. de Dios A. C., Pearson J. G., Oldfield E.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9768 (1993).
36. de Dios A. C., Pearson J. G., Oldfield E.: *Science* **260**, 1491 (1993).
37. de Dios A. C., Oldfield E.: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11485 (1994).
38. de Dios A. C., Oldfield E.: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5307 (1994).
39. de Dios A. C., Laws D. D., Oldfield E.: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7784 (1994).
40. Le H., Pearson J. G., de Dios A. C., Oldfield E.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3800 (1995).
41. Pearson J. G., Wang J., Markley J. L., Le H., Oldfield E.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8823 (1995).
42. Jiao D., Barfield M., Hruby V. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10883 (1993).
43. Sulzbach H. M., Schleyer P. v. R., Schaefer III H. F.: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3967 (1994).
44. Chesnut D. B., Phung C. G.: *Chem. Phys. Lett.* **183**, 505 (1991).
45. Chesnut D. B., Phung C. G., v knize: *Nuclear Magnetic Shieldings and Molecular Structure* (Tosell J. A., ed.), str. 221. Kluwer, Amsterdam 1993.
46. Malkin V. G., Malkina O. L., Salahub D. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3294 (1995).
47. Woolf T. B., Malkin V. G., Malkina O. L., Salahub D. R., Roux B.: *Chem. Phys. Lett.* **239**, 18 (1995).
48. de Dios A. C., Oldfield E.: *Chem. Phys. Lett.* **205**, 108 (1993).
49. Brunger A. T.: *X-PLOR*. Yale University Press, New Haven 1992.
50. Wishart D. S., Sykes B. D.: *J. Biomol. NMR* **4**, 171 (1994).
51. Harris R. A., Salsbury F. R., Jr.: *J. Chem. Phys.* **109**, 2609 (1998).

J. Czernek and V. Sklenář (*Laboratory of Structure and Dynamics of Biomolecules, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Ab initio Calculations of NMR Chemical Shifts in Biomolecular Systems**

A survey of the theory of *ab initio* calculations of chemical shifts of ^1H , ^{13}C , ^{15}N and ^{19}F in NMR spectra and its most important applications in the study of biologically relevant molecules are given. The review is focused on theoretical investigation of constitutional, geometric, and hydration-interaction effects on the chemical shift.

AFINITNÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

VĚRA PACÁKOVÁ^a, KAREL ŠTULÍK^a,
SILVIE HUBENÁ^a a MARIE TICHÁ^b

^aKatedra analytické chemie, ^bKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 43 Praha 2, e-mail: pacáková@natur.cuni.cz

Došlo dne: 10.VI.1999

Klíčová slova: afinitní kapilární elektroforéza, stanovení rovnovážných konstant, aplikace

Obsah

1. Úvod
2. Principy afinitní elektroforézy
3. Analýza rovnovážných směsí
4. Analýza založená na změně mobility
5. Požadavky na systém pro afinitní kapilární elektroforézu
6. Imunitní stanovení založená na kapilární elektroforéze
 - 6.1. Nekompetitivní (přímé) imunitní stanovení
 - 6.2. Kompetitivní (nepřímé) imunitní stanovení
7. Příklady použití afinitní kapilární elektroforézy
8. Závěr

1. Úvod

Současný pokrok v biologických vědách závisí do značné míry na vývoji nových moderních analytických separačních metod, jako jsou chromatografické a elektroforetické metody. Elektroforetické metody se využívají v biochemickém výzkumu již několik desítek let. Jejich výpovědní schopnost je vysoká, protože jsou založeny na důležitých charakteristikách biomolekul, jako jsou molekulová hmotnost a elektrický náboj. Metody, které využívají bioafinitní princip, mají další výhodu v tom, že se v nich uplatňuje snad vůbec nejvýznamnější vlastnost biomolekul, tj. specifické rozpoznávání, které tvoří základ všech vysoce selektivních biologických procesů. Aplikace elektroforézy ke studiu specifických interakcí vedla ke vzniku řady technik, které nesou obecný název „afinitní elektroforéza“, např.¹⁻³

Význam a rozsah aplikací elektroforetických metod značně vzrostl nedávným rozvinutím a komercializací kapilární elektroforézy (CE). Vysoká citlivost, vynikající rozlišovací schopnost, rychlost analýzy a dobrá přesnost stanovení, malý objem vzorků potřebný pro analýzu, nízká spotřeba reagensů a rozsáhlé možnosti automatizace jsou hlavní výhody CE ve srovnání např. s elektroforézou ve vrstvě nebo sloupci gelu. Kapilární elektroforéza, které je věnována řada monografií (např.⁴⁻⁶), se obvykle provádí v homogenním roztoku (kapilár-

ní zónová elektroforéza, CZE), avšak je možné využít kapilár naplněných gelem (kapilární gelová elektroforéza, CGE) nebo chromatografickou stacionární fází (kapilární elektrochromatografie, CEC). Afinitní elektroforéza v kapiláře se nazývá afinitní kapilární elektroforéza (ACE) a je využívána jak pro analytické účely, tak ke studiu molekulárních interakcí (viz přehledy⁷⁻¹⁸).

2. Principy afinitní elektroforézy

Dvě molekuly A a B, které mají různou elektroforetickou pohyblivost (μ_A , μ_B), vytvářejí komplex AB, jehož pohyblivost μ_{AB} se liší od pohyblivostí molekul A a B (v důsledku různého poměru náboje k hmotnosti),



kde k_{on} je rychlostní konstanta pro tvorbu komplexu a k_{off} je rychlostní konstanta pro jeho disociaci.

Existují v podstatě dva způsoby provádění ACE (cit.⁹):

1. Obě složky A i B, ligand i receptor, interagují v homogenním roztoku (CZE),
2. jedna ze složek je imobilizována na stěnách kapiláry, v gelu (CGE) či na chromatografickém nosiči (CEC).

Metodu CZE (ad 1) můžeme aplikovat dvěma různými způsoby v závislosti na rychlosti rozpadu vzniklého komplexu AB. Pokud je disociace komplexu AB pomalá vzhledem k době analýzy, můžeme v CZE přímo detegovat komplex. Analyzuje se vzorek, který obsahuje rovnovážnou směs receptoru a ligandu (analýza rovnovážných směsí). Pokud je disociace komplexu AB rychlá, komplex nelze detegovat. Komplexotvorné reakce však ovlivňují elektroforetické pohyblivosti interagujících složek (analýza založená na změně elektroforetických pohyblivostí).

Pohyblivost komplexu leží obvykle mezi pohyblivostmi složek A a B. Pokud je však jedna ze složek nerozpustná nebo imobilizovaná, pak pohyblivost komplexu je nulová. V případě interakcí proteinů s ligandy je změna náboje ligandu hlavním zdrojem změny pohyblivosti komplexu, protože změna molekulové hmotnosti je zanedbatelná.

Techniky prováděné v homogenním roztoku jsou nejrozšířenější, protože jsou aplikovatelné na široký rozsah analytů i separačních podmínek. Jsou použitelné za předpokladu, že tvorbou komplexu dojde k měřitelné změně pohyblivosti migrujících částic. V tomto případě lze určit vazebné konstanty vznikajících komplexů buď z měření posunů migračních časů nebo na základě zjištění koncentrací složek komplexu. Pokud separace volných složek od komplexu není dostatečná (separační faktor $R > 1$), nelze tuto techniku použít.

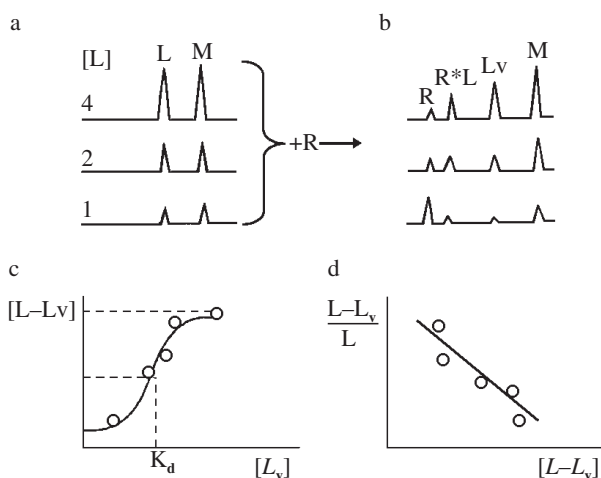
Techniky využívající imobilizovaných ligandů mají výhody i nevýhody⁹: Výhodou je, že interakce probíhají s maximální účinností. To však přináší i nevýhodu v tom, že

koncentrace aktivních molekul po imobilizaci je velmi nízká a tedy obtížně stanovitelná. Dále může dojít k pozměnění procesu rozpoznávání v důsledku imobilizace. Může být také obtížné regenerovat povrch s imobilizovaným ligandem, aniž by došlo ke snížení aktivity a koncentrace imobilizovaného materiálu.

3. Analýza rovnovážných směsí

Analýza rovnovážných směsí je vhodná pro systémy s pomalou kinetikou, což je většina systémů s vysokou afinitou. Oddělení komplexu od rovnovážné směsi a jeho detekce je nejprůběžnějším důkazem molekulárních interakcí mezi složkami. Koncentrace komplexu během analýzy klesá v důsledku disociace; proto jsou výhodné krátké doby analýzy, kterých se v CE běžně dosahuje. V tomto případě je CE pouze prostředkem, jak separovat a kvantifikovat volné a vázané molekuly.

Ligand a receptor, přítomné ve vzorku v různých poměrech, jsou po ekvilibraci separovány v CE systému a píky odpovídající volnému a vázanému ligandu vyhodnoceny. Třebaže koncentrace komplexu během CE analýzy klesá, koncentrace původních složek A a B se během analýzy nemění, protože jsou od komplexu separovány, nemohou se tudíž zúčastnit opětovné tvorby komplexu a reprezentují rovnovážné koncentrace. Rovnovážné konstanty a stechiometrie vazebné interakce se určí ze závislosti koncentrace vázaného ligandu $[L - L_v]$ na koncentraci volného ligandu $[L_v]$ či na celkové koncentraci ligandu $[L]$ nebo z poměru koncentrací vázaného



Obr. 1. Princip stanovení vazebných konstant na základě CE analýzy rovnovážných směsí (podle práce⁹); a – generace dat pro kalibrační křivku (závislost plochy píků na koncentraci ligandu L ; M – značkováč (marker), b – CE analýza rovnovážné směsi různých koncentrací ligandu $[L]$ s fixní koncentrací receptoru R ; vzorky byly ekvilibrovány před CE analýzou (R – receptor, $R \cdot L$ – komplex, L_v – volný ligand, c – vyhodnocení dat – přímé vazebné křivky, z koncentrace $[L_v]$ se určí koncentrace vázaného ligandu, $[L - L_v]$, a ze závislosti této koncentrace na koncentraci L_v se určí K_D jako L_v v polovině saturace, d – Scatchardova závislost poměru koncentrací vázaného ligandu k volnému ligandu na koncentraci volného ligandu. Směrnice této závislosti je $1/K_D$

a volného ligandu $[L - L_v/L_v]$ jako funkce koncentrace vázaného ligandu $L - L_v$ (obr. 1)⁹. Podobný postup se používá i v jiných měřeních, např. ve vylučovací chromatografii, ale výhodou ACE metody je, že receptor nemusí být čistý a dále že ligand a receptor nemusí mít rozdílnou velikost. Dobu potřebnou pro ustálení rovnováhy lze snadno zjistit z opakovaných analýz, což umožňuje malá spotřeba vzorku. Sycením jedné složky druhou složkou (titrantem) se zjistí stechiometrie komplexu. Nasycení se pozná buď tím, že pík komplexu dosáhne maximální konstantní hodnoty, nebo se objeví pík titrantu. Pokud má molekula více vazebných míst, jako např. protilátky, pak se postupně nasycení jednotlivých míst projeví serií píků příslušných komplexů a tím získáme další cennou informaci o stechiometrii jednotlivých vazeb^{19,20}.

Tuto metodu lze použít jen tehdy, když disociace komplexu je v průběhu CE analýzy zanedbatelná²¹. Je-li povolena 10 % disociace komplexu během CE analýzy, pak rychlostní konstanta k_{off} musí být menší než $0,105 t$, kde t je doba potřebná k separaci komplexu od receptoru²². Tuto techniku však lze využít i pro slabé interakce, pokud se použije frontální nebo vakantní technika^{14,23-27}. Technika vakantní afinitní chromatografie spočívá v naplnění kapiláry směsí pufru, ligandu i receptoru (koncentrace jedné složky, např. ligandu, je fixní, zatímco koncentrace druhé složky, receptoru, se mění). Poté se nadávkuje malý objem pufru a vloží se napětí. Vyhodnocují se plochy negativních (vakantních) píků, které odpovídají jednak volnému ligandu, jednak jeho komplexu s receptorem. K určení vazebných konstant lze též využít posunu migračních časů vakantních píků. Při frontální technice se kapilára naplní pufrům a pak se nadávkuje velký objem vzorku, který obsahuje ligand a receptor v rovnováze. Za předpokladu, že mobilita ligandu a komplexu je přibližně stejná, ale liší se od mobility receptoru, kterým je např. léčivo, migruje volný receptor v důsledku odlišné mobility ze zóny vzorku a jeho koncentrace se určí z výšky zóny.

Další omezení použitelnosti této techniky představuje poměrně nízká citlivost UV fotometrické detekce, daná krátkou dráhou paprsku. Pro silně interagující složky je koncentrace volného ligandu velmi nízká a tedy obtížně stanovitelná. Tento problém se většinou řeší použitím fluorescenční detekce buzené laserem²⁸⁻³⁶ (LIF).

Základním požadavkem je dostatečná separace ligandu od komplexu. Pokud se pohyblivost komplexu liší jen velmi málo od pohyblivosti jedné ze složek, lze komplex detegovat na základě vymizení píku jedné ze složek při saturaci a jeho opětovném objevení po nasycení všech vazebných míst³⁷⁻⁴⁰. Další možností je označit jednu ze složek fluoroforem a detegovat technikou LIF (cit.³¹).

4. Analýza založená na změně mobilit

Nízkoafinitní (nestabilní) komplexy s krátkým poločasem je možné charakterizovat pomocí CE na základě změny pohyblivosti jedné ze složek v důsledku multiasociačních a disociačních reakcí v roztoku. Při tomto postupu je receptor přítomen ve vzorku a ligand v nosném elektrolytu. Jedná se o období klasické afinitní chromatografie, avšak v ACE je snazší kontrolovat koncentraci ligandu. Podmínka pro použití této metody je, aby kinetika tvorby komplexů byla rychlá ve srovnání s dobou analýzy. Převrácená hodnota rychlostní kon-

stanty disociace komplexu, $1/k_{\text{off}}$ musí být mnohem nižší než migrační doba receptoru a poločas rozpadu komplexu, vyjádřený jako $\ln 2/k_{\text{off}}$ musí být menší než 1 % migračního času^{3,41}. Pokud jsou tyto podmínky splněny, můžeme tuto techniku považovat za rovnovážnou. Pokud však je stabilita komplexu vysoká, pak počet následných rovnováh mezi receptorem a ligandem ustavených v kapiláře během analýzy je nízký a pík dávkované složky je široký a rozmytý¹⁸. Rychlostní konstanty vazebných reakcí mohou být určeny analýzou elučních profilů pík^{42,43}.

Provádíme-li elektroforézu složky A v roztoku B, pak elektroforetická pohyblivost složky A se v okamžicích disociace a asociace diskontinuálně mění mezi hodnotami μ_A a μ_{AB} a pozorovaná pohyblivost μ složky A je pak váženým průměrem časových intervalů, po něž se pohybuje jako volná molekula a jako komplex AB. Pokud α_{AB} je doba, po kterou existuje komplex AB, pak je pohyblivost μ dána vztahem^{7,9}

$$\mu = (1 - \alpha_{AB}) \mu_A + \alpha_{AB} \mu_{AB} \quad (2)$$

Tuto rovnici můžeme přepsat ve formě

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\text{max}} \alpha_{AB} \quad (3)$$

kde $\Delta\mu = \mu - \mu_A$ je pozorovaná změna pohyblivosti složky A v přítomnosti B a $\Delta\mu_{\text{max}} = \mu_{AB} - \mu_A$ je maximální změna pohyblivosti A v přítomnosti B při nekonečném zředění neboli rozdíl pohyblivostí volné složky A a komplexu AB. Protože α_{AB} můžeme vyjádřit jako molární zlomek,

$$\alpha_{AB} = [AB] / ([A] + [AB]) \quad (4)$$

který souvisí s rovnovážnou konstantou K_d

$$K_d = [A][B] / [AB] \quad (5)$$

vztahem

$$\mu_{AB} = [B] / (K_d + [B]) \quad (6)$$

Ize pro změnu pohyblivosti $\Delta\mu$ odvodit rovnici (7),

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\text{max}} [B] / (K_d + [B]) \quad (7)$$

Veličiny $\Delta\mu_{\text{max}}$ a K_d lze určit nelineární regresní analýzou změřených hodnot $\Delta\mu$ při různé koncentraci B. Na základě analogie s rovnicí Michaelise a Mentenové pro kinetiku enzymů lze použít řadu linearizovaných závislostí, např. $\Delta\mu = F(\Delta\mu / [B])$, podle rovnice (8)

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\text{max}} - K_d (\Delta\mu / [B]) \quad (8)$$

Změna pohyblivosti se zjistí z experimentálních proměnných

$$\Delta\mu = L_D/E \{ (1/t_m - 1/t_0) - (1/t'_m - 1/t'_0) \} = (L_D/E) \cdot \Delta(1/t_m) \quad (9)$$

takže dostaneme

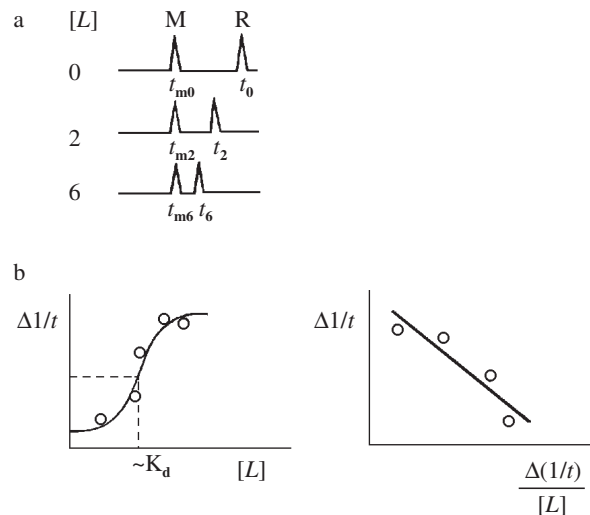
$$\Delta(1/t_m) = \Delta(1/t_m)_{\text{max}} - K_D \Delta(1/t_m)/[B] \quad (10)$$

kde t_m a t_0 jsou migrační časy složky A a značkovače (markeru) elektroosmotického toku (EOF) za nepřítomnosti složky B v nosném elektrolytu a t'_m a t'_0 jsou tyto časy za přítomnosti složky B, L_D je délka kapiláry k detektoru, E je intenzita elektrického pole.

Rovnovážné konstanty se experimentálně stanoví takto: Kapilára se naplní pufr, který obsahuje jednu ze složek, např. ligand (A). Stejný pufr, avšak bez ligandu, se použije v elektrodových nádobkách. Dávkuje se roztok druhé složky, receptoru (B), a měří se jeho mobilita při různé koncentraci ligandu. Rovnovážná konstanta se určí na základě rovnice (7–10) (viz⁹ a obr. 2). Pokud má ligand menší pohyblivost než receptor, musí být obsažen v pufru u anody. Rozhodnutí, která složka bude přítomna ve vzorku a která v pufru, závisí na dostupnosti interagujících látek a relativní snadnosti pozorování změn pohyblivosti. Rozpusťme-li v základním elektrolytu vysokomolekulární složku, pak zaznamenáme největší změnu pohyblivosti u nízkomolekulární složky. Proto studují-li se interakce proteinů s léčivými, pak je třeba rozpustit protein v základním elektrolytu⁴¹. Jsou-li interakce receptoru s ligandem slabé, je vhodné snížit pohyblivost ligandu např. tím, že ho kovalentně navážeme na gel, který vytvoříme v kapiláře⁴⁴.

Studované koncentrace se volí tak, aby jejich numerické hodnoty byly srovnatelné s hodnotou disociační konstanty a koncentrační rozsah byl dostatečně široký pro přesné stanovení. V případě proteinů jako receptorů postačuje rozsah koncentrací 0,1 až 0,5 mg·ml⁻¹ pro UV detekci při 214 nm (cit.⁷). Dávkovaný objem receptoru je řádově v nl a tím i množství spotřebovaného ligandu je zanedbatelné. Ustavení rovnováhy po nadávkování je rychlé, pokud je koncentrace ligandu vysoká ve srovnání s koncentrací receptoru.

Metodu lze použít za těchto podmínek: reakce musí být dostatečně rychlá, vazebná stechiometrie 1:1 a koncentrace receptoru musí být mnohem nižší než koncentrace ligandu



Obr. 2. Princip stanovení vazebných konstant na základě měření změn pohyblivosti (upraveno podle práce⁹); a – CE analýza receptoru v elektrolytu, který obsahuje různé koncentrace ligandu (M – značkovač, t_{m0} , t_{m2} , t_{m6} jsou migrační časy značkovače M a t_0 , t_2 , t_6 jsou migrační časy receptoru R při různé koncentraci ligandu [L], b – vyhodnocení dat na základě rov. (10)

(méně než $0,1 \times K_D^{45}$), avšak jeho absolutní koncentrace nemusí být známa (stanovení nízkých koncentrací, např. proteinů, je obtížný úkol). Dále se předpokládá, že vazebná místa jsou homogenní a rovnoměrně distribuována, že nedochází k interakci s vnitřními stěnami kapiláry a vložené napětí neovlivňuje tvorbu komplexu.

Metoda stanovení rovnovážných konstant založená na měření změn pohyblivosti má výhodu v tom, že vzorek nemusí být čistý, což je zvláště významné, je-li ligand nestálý a tvoří neaktivní produkty. Lze tak stanovit současně afinitní konstanty isoenzymů. Přesnost stanovení změn mobility závisí na stabilitě komplexu vzhledem k době separace. Lze postihnout i změny v mobilitě proteinů, které se liší o jediný elementární náboj.

5. Požadavky na systém pro afinitní kapilární elektroforézu

Vzhledem k tomu, že molekulární interakce závisí na teplotě, je nutné v ACE termostatovat separační kapiláry a při kvantitativní práci (stanovení rovnovážných konstant) používat kapiláry dostatečně dlouhé, aby délka části, která není termostatována, byla zanedbatelná vůči celkové délce kapiláry.

Vliv elektrického pole na molekulární interakce je zanedbatelný, jak bylo potvrzeno např. v pracích^{18,46}.

Významný je vliv adsorpce. Stěny kapiláry, které jsou negativně nabitě při pH vyšším než ca 2, obsahují aktivní místa pro adsorpci pozitivně nabitých molekul, např. některých proteinů. Adsorpci lze omezit prací při extrémních hodnotách pH (cit.⁴⁷⁻⁵¹), avšak tyto podmínky nevyhovují pro ACE. Pro tyto účely je nejvhodnější modifikace vnitřních stěn kapiláry např. silanizací nebo filmem vhodného polymeru^{53,54}. Pro separaci pozitivně nabitých proteinů byly doporučeny kationogenní polymerní filmy⁵⁵.

Vnitřní objem kapiláry a dávkované množství vzorku jsou zhruba tisíckrát nižší v CE než v HPLC nebo při elektroforéze v gelové vrstvě. Meze detekce při UV fotometrickém měření se pohybují pro proteiny kolem absolutního množství 0,1 až 1 ng, což pro CE aplikace představuje koncentraci 0,1 až 1 mg.ml⁻¹. Citlivost detekce lze zvýšit použitím fluorescenčního detektoru s laserovou excitací²⁸⁻³⁶ (LIF), při níž se jedna z interagujících složek označí fluoroforem. Meze detekce jsou zhruba o 3 řády nižší než při UV spektrofotometrické detekci.

Koncentrace nosných elektrolytů používaná v CE je obecně výrazně nižší než koncentrace solí ve fyziologickém roztoku. Vyšší koncentrace nosného elektrolytu je tolerována při nižším separačním napětí. Doporučené pufr⁷ pro ACE jsou např. 0,1 M tricin, 0,2 M glycin, 50 mM taurin nebo 0,5 M trimethylamoniumpropylsulfonát.

6. Imunitní stanovení založená na kapilární elektroforéze

ACE je alternativní metodou k existujícím imunitním stanovením. Její výhody spočívají v možnosti oddělit volné protilátky od komplexu i látek přítomných ve vzorku, v možnosti současně stanovit více látek, např. drogy i jejich metabolity, v kratší době analýzy ve srovnání s imunitními

testy na pevné fázi a snížené ceně analýzy dané malými objemy dávkovaných vzorků (ca nl). Citlivá LIF detekce je umožněna označením antigenu, buď fluoroforem nebo enzymaticky, např. alkalickou fosfatou ve spojení s fluorogenním substrátem (fluoresceindifosfátem). V některých případech však takto zvýšená citlivost nepostačuje, např. při stanovení estradiolu a hCG proteinu, kde je vyžadováno určení koncentrací nižších než 10⁻¹² M (cit.¹⁷). Nevýhodou ACE je možnost sorpce analytů na stěny kapiláry a nižší produktivita (max 20 vzorků/hodinu). Kompetitivní imunitní stanovení jsou běžnější než přímá stanovení.

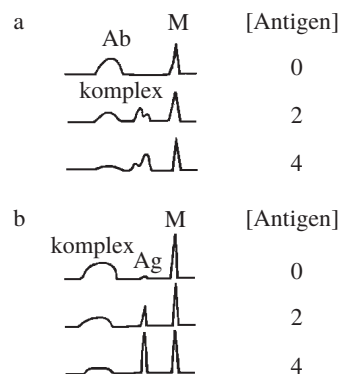
6.1. Nekompetitivní (přímé) imunitní stanovení

Nekompetitivní stanovení spočívá v přidání velkého přebytku protilátky nebo jejího fragmentu, Ab*, označených fluoroforem nebo enzymaticky, ke vzorku, aby bylo zajištěno, že veškerý antigen, Ag, přítomný ve vzorku, interaguje s protilátkou, část Ab* zůstává volná¹⁷:



Po proběhlé interakci (inkubaci) se část vzorku nadávkuje do CE kapiláry, separuje se komplex [AbAg]* od nadbytku Ab* a detegují se obě složky pomocí LIF (viz⁹ obr. 3a). Při vazbě značených protilátek na antigen dochází k významné změně jejich elektroforetické pohyblivosti.

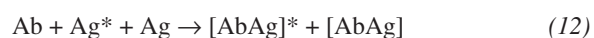
Příklady využití ACE k přímému imunitnímu stanovení jsou v literatuře zatím ojedinělé a není prokázána její výhodnost ve srovnání s běžným uspořádáním. Hlavní problém těchto stanovení je heterogenita značených protilátek nebo jejich fragmentů, která má za následek řadu píků v elektroferogramu. Příprava a čištění fragmentů z monoklonálních protilátek nejsou snadné, avšak aplikace genového inženýrství může tento problém vyřešit a rozšířit použitelnost této metody.



Obr. 3. Princip přímého a kompetitivního imunitního stanovení pomocí CE s LIF (adaptováno z práce⁹); a – přímé stanovení, protilátka značená fluoroforem, Ab a fluoreskující značkovací M, jsou přidány k roztoku, který obsahuje neznačený antigen Ag ve zvyšující se koncentraci. Dva píky komplexu jsou důsledkem mono- a divalentní protilátky; b – nepřímé (kompetitivní) stanovení, antigen značený fluoroforem je smíchán s rostoucím množstvím protilátky Ab, která vytěsňuje FITC-Ag z komplexu Ag-FITC-Ag. Měří se plocha píky značeného Ag, která je úměrná množství neznačeného Ag

6.2. Kompetitivní (nepřímé) imunitní stanovení

Při této metodě se vzorek, který obsahuje neznačený antigen Ag v přítomnosti matrice, inkubuje s protilátkou (antisérem) Ab a značeným antigenem Ag* (nebo jeho fragmentem)¹⁷,



Během inkubace soutěží Ag* s Ag přítomným ve vzorku o omezený počet vazebných míst protilátky Ab. Po ustavení rovnováhy se dává ke směsi do CE systému s LIF detekcí, kde se oddělí volný Ag* od komplexu [AbAg]*. Výška nebo plocha píku volného Ag* a [AbAg]* nebo jejich poměr jsou úměrné obsahu antigenu v původním vzorku (viz⁹ obr. 3b). Kalibrační křivky jsou nelineární; ke stanovení se používá pouze lineární úsek. Důležité je správně zvolit koncentrace [Ag*] + [Ag], aby ležely v lineární části kalibrační křivky.

Kompetitivnímu imunitnímu stanovení se dává přednost před přímým stanovením tehdy, když je obtížné separovat volnou protilátku od komplexu (nelze tudíž použít přímé stanovení). Tento případ nastává u nízkomolekulárních protilátek, např. peptidů, které významně neovlivňují pohyblivost komplexu [AbAg]*.

Hlavní výhody CE při kompetitivním imunitním stanovení jsou vysoká citlivost⁵⁰ (mez detekce 0,1 nM), malé množství vzorku potřebné k analýze (méně než amol), možnost analyzovat několik analytů současně⁵¹ a vysoká přesnost stanovení. Vzhledem k tomu, že postačí stanovit pouze značený antigen, lze zjednodušit CE separaci a zkrátit dobu analýzy^{52,56} až na 0,5 až 1 min. Rovněž není nutné používat elektroforeticky čisté protilátky; polyklonální protilátky byly použity v řadě případů^{51,53,54,56,57}. Miniaturizace CE systému s umístěním celého přístroje na mikročip je zřejmě jedním z trendů budoucnosti⁵⁶.

7. Příklady použití ACE

Do ACE jsou v současné době zahrnovány všechny separace, při nichž se využívá selektivních interakcí. V tomto širokém pojetí sem patří všechny selektivní interakce s aditivou, přítomnými v elektrolytu, tedy i chirální separace, které však nejsou zahrnuty v tomto přehledném článku. Informace o separaci enantiomerů lze nalézt např. v práci¹¹.

ACE se především využívá ke stanovení vazebných konstant (viz např.^{46,58-61}). Nejvíce se studují léčiva^{11,14,62-66} a jejich interakce s proteiny nebo glykoproteiny. Významná část aplikací se týká peptidů^{59,67-69} a studia interakcí s lektiny⁷⁰. Vybrané příklady studovaných interakcí jsou uvedeny v tab. I.

8. Závěr

ACE je vhodnou komplementární separační metodou k afinitní HPLC a lze předpokládat, že ji bude v řadě případů postupně nahrazovat pro svou vysokou separační účinnost, rychlost analýzy, nízké nároky na množství vzorku a tím i podstatně nižší náklady na analýzu. Lze proto očekávat další

Tabulka I
Molekulové interakce studované v ACE

Protein, peptid ^a	Ligand	Citace
<i>Proteiny jako selektory</i>		
BSA	Warfarin	24
BSA	Ibuprofen, Flurbiprofen, Ketoprofen	80
BSA	tryptofan	44
BSA	Leucovorin	72,84
BSA	izomery porfyriu	93
BSA	DNP – deriváty aminokyselin	85
HSA	tryptofan	87
HSA	Oxazepam, temazepam	89
HSA	Warfarin	24
AGP	DNP – deriváty aminokyselin	85
AGP	Clorprenalin	90
Avidin	Warfarin, Flurbiprofen, Ibuprofen, Ketoprofen, Leucovorin	92
Kasein	DNP – deriváty aminokyselin	85
Celobiohydrolasa	Metprolol, Alprenol, Atenolol	94
Konalbumin	Trimetochinol	90
Ovomukoid	Chlorpheniramin, Tolperison, Pindolol, Arotinolol	90
<i>Lektiny</i>		
<i>Lens culinaris</i> , <i>Ricinus communis</i> aggl. <i>Glycine soja</i>	disacharidy	70
Concanavalin A	monosacharidy	76
<i>Ricinus communis</i> aggl., <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Glycine soja</i>	laktobionová kyselina	96
<i>Lotus tetragonolobus</i>	L-fukoso-1-fosfát	75
<i>Pisum sativum</i>	neutrální sacharidy	74
<i>Proteiny vázající heparin</i>		
Fibronektin	heparin	12
Heparin vázající proteiny růstového faktoru fibroplastů	heparin, heparan sulfát	68
Fragmenty serového proteinu amyloid P	heparin	77
Laktoferrin	heparin	78
Antithrombin III, leukocytární proteinasová inhibitor	heparin	102
<i>Protilátka – antigen</i>		
Ab 4B10	Hapten H6A	27
mAb-antifosfoserin	fosfitin	33
Ab-anti-beta-endorfin	tryptické štěpy beta-endorfinu	101
mAb-antifosfotyrosin	fosfotyrosin	18
mAb-antiHSA	HSA	20
Fragmenty mAb-anticyklosporin	Cyklosporin	95
mAb-antiDNP	ligandy obsahující 2,4-dinitrofenylové substituenty	103

Tabulka I – pokračování

Protein, peptid ^a	Ligand	Citace
<i>Proteiny vázající biotin</i>		
Actinavidin	biotin	86, 104
Streptavidin	biotin	20
<i>Protein – specifický ligand</i>		
IgG	protein G	31
IgG	protein A	105
C-reaktivní protein	fosforylcholin	82, 91
Trypsin	inhibitory trypsinu	37
Chymotrypsin	a chymotrypsinu	
Vancomycin	D-Ala-D-Ala-peptidy	13,46,71, 73,88, 106-108
Karbonhydrasa	arylsulfonamidy	13,46,79, 81,106
<i>Proteiny vázající Ca²⁺</i>		
Calmoduli, Parvalbumin, karboanhydrasa	Ca ²⁺	83

^aAb – protilátka, mAb – monoklonální protilátka, BSA – hovězí serový albumin, HSA – lidský serový albumin, AGP – kyselý α_1 -glykoprotein

rozvoj kapilárních elektromigračních metod, zejména jejich spojení on-line s hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí při určování struktury biologicky aktivních látek. Lze očekávat další vývoj nových separačních medií zvyšujících účinnost a selektivitu separací, zdokonalování detekčních metod a další miniaturizaci. Miniaturizace, které se dosahuje v CE, je velmi vhodná pro studium interakcí ve velmi malých objemech, které se blíží objemu buněk. Elektroforéza na čipu je slibnou alternativou pro miniaturizaci CE (cit.^{56,97}). Nově používaná separační média v ACE jsou vtištěné polymery (imprinting polymers), které dovolují přípravu materiálu požadované afinity⁹⁸. Další zvýšení citlivosti fluorescenční detekce bude možné dosáhnout laserovými diodami, které jsou menší a často účinnější než ostatní lasery⁹⁹. Hmotnostní spektrometrie jako detekční metoda bude mít nezastupitelné místo v ACE^{100,101}.

ACE metoda diskutovaná v tomto článku je použitelná pro určení disociačních konstant relativně stabilních komplexů nebo naopak komplexů vznikajících na základě rychlé vazebné reakce pomocí metod diskutovaných výše, tj. analýzy rovnovážné směsi a analýzy založené na změně mobility. Metoda ACE je aplikovatelná pro reakce, jejichž disociační rychlostní konstanty jsou menší než 0,001 a větší než 0,1 s⁻¹ (cit.^{7,9}). Uvnitř tohoto rozsahu jsou stanovení problematická a vyžadují vývoj alternativních technik.

Hodnoty K_d určené ACE metodou jsou v dobré shodě s výsledky získanými jinými metodami. Relativní směrodatná odchylka pro 5 měření byla 10 % u přístrojů s manuálním řízením a 6 % s automatickou kontrolou^{74,76}. Právě rovnovážné konstanty jsou získány pouze tehdy, když jsou obě výše uvedené metody měření kombinovány, tj. receptor přítomný ve

vzorku je předem equilibrován s ligandem a poté jsou stanoveny rovnovážné konstanty na základě měření mobilit interagujících složek.

Autoři děkují Fondu rozvoje vysokých škol za poskytnutí grantu č. 1707/99.

LITERATURA

1. Takeo K: *Electrophoresis* 5, 187 (1984).
2. Takeo K.: *J. Chromatogr. A* 698, 89 (1995).
3. Hořejší V., Tichá M.: *J. Chromatogr.* 376, 49 (1986).
4. Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1992.
5. Foret F., Křivánková L., Boček P.: *Capillary Zone Electrophoresis*. VCH, Weinheim 1993.
6. Camilleri P. (Ed.): *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*. CRC Press, Boca Raton 1998.
7. Shimura K., Kasai K.: *Anal. Biochem.* 251, 1 (1997).
8. Rippel G., Corstjens H., Billiet H. A. H., Frank J.: *Electrophoresis* 18, 2175 (1997).
9. Heegaard N. H. H., Nilsson S., Guzman N. A.: *J. Chromatogr. B* 715, 29 (1998).
10. Lloyd D. K., Aubry A.-F., De Lorenzi E.: *J. Chromatogr. A* 792, 349 (1997).
11. Rundlett K. L., Armstrong D. A.: *Electrophoresis* 18, 2194 (1997).
12. Liu J., Abid A., Hail M. E., Lee M. S., Hangeland L., Zein N.: *Analyst* 123, 1455 (1998).
13. Colton I. L., Carbeck J. D., Rao J., Whitesides G. M.: *Electrophoresis* 19, 367 (1998).
14. Bush M. H. A., Corels L. B., Boelens H. F. M., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 777, 311 (1997).
15. Takeo K.: *J. Chromatogr. A* 698, 89 (1997).
16. Nakamura K., Takeo K.: *J. Chromatogr.* 715, 125 (1998).
17. Schmalzing D., Nashaben W.: *Electrophoresis* 18, 2184 (1997).
18. Heegaard N. H. H.: *J. Chromatogr. A* 680, 405 (1994).
19. Nielsen R. G., Rickard E. C., Santa P. F., Sharknas D. A., Sittampalam G. S.: *J. Chromatogr.* 539 177 (1991).
20. Chu Y.-H., Lees W. J., Stassinopoulos A., Walsh C. T.: *Biochemistry* 33, 10616 (1994).
21. Fried M. G.: *Electrophoresis* 10, 366 (1989).
22. Hulme E. C., Birdsall N. J. M., v knize: *Receptor-ligand Interactions* (Hulme E. C., ed.), str. 63. Oxford University Press, Oxford 1993.
23. Erim F. B., Kraak J. C.: *J. Chromatogr. B* 710, 205 (1998).
24. Bush M. H. A., Boelens H. F. M., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 775, 315 (1997).
25. Kraak J. C., Busch S., Poppe H.: *J. Chromatogr.* 608, 257 (1992).
26. Shibukawa A., Yoshimoto Y., Ohara T., Nakagawa T.: *J. Pharm. Sci.* 83, 616 (1994).
27. Busch M. H. A., Boelens H. F. M., Kraak J. C., Poppe H., Meekel A. A. P., Resmini M.: *J. Chromatogr.* 774, 195 (1996).
28. Chen J. W., Cohen A. S., Karger B. L.: *J. Chromatogr.* 559, 295 (1991).
29. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S. M., Driver D. A., Berg R. H., Kim S. K., Norden B., Nielsen P. E.: *Nature* 365, 566 (1993).

30. Chen D. Y., Adelhelm K., Cheng X. L., Dovici N. J.: *Analyst* 119, 349 (1994).
31. Reif O.-W., Lausch R., Scheber T., Freitag R.: *Anal. Chem.* 66, 4027 (1994).
32. Xian J., Harrington M. G., Davison E. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 86 (1996).
33. Lin S., Hsiao I. Y., Hsu S. M.: *Anal. Biochem.* 254, 9 (1997).
34. Chen E.-T. A., Sternberg J. C.: *Electrophoresis* 15, 13 (1994).
35. Gasmann E., Kuo J. E., Zare R. N.: *Science* 230, 813 (1985).
36. Gordon M. J., Huang X., Pentoney S. L., Zare R. N.: *Science* 242, 224 (1988).
37. Arentoft A. M., Frokiaer H., Michaelsen S., Sorensen H., Sorensen S.: *J. Chromatogr. A* 652, 189 (1993).
38. Heegaard N. H. H., Robey F. A.: *Anal. Chem.* 64, 2479 (1992).
39. Heegaard N. H. H., Robey F. A.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 1923 (1993).
40. Thomas C. V., Cater A. C., Wheeler J. J.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 1903 (1993).
41. Chu Y.-H., Avila L. Z., Gao J., Whitesides G. M.: *Acc. Chem. Res.* 28, 461 (1995).
42. Matoušek V., Hořejší J.: *J. Chromatogr.* 245, 271 (1982).
43. Avila L. Z., Chu Y.-H., Blossy E.-C., Whitesides G. M.: *J. Med. Chem.* 36, 126 (1993).
44. Birnbaum S., Nilsson S.: *Anal. Chem.* 64, 2872 (1992).
45. Lim W. A., Sauer R. T., Lander A. D.: *Methods Enzymol.* 208, 196 (1991).
46. Kawaoka J., Gomez F. A.: *J. Chromatogr. B* 715, 203 (1998).
47. Pacáková V., Štulík K., Hau P. T., Jelínek I., Vinš I., Sýkora D.: *J. Chromatogr.* 700, 187 (1995).
48. Pacáková V., Pechancová J., Štulík K.: *J. Chromatogr. B* 681, 47 (1996).
49. Pacáková V., Pechancová J., Štulík K.: *J. High Resol. Chromatogr.* 18, 582 (1995).
50. Chen F.-T. A., Pentoney S. L., Jr.: *J. Chromatogr. A* 680, 425 (1994).
51. Chen F.-T. A., Evengelista R. A.: *Clin. Chem.* 40, 1891 (1994).
52. Schultz N. M., Huang L., Kennedy R. T.: *Anal. Chem.* 67, 924 (1995).
53. Schmalzing D., Nashabech W., Fuchs M.: *Clin. Chem.* 41, 1403 (1995).
54. Schmalzing D., Nashabech W., Yao X.-W., Mahtre R., Regnier F. E., Afeyan N. B., Fuchs M.: *Anal. Chem.* 67, 606 (1995).
55. Towns J. K., Regnier E. F.: *J. Chromatogr.* 516, 69 (1990).
56. Koutný L. B., Schmalzing D., Taylor T. A., Fuchs M.: *Anal. Chem.* 68, 18 (1996).
57. Steinmann L., Čáslavská J., Thorman W.: *Electrophoresis* 16, 1912 (1995).
58. Amini A., Westerlund D.: *Anal. Chem.* 70, 1430 (1998).
59. Dunayevskiy Y. M., Lyubbarskaya Y. V., Chu Y. H.: *J. Med. Chem.* 41, 1201 (1998).
60. Mammen M., Colton I. J., Carbeck J. D., Bradley R., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.* 69, 2165 (1997).
61. Bose S., Yang J., Hage D. S.: *J. Chromatogr. B* 697, 77 (1997).
62. Schwartz M. A., Raith K., Dongowski G., Neubert R. H. H.: *J. Chromatogr. A* 809, 219 (1998).
63. Dongowski G., Schnorrenberger B., Platzer B.: *Int. J. Pharm.* 158, 99 (1997).
64. Hage D. S., Tweed S. A.: *J. Chromatogr. B* 699, 499 (1997).
65. Schwarz M. A., Raith K., Ruttinger H. H., Dongowski G., Neubert R. H. H.: *J. Chromatogr. A* 781, 377 (1997).
66. Shibukawa A., Yoshimoto Y., Ohara T., Nakagawa T.: *J. Pharm. Sci.* 83, 616 (1994).
67. Heegaard N. H. H., Hansen B. E., Svejgaard A., Fugger L. H.: *J. Chromatogr. A* 781, 91 (1997).
68. VanderNoot V. A., Hileman R. E., Dordick J. S., Linhardt R. J.: *Electrophoresis* 19, 437 (1998).
69. Heegaard N. H. H.: *Electrophoresis* 19, 442 (1998).
70. Taga A., Yabusako Y., Kitano A., Honda S.: *Electrophoresis* 19, 2645 (1998).
71. Chu Y.-H., Whitesides G. M.: *J. Org. Chem.* 57, 3524 (1992).
72. Barker G. E., Rosso P., Hartwick R. A.: *Anal. Chem.* 64, 3024 (1992).
73. Godall D. M.: *Biochem. Soc. Trans.* 21, 125 (1993).
74. Shimura K., Kasai K.: *J. Biochem.* 120, 1146 (1996).
75. Khun R., Frei R., Christen M.: *Anal. Chem.* 218, 131 (1994).
76. Shimura K., Kasai K.: *Anal. Biochem.* 227, 186 (1995).
77. Heegaard N. H. H., Mortensen H. D., Roepstorff P.: *J. Chromatogr. A* 717, 83 (1995).
78. Heegaard N. H. H., Brimmes J.: *Electrophoresis* 17, 1916 (1996).
79. Bergenhem N.: *J. Chromatogr. B* 684, 289 (1996).
80. Sun P., Hoops A., Hartwick R. A.: *J. Chromatogr. B* 661, 335 (1994).
81. Gomez F. A., Avila L. Z., Chu Y.-H., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.* 66, 1785 (1994).
82. Heegaard N. H. H., Robey F. A.: *J. Immunol. Meth.* 166, 103 (1993).
83. Kajiwara H., Hirano H., Oono K.: *J. Biochem. Biophys. Meth.* 22, 263 (1991).
84. Sun P., Barker G., Hartwick R. A., Grinberg N., Kaliszan R.: *J. Chromatogr. A* 652, 247 (1994).
85. Wistuba D., Diebold H., Schurig V.: *J. Microcol. Sep.* 7, 17 (1995).
86. Okun V. M., Bilitewski U.: *Electrophoresis* 17, 1627 (1996).
87. Yung J., Hage D. S.: *Anal. Chem.* 66, 2719 (1994).
88. Liu J., Volk K. J., Lee M. S., Pucci M.: *Anal. Chem.* 66, 2412 (1994).
89. Lloyd D. K., Li S., Ryan P.: *J. Chromatogr. A* 694, 285 (1995).
90. Tanaka Y., Terabe S.: *Chromatographia* 44, 119, (1997).
91. Nadeau K., Nadler S. G., Saulnier M., Tepper M. A., Walsh C. T.: *Biochemistry* 33, 2561 (1994).
92. Tanaka Y., Matsubara N., Terabe S.: *Electrophoresis* 15, 848 (1994).
93. Barker G. E., Horvath W. J., Huie C. W., Hartwick R. A.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 2089 (1993).
94. Ljunberg H., Nilsson S.: *J. Liq. Chromatogr.* 18, 3685 (1995).
95. Phillips T. M., Chmielinska J. J.: *Biomed. Chromatogr.* 8, 242 (1994).

96. Honda S., Taga A., Suzuki S., Kakehi K.: *J. Chromatogr.* 597, 377 (1992).
97. Harrison D. J., Fluri K., Seiler K., Fan Z., Effenhauser C. S., Manz A.: *Science* 261, 895 (1993).
98. Nilsson K., Lindell J., Norrloew O., Sellergren B.: *J. Chromatogr. A* 680, 57 (1994).
99. Imasaka T., Ishibashi N.: *Anal. Chem.* 62, 363A (1990).
100. Cheng C. C., Chu Y. H.: *Am. Lab.* 30, 79 (1998).
101. Lyubarskaya Y. V., Dunayevskiy Y. M., Vouros P., Karger B. L.: *Anal. Chem.* 69, 3008 (1997).
102. Wu X., Linhardt R. J.: *Electrophoresis* 19, 2650 (1998).
103. Mammen M., Gomez F. A., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.* 67, 3526 (1995).
104. Okun V. M.: *Electrophoresis* 19, 427 (1998).
105. Lausch R., Reif O. W., Riechel P., Scheper T.: *Electrophoresis* 16, 636 (1995).
106. Gomez F. A., Mirkovich J. N., Dominguez V. M., Liu K. W., Macies D. M.: *J. Chromatogr. A* 727, 291 (1996).
107. LeToutneau D. L., Allen N. E.: *Anal. Biochem.* 246, 62 (1997).
108. Rao J., Whitesides G. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 10286 (1997).

V. Pacáková^a, K. Štulík^a, S. Hubená^a, and M. Tichá^b
(^a*Department of Analytical Chemistry, ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*):
Affinity Capillary Electrophoresis

Affinity capillary electrophoresis (ACE) is reviewed with emphasis on determination of the binding constants. The requirements for the CE system are discussed. CE-based immunoassays (both competitive and non-competitive) are summarized and examples of ACE are described.

INFORMACE

**pro zájemce o studium v doktorském studijním programu, obor lékařská chemie a biochemie,
na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci ve školním roce 2000/2001**

Předseda oborové rady pro obor lékařská chemie a biochemie informuje absolventy lékařských, farmaceutických a přírodovědeckých fakult o možnosti zahájení tříletého prezenčního studia v doktorském studijním programu v oboru:

lékařská chemie a biochemie

Náměty experimentální práce v rámci studia jsou orientovány do experimentální toxikologie, zahrnují studium účinků a metabolismu xenobiotik na buněčné úrovni a jejich interakcí se subcelulárními strukturami.

*Případní zájemci o studium kontaktujte
Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc.
Tel: 068 / 563 23 01, FAX: 068 / 563 29 66, e-mail: vilim@tunw.upol.cz*

MIKROBIÁLNA PRODUKCIA FAREBNÝCH AZAFILÓNOVÝCH METABOLITOV

MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ, DUŠAN SLUGEŇ,
KATARÍNA LEŠOVÁ a MICHAL ROSENBERG

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: sturdiko@chelin.chtf.stuba.sk

Došlo dňa 14.XII.1998

Kľúčové slová: huby, metabolity, pigmenty, azafilóny

Obsah

1. Úvod
2. Azafilóny
 - 2.1. Monaskové pigmenty
 - 2.2. Mitorubrín, mitorubrinol, kyselina mitorubrínová
 - 2.3. Falkonenzíny
 - 2.4. Chaetoviridíny
 - 2.5. Kyselina lunatová
 - 2.6. Wortmin
 - 2.7. Austdiol
 - 2.8. Rubrorotirín
 - 2.9. Luteusíny
 - 2.10. Izochromofilóny
3. Záver

1. Úvod

Fungálne sekundárne metabolity s pyráno-chinónovou štruktúrou sa nazývajú azafilóny. Pomenovanie získali podľa ich citlivej reakcie s amoniakom za vzniku γ -pyridónových derivátov. Metabolity v médiu ochotne reagujú s látkami, ktoré obsahujú amino skupiny ako sú proteíny, aminokyseliny a nukleové kyseliny za tvorby vo vode rozpustných farebných produktov. Najviac sa cení ich prírodný pôvod, žltá-červené spektrum a termostabilita.

Známych je viac než 20 farebných metabolitov. Boli identifikované z rôznych vláknitých húb, takže mikroorganizmy by mohli byť užitočným zdrojom novej skupiny potravinársky použiteľných pigmentov prírodného pôvodu. Spomedzi testovaných mikroorganizmov len rody *Monascus*, *Penicillium* a *Chaetomium* sú známe ako dobrí producenti pigmentov s azafilónovým skeletom. Niektoré štruktúry sa identifikovali tiež u *Aspergillus ustus*, *Cochliobolus lunata*, *Talaromyces sp.* a *Emericella falconensis*. Prírodný pôvod azafilónových pigmentov a ľahko uskutočniteľná derivatizácia spolu so zvýšenou termostabilitou v porovnaní s inými prírodnými farbivami červenej oblasti spektra otvárajú nové možnosti ich aplikácií v potravinárstve a kozmetike.

2. Azafilóny

Azafilóny, nie veľmi známe pomenovanie veľkej skupiny pyráno-chinónových štruktúr s vysokou tenziou akceptorov elektrónov podmieňujúcich citlivosť kyslíka v primárnom kruhu za tvorby stabilných γ -pyridónov (obr. 1), majú chromofórové vlastnosti v O i N-R³ forme. Farba azafilónových pigmentov závisí od štruktúr.

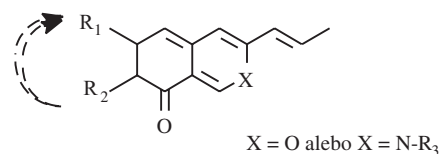
Pre väčšinu z nich sú absorpčné maximá v oblasti viditeľného spektra (400 nm pre žlté a asi 500 nm pre červené pigmenty). Vo všeobecnosti však platí, že žlté štruktúry sú viac hydrogenované než oranžové a červené, aminoformy majú zvyčajne maximá pri väčších vlnových dĺžkach absorpčného spektra.

Vláknité huby sú schopné za vhodných kultivačných podmienok syntetizovať pomerne širokú paletu azafilónov. Stručný prehľad štruktúr azafilónov izolovaných z mycélia a kultivačného média je na obr. 2.

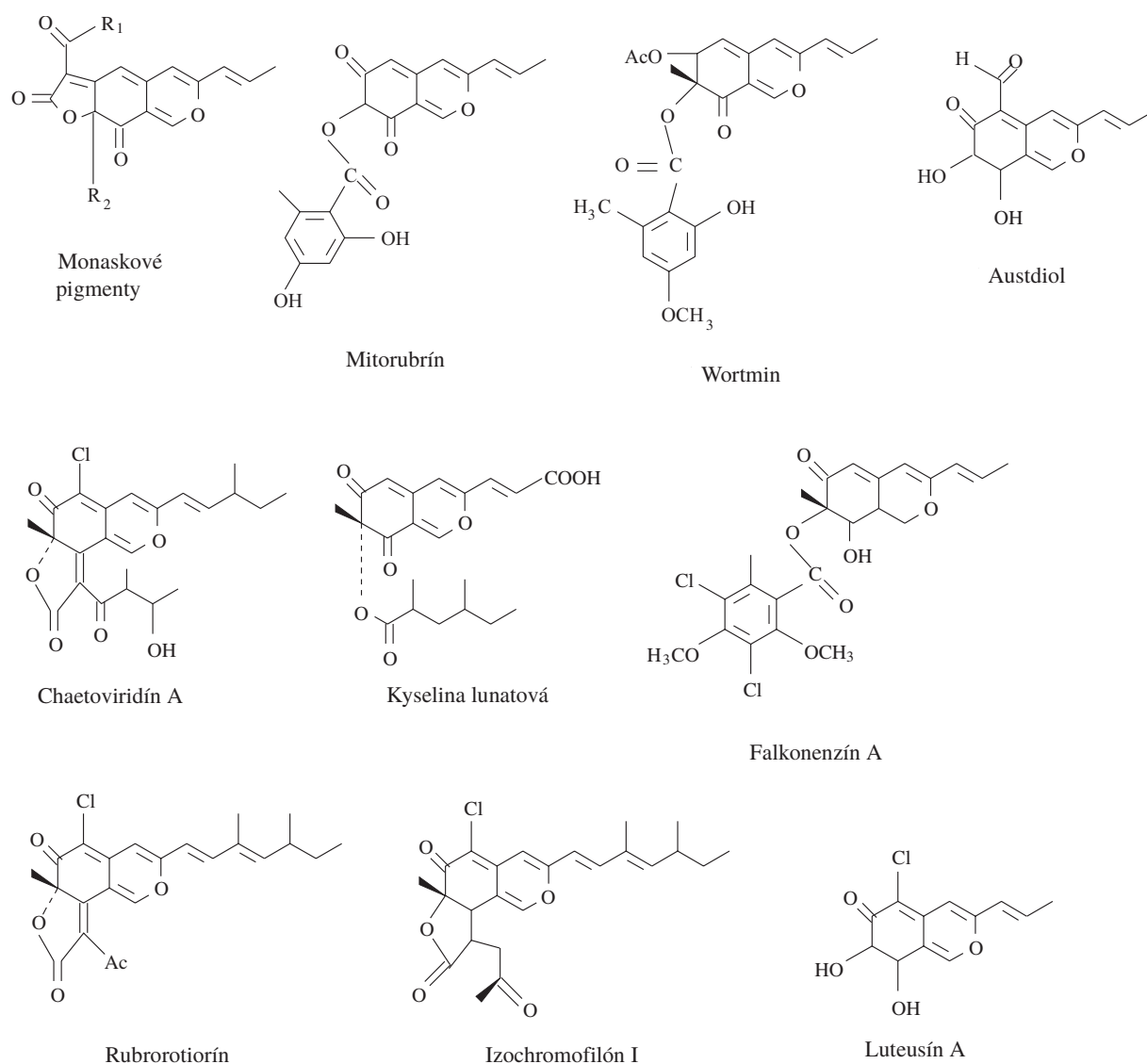
Niektoré z týchto fungálnych metabolitov sa používali ako farbivá aditíva do potravín a alkoholických kvasných nápojov v Ázii a Amerike. Záznamy o používaní monaskových pigmentov v potravinách a prírodnej medicíne sú od prehistorického obdobia. Je snaha nahradiť syntetické pigmenty v potravinách i v krajinách Európskej únie. Známe sú patenty zamerané na použitie monaskových pigmentov pre potraviny v Japonsku, USA, Francúzsku a Nemecku^{1,2}.

Rýchlo sa rozširuje ich aplikácia do potravín, ako prifarbovanie mäsových výrobkov (salámy a šunka), morských produktov (rybia pasta) a rajčinového kečupu¹. Farebné metabolity *Monascus* nie sú známe ako azafilóny, ale ako monaskové pigmenty alebo častejšie pod názvom červená ryža.

Problematike biologickej aktivity azafilónových metabolitov je doposiaľ venovaných málo prác. Poznatky o účinnosti monaskových pigmentov sú zhrnuté v práci Jůzlová a spol.³ a Martínková a spol.⁴ V prehľadnom článku o sekundárnych metabolitoch húb *Monascus*³ autori citujú pôvodné práce, podľa ktorých extrakty z červenej ryže neprejavili akútne toxické účinky na myši. Farebné zložky červenej ryže sú pravdepodobne komplexy pigmenty – aminokyseliny a nejavia toxické účinky. Oranžové monaskové pigmenty zo submerzných kultivácií sa vyznačovali rozmanitou biologickou aktivitou s pozitívnymi i menej žiaducimi účinkami. Azafilónový skelet je esenciálny pre niektoré biologické účinky a rozdiely v aktivite metabolitov sa môžu pripisovať ich odlišnej reaktivite s amínmi⁶. Výsledky testov toxikologických štúdií ďalších mikrobiálnych metabolitov s azafilónovou štruktúrou sa vo vedeckej literatúre nachádzajú len sporadicky. Napríklad o toxicite azafilónových metabolitov sa zmieňuje Buchi



Obr. 1. Štruktúra farebných azafilónov



Obr. 2. Hlavné skupiny azafilónových metabolitov

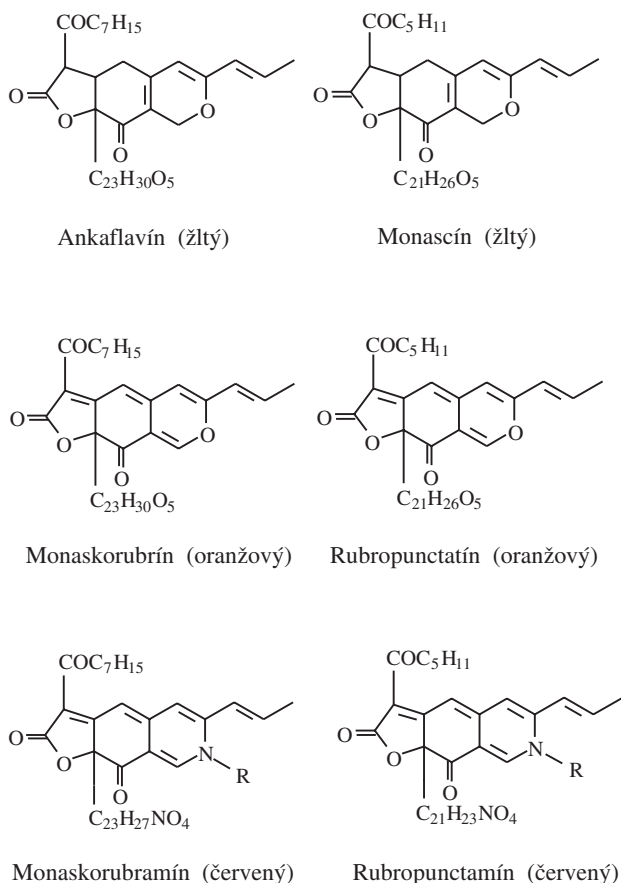
a spol.⁵, ktorí zistili, že spomedzi metabolitov produkovaných hubou *Penicillium rubrum*, azafilónové látky mitorubrín a mitorubrinol neprejavujú toxické účinky.

2.1. Monaskové pigmenty

Vláknité huby rodu *Monascus* sú zdrojom skupiny pigmentov produkovaných prevažne v mycéliu. Ide o žltý ankaflavín a monascín, oranžový monaskorubrín a rubropunktatín, červený monaskorubramín, rubropunktamín, či ich N-glutaryl alebo histidyl deriváty: N-glutarylmonaskorubramín, N-glutarylrubropunktamín (obr. 3)⁷⁻¹⁰. Najnovší stav poznania v oblasti monaskových pigmentov je popísaný v prácach^{3,11}.

Monascín po prvý raz izolovali ako produkt huby *Monascus purpureus* Went, mikroorganizmu zodpovedného za farebnosť červenej ryže⁸. Neskôr bol izolovaný tiež z *Monascus rubiginosus* Sato a *Monascus rubropunctatus*. Monascín a ru-

bropunktatín ako aj monascín a monaskorubrín sa vyskytujú spoločne ako metabolity rôznych húb. Rubropunktatín je metabolit *Monascus rubropunctatus*, monaskorubrín je metabolit *Monascus purpureus*. Ukázalo sa, že štruktúra monaskorubrínu sa líši od štruktúry rubropunktatínu len v dĺžke nasýteného postranného reťazca, rovnako ako aj ankaflavínu od monascínu a monaskorubramínu od rubropunktamínu. Neskôr sa viaceré produkčné kmene s rôznymi exotickými názvami reklasifikovali ako *Monascus purpureus* alebo *ruber*. Zo štruktúr metabolitov *Monascus* môžeme pozorovať, že sa tu vyskytuje lineárny typ spojenia α,β -ketolaktónového kruhu týchto látok s azafilónovým skeletom, pričom laktónový kruh žltých monaskových pigmentov je nasýtený a oranžových nenасыtený. Žlté pigmenty monascín, resp. ankaflavín sú tetrahydroderiváty oranžových pigmentov, rubropunktatínu, resp. monaskorubrínu. Zvýšená acidita metabolitov monascínu a ankaflavínu súvisí s terciárne naviazaným vodíkom na α -uhlík β -ketolak-

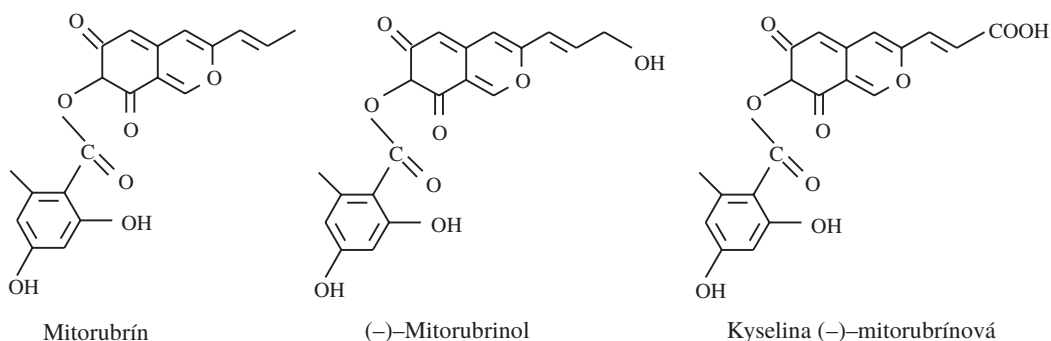


Obr. 3. Základné štruktúry monaskových pigmentov a ich sfarbenie

tónového systému. Chen a spol. uvádzajú vo svojej práci⁹ relatívnu stereochemiu azafilónov. Monascín a rubropunctatín sa vyznačujú rovnakou stereochemiou v pozícii C-7. Monascín, rubropunctatín a monaskorubrín patria do tej istej stereochemickej série (–)-sklerotiorínu.

Fungálne metabolity, monaskorubrín, monaskoflavín, monascín, rubropunctatín ako aj chaetoviridíny, sklerotiorín a rotiorín, tvoria biogénne príbuznú skupinu látok. Biosyntetické štúdie týchto sekundárnych metabolitov objasňujú polyketidový pôvod azafilónov¹⁰.

Aktuálnosť problematiky monaskových farbív potvrdilo



Obr. 4. Štruktúry mitorubrínových derivátov

špecializované sympóziu, ktoré sa konalo v júli 1998 o monaskových pigmentoch v Toulouse, Francúzsko. My sme prezentovali prípravu monaskových pigmentov na polosuchých prírodných substrátoch pomocou *Monascus purpureus* CCM8112 (cit.^{12,13}) a dosiahli sme výsledky 0,21 g pigmentu/g suchej váhy kultivačného substrátu. Výsledky sa stretli s pozitívnym ohlasom.

2.2. Mitorubrín, mitorubrinol, kyselina mitorubrínová

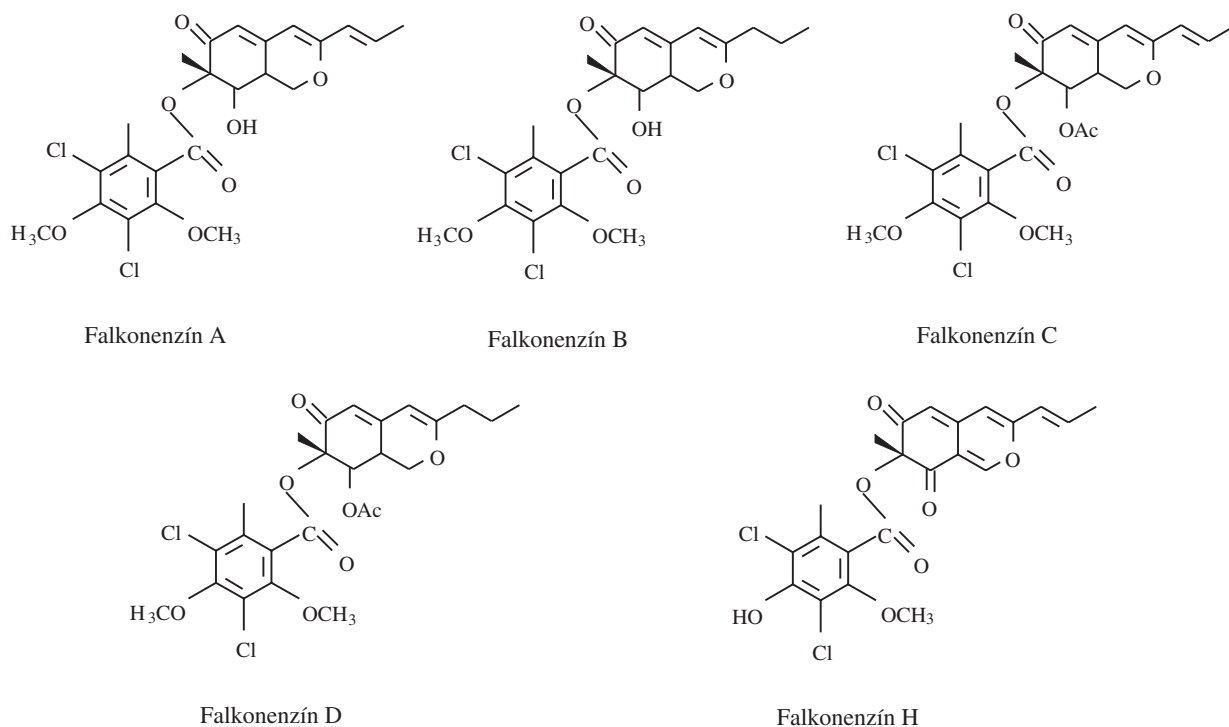
Skupina príbuzných fungálnych metabolitov obsahuje dve štruktúrne zložky, azafilónový skelet a zvyšok kyseliny orzelínovej, spojené esterovou väzbou (obr. 4). Obidve štruktúrne jednotky pochádzajú z acetátu. Mitorubrín bol produkovaný hubou *Penicillium rubrum* a získal sa ako žltá-oranžová prizmá⁵. Žltý pigment mitorubrinol je metabolitom mikroorganizmov *Penicillium rubrum*, *Penicillium wortmannii* Klocker a *Penicillium vermiculatum*¹⁴⁻¹⁶. Veľmi podobný fungálny metabolit, kyselina (–)-mitorubrínová bola izolovaná z *Penicillium funiculosum* a *Penicillium vermiculatum* zo submerznej 7-dňovej kultivácie^{6,17}.

Analýza hmotnostného spektra umožnila navrhnúť sumárny vzorec mitorubrínu $C_{21}H_{18}O_7$, mitorubrinolu $C_{21}H_{18}O_8$ a kyseliny mitorubrínovej $C_{22}H_{18}O_9$, Mitorubrinol, mitorubrín a kyselina mitorubrínová patria do rovnakej stereochemickej série ako (–)-sklerotiorín.

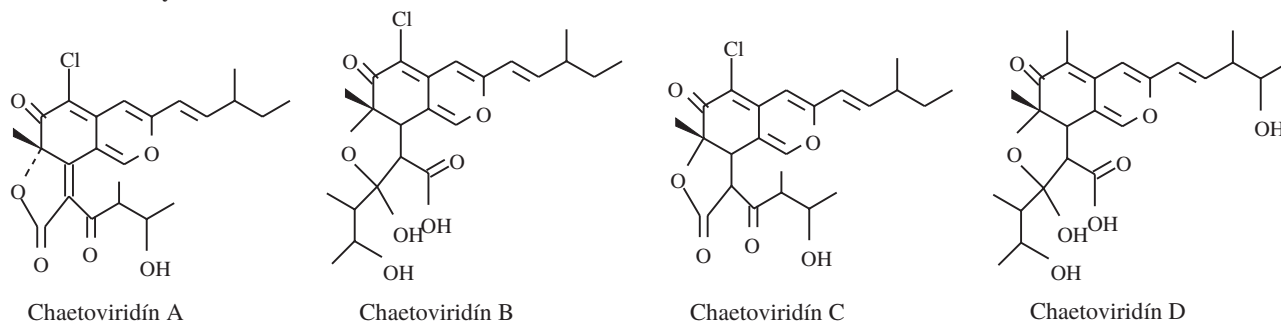
V našich experimentoch sme zistili farebné metabolity tejto skupiny látok s azafilónovou štruktúrou v extraktach kultúry *Penicillium funiculosum* CCM F-8080, *Penicillium vermiculatum* CCM F-276 a *Talaromyces wortmannii* (Klocker) C. R. Benjamin¹⁸.

2.3. Falkonenzíny

Falkonenzíny A, B, a C sa izolovali z dichlórmetánových extraktov mycélia askomycétnej huby *Emericella falkensis*¹⁹. Neskôr, Itabashi a spol.²⁰ izolovali z tejto kultúry falkonenzín H spolu s falkonenzínmi A, B, C, a D. Ich štruktúry sú znázornené na obr. 5. Sumárne vzorce falkonenzínov A, B, C, D a H boli určené elementárnou analýzou a hmotnostnou spektrometriou ako $C_{23}H_{24}Cl_2O_7$, $C_{23}H_{26}Cl_2O_7$, $C_{25}H_{26}Cl_2O_8$, $C_{25}H_{28}Cl_2O_8$ a $C_{22}H_{18}Cl_2O_7$. Metabolity sú hydrogenované azafilóny s dichlórorzelinovou štruktúrnou jednotkou. Štruktúra falkonenzínu A bola určená ako 7-(3,5-dichloro-2,4-dimetoxy-6-metylbenzoyl)-8-hydroxy-7-metyl-3-(1-propenyl)-1,



Obr. 5. Štruktúry falkonenzínov



Obr. 6. Štruktúry chaetoviridínov

7,8,8a-tetrahydro-6*H*-2-benzopyrán-6-on. Výsledky $^1\text{H-NMR}$ a UV spektroskopických štúdií indikujú postranný reťazec falkonenzínov A, C a H ako zvyšok 2-propenylu a postranný reťazec falkonenzínu B a D ako propylový zvyšok. Azafilónové metabolity huby *Emericella falconensis* boli izolované z kultivačnej pôdy ako žlté ihličky (falkonenzín A), bezfarebné prizmy (falkonenzín B), žltý kryštalický prášok (falkonenzín C, D).

2.4. Chaetoviridíny

Chaetoviridíny A, B, C a D, začlenené do skupiny azafilónov, možno izolovať z huby *Chaetomium globosum* var. *flavo-viride*²¹. Molekulové vzorce chaetoviridínov sú $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{ClO}_6$ (A), $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClO}_7$ (B), $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClO}_6$ (C) $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClO}_8$ (D). Spektrálne údaje indikujú chlór – obsahujúci azafilón s konjugovaným γ -laktónom spojeným angulárne s azafilónovou zložkou. Štruktúra chaetoviridínu A bola určená ako 5-chloro-9-[(2*S*,3*R*)-3-hydroxy-3-metyl-1-oxobutyl]-6*a*-(*S*)-metyl-3-[(*S*)-3-metyl-1-

-pentenyl]-6*H*-furo[2,3-*h*]-2-benzopyrán-6,8-(6*aH*)-dion. Červený pigment chaetoviridín A má nenasýtený γ -laktónový kruh, zatiaľ čo chaetoviridíny B, C a D (žlté pigmenty) majú nasýtený γ -laktónový kruh, ako to vidno zo štruktúr na obr. 6. Porovnaním fyzikálnych vlastností je zrejme, že chaetoviridín C je *cis*-8,2-dihydro derivát chaetoviridínu A, chaetoviridín B vykazuje vyššiu polaritu ako A a chaetoviridín D je 12-hydroxychaetoviridín B. Azafilónové metabolity *Chaetomium globosum* var. *flavo-viride* boli izolované zo stacionárnej kultúry rastúcej na pšenici, ako červené ihličky (chaetoviridín A) a žltý prášok (chaetoviridín B, C a D). Chaetoviridín A prejavoval inhibičnú aktivitu na monoaminoxidázu a inhibíciu rastu *P. oryzae* ($2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

2.5. Kyselina lunatová

Kyselina lunatová (obr. 2) je metabolit produkovaný fytopatogénnou hubou *Cochliobolus lunata* kultivovanou na sladínovo-dextrózovom médiu²². Počas izolačného a purifikač-

ného postupu bola konvertovaná diazometánom na metylester kyseliny lunatovej. Jeho UV spektrum indikuje prítomnosť amfipyrónového chromoforu, čo sa potvrdilo charakteristickou reakciou metylesteru kyseliny lunatovej s amóniovým iónom. Tento žltý pigment s antifungálnou aktivitou sumárneho vzorca $C_{22}H_{26}O_7$ bol izolovaný z fermentačnej pôdy po 72 h submerznej kultivácii.

2.6. Wortmin

Wortmin je člen sklerotiorínovej skupiny metabolitov produkovaných hubou *Penicillium wortmannii* Klocker¹⁴. Sumárny vzorec wortminu bol určený ako $C_{24}H_{28}O_8$. Časť štruktúry látky podľa IR, UV a NMR spektra tvorí zložka typu kyseliny orzelínovej. Druhá štruktúrna jednotka, azafilónový skelet 6-acetoxy-7-hydroxy-7-metyl-3-propenyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-benzo[e]pyrán-8-on je s ňou spojený esterovou väzbou (obr. 2). Wormin bol izolovaný vo forme žltého prášku. Okrem tejto substancie sa z kultivačného média *P. wortmannii* izoloval tiež mitorubrinol.

2.7. Austdiol

Vlegaar a spol.²³ izolovali opticky aktívny mikrobiálny metabolit austdiol z kultúry *Aspergillus ustus* (Bainier) Thom rastúcej na kukuričnej múke. Hmotnostná spektrometria a elementárna analýza definovali molekulový vzorec ako $C_{12}H_{12}O_5$. Tento metabolit so štruktúrou veľmi podobnou azafilónom bol identifikovaný ako (7R,8S)-7,8-dihydro-7,8-dihydroxy-3,7-dimetyl-6-oxo-6H-2-benzopyrán-5-karbaldehyd. Molekulu môžeme považovať za priamy reťazec pentaketidu formálne alkylovaný na dvoch metylénových pozíciách za vzniku aldehydovej skupiny na C-5 a metylovej skupiny na C-7 (obr. 2).

2.8. Rubrorotiorín

Niektoré ďalšie členy azafilónovej skupiny metabolitov sa zistili v extraktoch mycélia *Penicillium hirayamae* Udagawa, spolu s iným hlavným pigmentom (–)-sklerotiorínom²⁴. Molekulový vzorec červeného pigmentu rubrorotiorínu je $C_{23}H_{23}ClO_5$. Tento ekvivalent monochlóorderivátu rotiorínu, je prvý angulárny azafilón izolovaný z prírodných zdrojov (obr. 2). Po separácii majoritného pigmentu (–)-sklerotiorínu z extraktu fermentačnej pôdy sa rubrorotiorín získal vo forme červených ihličiek. Metabolit reaguje rýchlo s amóniovými iónmi za vzniku rubrorotioramínu, $C_{23}H_{24}ClNO_4$.

2.9. Luteusíny

Tri nové azafilóny (C, D a E) sa izolovali z askomycétnej huby *Talaromyces luteus* (anamorf *Penicillium vonarxii*) súčasne s luteusínmi A a B známymi predtým ako inhibítory monoaminoxydázy²⁵ (MAO). Štruktúra luteusínu A (obr. 2) je veľmi blízka 7-episklerotiorínu, ktorý MAO neinhboval. MAO inhibičný potenciál sa stráca konverziou hydroxylovej skupiny v pozícii C-8 na oxo-skupinu a hydrogenáciou dvojitých väzieb postranného reťazca. Nové azafilóny, luteusín C, D a E neinhbovali monoaminoxidázu. Monoacetylderivát luteusínu A je účinnejší inhibítor MAO, než pôvodný metabolit. Luteusín A sa získal po 21-dňovej statickej kultivácii *T. luteus* rastúcej na ryži (20 kg), v množstve 25 mg (cit.²⁶).

2.10. Izochromofilóny

Metabolity tohto typu boli izolované z fermentačnej pôdy *Penicillium sp.* FO-2338 (cit.²⁷), molekulové vzorce boli určené ako $C_{23}H_{25}O_5Cl$ (I) a $C_{22}H_{27}O_4Cl$ (II). UV a IR charakteristiky oboch látok sú veľmi podobné, avšak absorpcia γ -laktónového karbonylu zistená pre látku I sa nepozorovala v IR spektre izochromofilónu II. Metabolity obsahujú atóm chlóru. Na azafilónový skelet rovnaký ako skelet sklerotiorínu a postranné reťazce je naviazaných dovedna päť metylových skupín (obr. 2). Izochromofilóny I a II sa izolovali spolu so sklerotiorínom zo submerznej kultúry *Penicillium sp.* FO-2338, neskôr identifikovanej ako *Penicillium multicolor*²⁸, na médiu s kombinovaným uhlíkatým a dusíkatým zdrojom, vo forme žltého prášku. Ich množstvá v médiu boli 2,02 (I), resp. 1,39 (II) mg.l⁻¹. Metabolity sú prvé nepeptidové látky inhibujúce špecifickú väzbu HIVgp120 proteínu s CD_4 molekulou na povrchu citlivých buniek organizmu, ktorý vírus atakuje a zabraňuje tým vstupu HIV vírusu do bunky (IC₅₀ 6,6 a 3,9 μ mol.l⁻¹). Izochromofilóny III–VI, inhibítory acyl-CoA: cholesterol acyltransferázy, izoloval Arai so spolupracovníkmi²⁹ z kultúry *Penicillium multicolor* FO-3216. Nové izochromofilóny VII a VIII sa získali z *Penicillium sp.* FO-4164. Metabolit VIII inhiboval diacylglycerol acyltransferázovú aktivitu, ako aj acyl-CoA: cholesterol acyltransferázovú aktivitu³⁰.

V tabuľke I je stručný prehľad produkcie azafilónových metabolitov vláknitými hubami.

Tabuľka I

Azafilónové pigmenty produkované mikroorganizmami

Metabolit	Mikroorganizmus	Lit.
Monascín	<i>Monascus purpureus</i> Went	7,9
	<i>Monascus rubiginosus</i> Sato	8
	<i>Monascus rubropunctatus</i> Sato	8
Rubropunktatín	<i>Monascus rubropunctatus</i> Sato	8
Rubropunktamín		3
Ankaflavín		3
Monaskorubrín	<i>Monascus purpureus</i>	8
Monaskorubramín		3
N-Glutarylrubropunktamín	<i>Monascus ruber</i>	7
N-Glutarylmonaskorubramín	<i>Monascus ruber</i>	7
Mitorubrín	<i>Penicillium rubrum</i>	5,31
Mitorubrinol	<i>Talaromyces udagawae</i>	30
	<i>Penicillium rubrum</i>	5
	<i>Penicillium wortmannii</i>	14
	<i>Penicillium vermiculatum</i>	16
Kyselina mitorubrínová	<i>Penicillium funiculosum</i>	6
	<i>Penicillium vermiculatum</i>	16,17
Monometyl-(+)-mitorubrín	<i>Talaromyces tardifaciens</i>	32
Wortmin	<i>Penicillium wortmannii</i>	14
Austdiol	<i>Aspergillus ustus</i>	23
Chaetoviridín A–D	<i>Chaetomium globosum</i>	21
	var. <i>flavo-viride</i>	
Kyselina lunatová	<i>Cochliobolus lunata</i>	22
Falkonenzín A–D,H	<i>Emericella falconensis</i>	19,20
Rubrorotiorín	<i>Penicillium hirayamae</i>	24
Luteusín A–E	<i>Talaromyces luteus</i>	25,26
	<i>Penicillium vonarxii</i>	31
Izochromofilón I–VI	<i>Penicillium multicolor</i>	27–29
Izochromofilón VII,VIII	<i>Penicillium sp.</i> FO-4164	30

3. Záver

Niektoré v práci spomenuté azafilónové metabolity vláknitých húb (pigmenty *Monascus*), sa bežne používajú na farbenie potravín. Lahko sa derivatizujú prostredníctvom substitúcie kyslík/dusík. Selektívna derivatizácia substitúciou reaktívneho kyslíka otvára ďalšie možnosti v príprave novej skupiny semisyntetických farbív. Ich hlavnou výhodou je prírodný výskyt vo fermentovaných potravinách. Širšiemu uplatneniu v EU bráni nedoriešená legislatíva.

V náväznosti na poznatky zhrnuté v tejto práci, sa okrem metabolitov kmeňov *Monascus* javia perspektívnymi aj iné azafilónové zlúčeniny. Zostáva nezodpovedaných ešte mnoho otázok za účelom možností určenia farebného spektra pigmentov a výberu mikroorganizmov, ktoré by mohli mať široké uplatnenie predovšetkým v oblasti potravinárskych výrobkov s prihliadnutím nielen na ich štruktúru, ale aj na selektívnu elimináciu možných toxikologických problémov spojených s inými derivátmi než azafilónmi ako sprievodnými metabolitmi.

Práca bola financovaná v rámci úlohy I/6252/99 grantovej agentúry VEGA.

LITERATÚRA

- StMartin E. J., Kurek P. R., Schumacher E. F., Fohrbach R. P. (UOP, Des Plaines, Illinois): US 5013564 (1990).
- Matsunaga M.: JP 02303477 (1990).
- Júzlová P., Martínková L., Křen V.: J. Ind. Microbiol. 16, 163 (1996).
- Martínková L., Patáková-Júzlová P., Křen V., Kučerová Z., Havlíček P., Olšovský O., Hovorka B., Veselý D., Veselá D., Ulrichová J., Příkrylová V.: Food Addit. Contam. 16, 15 (1999).
- Buchi G., White J. D., Wogan G. N.: J. Am. Chem. Soc. 87, 3484 (1965).
- Natsume M., Takahashi Y., Marumo S.: Agric. Biol. Chem. 49, 2517 (1985).
- Hajjaj H., Kláčeb A., Loret M. O., Tzekadis T., Goma G., Blanc P. J.: Appl. Environ. Microbiol. 63, 2671 (1997).
- Fielding B. C., Holker J. S. E., Jones D. F., Powell A. D. G., Richmond K. W., Robertson A., Whalley W. B.: J. Chem. Soc. 4, 4579 (1961).
- Chen F. C., Manchand P. S., Whalley W. B.: J. Chem. Soc. C 1971, 3577.
- Birch A. J., Cassera A., Fitton P., Holker J. S. E., Smith H., Thompson G. A., Whalley W. B.: J. Chem. Soc. C, 1962, 3583.
- Slugeň D., Šturdíková M., Rosenberg M.: Bulletin PV 36, 155 (1997).
- Slugeň D., Menta S. S., Rosenberg, M., vo sborníku: *Papers of the Symposium on Monascus Culture and Applications*, str. 81. INRA, Toulouse 1998.
- Slugeň D., Mogoňová E., Krištofiková L., Rosenberg M., vo sborníku: *Papers of the Symposium on Monascus Culture and Applications*, str. 239. INRA, Toulouse 1998.
- Merlini L., Mondelli R., Nasini G.: Helv. Chim. Acta 50, 232 (1973).
- Proksa B., Liptaj T., Prónayová N., Fuska J.: Chem. Papers 48, 429 (1994).
- Proksa B., Uhrín D., Fuska J., Micháľková E.: Collect. Czech. Chem. Commun. 57, 408 (1992).
- Proksa B., Šturdíková M., Mojumdar S. C., Fuska J.: Folia Microbiol. 42, 133 (1997).
- Šturdíková M., Slugeň D., Rosenberg M.: 21st Congress Czechoslov. Soc. Microbiol., Hradec Králové, 6.–10. September 1998, Abstracts, Čs. spol. mikrobiol., Praha 1998.
- Itabashi T., Nozawa K., Miyaji M., Udagawa S., Nakajima S., Kawai K.: Chem. Pharm. Bull. 40, 3142 (1992).
- Itabashi T., Nozawa K., Nakajima S., Kawai K.: Chem. Pharm. Bull. 41, 2040 (1993).
- Takahashi M., Koyama K., Natori S.: Chem. Pharm. Bull. 38, 625 (1990).
- Nukina M., Marumo S.: Tetrahedron Lett. 30, 2603 (1977).
- Vleggaar R., Steyn P. S., Nagel D. W.: J. Chem. Soc. Perkin I 13, 45 (1974).
- Gray R. W., Whalley B.: J. Chem. Soc. C 1971, 3575.
- Satoh Y., Yamazaki M.: Chem. Pharm. Bull. 37, 206 (1989).
- Yoshida E., Fujimoto H., Yamazaki M.: Chem. Pharm. Bull. 44, 284 (1996).
- Omura S., Tanaka H., Matsuzaki K., Ikeda H., Masuma R.: J. Antibiot. 46, 1908 (1993).
- Matsuzaki K., Ikeda H., Masuma R., Tanaka H., Omura S.: J. Antibiot. 48, 703 (1995).
- Arai N., Shiomi K., Tomoda H., Tabata N., Yang D. J., Masuma R., Kawakubo T., Omura S.: J. Antibiot. 48, 696 (1995).
- Yang D. J., Tomoda H., Tabata N., Masuma R., Omura S.: J. Antibiot. 49, 223 (1996).
- Nakanishi S., Kakita S., Takahashi I., Kawakura K., Tsukuda E., Sano T., Yamada K., Yoshida M., Kase H., Matsuda Y.: J. Biol. Chem. 267, 2157 (1992).
- Nozawa K., Saito R., Udagawa S., Nakajima S., Kawai K.: Phytochemistry 29, 719 (1995).

M. Šturdíková, D. Slugeň, K. Lešová and M. Rosenberg
(Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic): **Microbial Production of Coloured Azaphilone Metabolites**

Azaphilones, fungal secondary metabolites of the pyra-nequinone structure, react with ammonia yielding vinylogous 4-pyridones. The pigments also react with amines, such as proteins, amino acids and nucleic acids, to form water-soluble pigments. Their most remarkable and valuable properties include the natural origin, yellow-red spectra, thermostability (in comparison with other natural red pigments), and easy derivatization. So far, they have been identified in a variety of fungal sources. Of the microorganisms tested, only genera *Monascus*, *Penicillium* and *Chaetomium* are good producers of azaphilone pigments. However, similar structures were also identified in *Aspergillus ustus*, *Cochliobolus lunata*, *Talaromyces sp.* and *Emericella falconensis*. The microorganisms could be a promising source of the new group of natural pigments for food and cosmetic industry.

BIOLOGICKÁ A FARMAKOLOGICKÁ AKTIVITA LIGNANŮ

JIŘÍ SLANINA

Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita,
Komenského nám. 2, 662 43 Brno
e-mail: jslanina@med.muni.cz

Došlo dne 22.II.1999

Klíčová slova: lignany, biologická aktivita

Obsah

1. Úvod
2. Protinádorová aktivita
3. Antivirová aktivita
4. Kardiovaskulární aktivita
5. Antioxidační aktivita
6. Lignany u savců a člověka

1. Úvod

Lignany jsou poměrně rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů cévnatých rostlin se zajímavými fyziologickými účinky. Skládají se ze dvou fenylypropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální (β) uhlíky obou postranních řetězců. Název lignany byl pro tuto skupinu přírodních látek odvozen z toho, že tyto sloučeniny byly původně považovány za meziproducty při biosyntéze ligninu (C_6-C_3)_n, polymeru rovněž složeného z fenylypropanových jednotek jako lignany (C_6-C_3)₂. Dnes je zřejmé, že vzhledem ke struktuře ligninu a lignanů pouze některé z nich mohou sloužit k tomuto účelu. Navíc, lignin je na rozdíl od naprosté většiny lignanů opticky inaktivní. Rovněž skutečnost, že je známo velmi malé množství vyšších oligomerů, jako jsou seskvilignany (C_6-C_3)₃ nebo dilignany (C_6-C_3)₄ podporuje tento názor¹.

Obr. 1 popisuje předpokládanou biosyntetickou dráhu 6 hlavních strukturních tříd lignanů. Biosyntéza začíná oxidační dimerizací koniferylalkoholu (*I*) za vzniku chirálních produktů, lignanů. Některé enzymy ((+)-pinoresinol synthasa² a (+)-pinoresinol:(+)-lariciresinol oxidoreduktasa³), které se podílejí na biosyntéze lignanů, byly již purifikovány a charakterizovány^{2,3}. V rostlinách se vyskytují sloučeniny, které mají podobné strukturní znaky jako lignany. Mezi tyto příbuzné sloučeniny patří především neolignany, ve kterých jsou dvě fenylypropanové jednotky spojeny jinou vazbou, než je vazba přes centrální (β) uhlíky alifatických řetězců. Existují také hybridní lignany jako jsou flavanolignany, kumarinolignany a lignan-iridoidy, v nichž jedna část molekuly je tvořena fenylypropanovou jednotkou a druhá část jinou přírodní látkou. O flavanolignanech bylo v tomto časopise pojednáno nedávno⁴.

V současnosti je známo více jak 200 lignanů nacházejících se ve více než 70 čeledích rostlin. Mohou se vyskytovat

v rostlinách ve formě glykosidů, většinou jsou však přítomny ve formě aglykonů. Lignany se nacházejí hojně u nahosemenných rostlin (jehličnany) a u dvouděložných rostlin. Jsou hlavními sekundárními metabolity čeledi *Podophyllaceae*⁵ a živého reliktu, čeledi *Schisandraceae*, která je vývojově nejstarší čeledí dvouděložných rostlin. Byly nalezeny prakticky ve všech částech rostlin, typická je jejich přítomnost ve dřevě a kůře stromů a v pryskyřicích⁶. U některých druhů byl nejvyšší obsah lignanů nalezen v semenech⁷. Z rostlinného materiálu jsou vzhledem ke své nízké polaritě extrahovány petroletherem, hexanem nebo jinými nepolárními rozpouštědly. K extrakci lze s výhodou použít také superkritickou fluidní extrakci CO₂ (cit.^{8,9}).

Málo je známo o fyziologické funkci lignanů v rostlinách. Protože se jedná o sloučeniny, které vykazují antimikrobiální, antimitotické, antivirové, antioxidační a antinutriční vlastnosti, předpokládá se, že podobně jako jiné sekundární metabolity zvyšují rezistenci rostlin proti různým patogenům³.

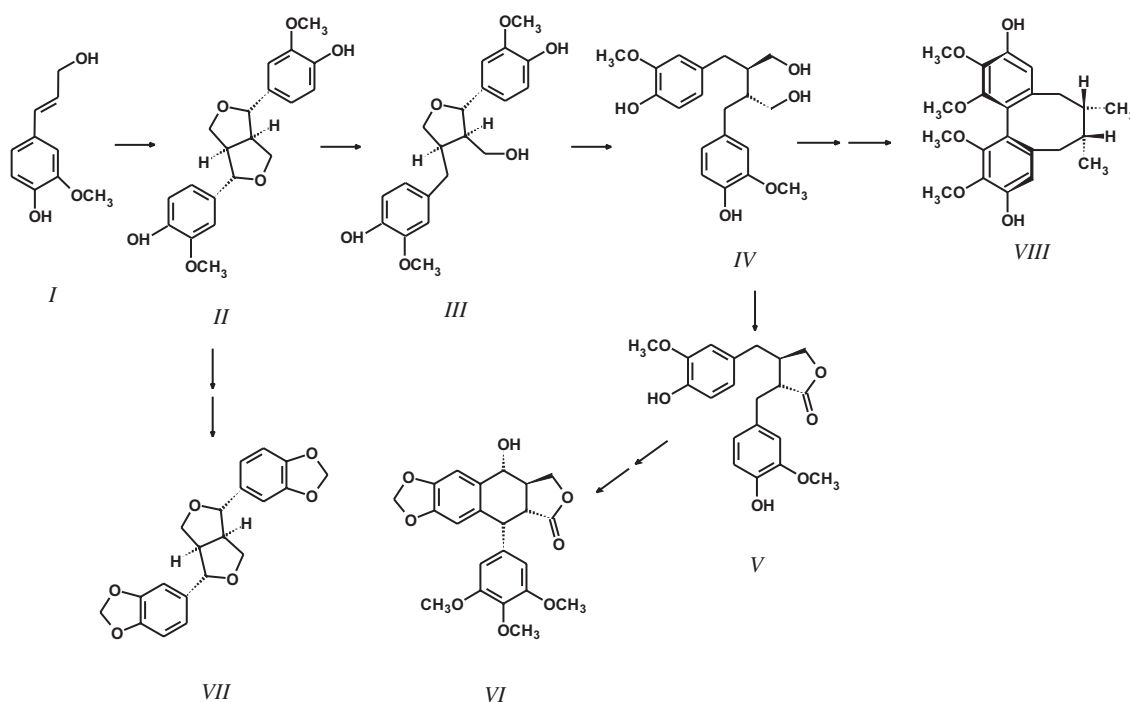
Nepolární charakter lignanů umožňuje jejich snadnou prostupnost buněčnými membránami a schopnost ovlivnit v buňkách řadu biologických dějů. Některé lignany se používají jako léčiva, např. cytostatika etoposid a teniposid. Vykazují také výraznou antivirovou aktivitu, včetně aktivity vůči viru HIV. Na molekulární úrovni se některé z nich váží na mikrotubuly, inhibují jaderné topoisomerasy, jiné se používají ke specifické inhibici enzymů¹⁰.

Lignany byly také nalezeny v krvi a moči savců, včetně člověka. Tyto „živočišné“ lignany vznikají ve střevech savců mikrobiální transformací rostlinných lignanů, účinkují v organismu jako fytoestrogeny¹¹ a pravděpodobně působí preventivně proti vzniku některých nádorových onemocnění.

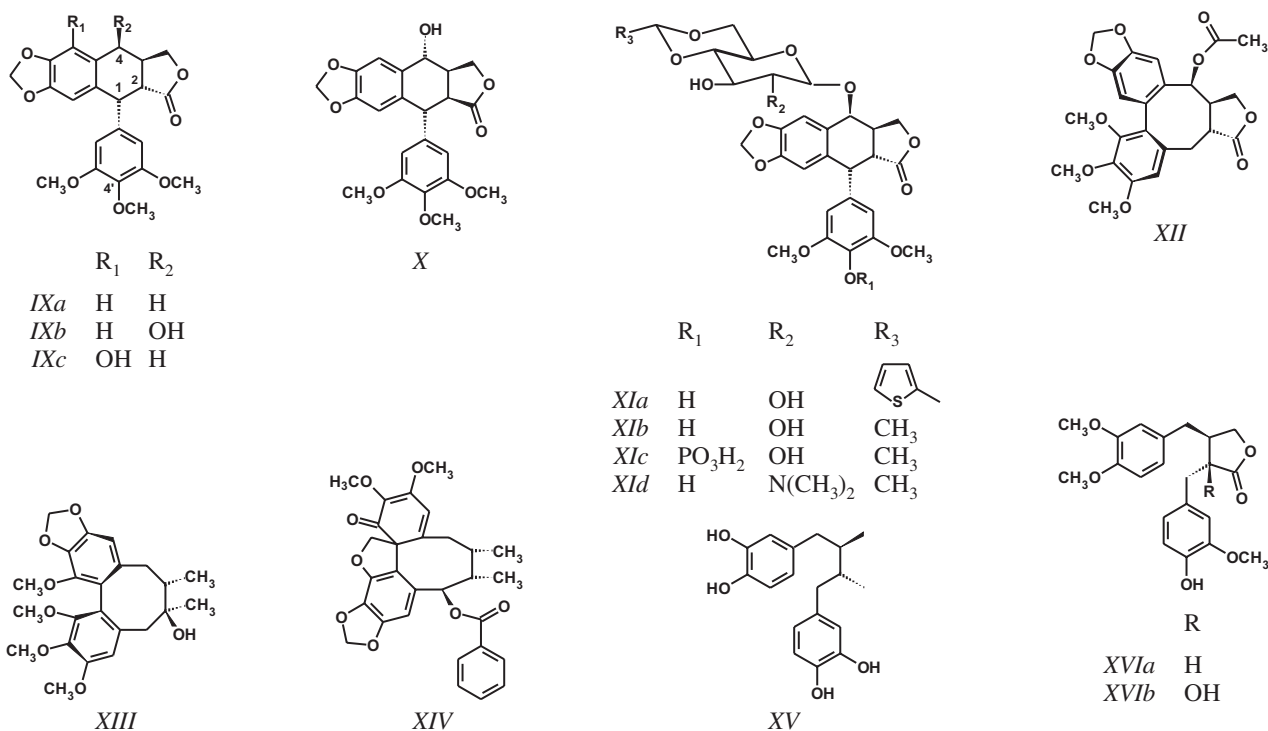
2. Protinádorová aktivita

Výrazná protinádorová aktivita byla popsána u řady lignanů. MacRae a Towers⁶ uvádějí ve svém přehledu 33 lignanů s protinádorovou aktivitou, 31 z nich má methylenedioxydovou skupinu a 29 z nich má pětičlenný laktonový cyklus. Oba tyto strukturní rysy mají tetrahydro-naftalenové lignany z oddenků noholistu (*Podophyllum peltatum* nebo *P. emodi*). Nejlépe prostudovaný podofylotoxin (*VI*) je známým mitotickým jadem¹². Působí jako inhibitor polymerace tubulinu, zabráňuje tvorbě dělicího vřetenka a zastavuje tak buněčné dělení v metafázi. Podofylotoxin má asi dvakrát vyšší afinitu k tubulinu než alkaloid kolchicin. Podofylotoxin a kolchicin se váží k tubulinu na dvou místech, jedno z nich, které je specifické pro 3,4,5-trimetoxyfenylovou skupinu, je společné pro oba toxiny.

Také deriváty podofylotoxinu působí jako inhibitory polymerace tubulinu. Deoxypodofylotoxin (*IXa*) je stejně účinný jako podofylotoxin (*VI*), zatímco epipodofylotoxin (*IXb*), C-4 stereoisomer podofylotoxinu, má o více než řád sníženou aktivitu. β -peltatin (*IXc*) má dokonce vyšší afinitu k tubulinu než podofylotoxin. Podmínkou antimitotické aktivity těchto látek je *trans*-konfigurace laktonového cyklu. Pro účinek je



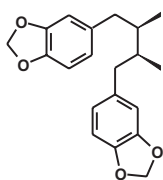
Obr. 1. Schéma biosyntézy šesti hlavních strukturálních tříd lignanů. *I* = E-koniferylalcohol, *II* = pinoresinol (furfuranový lignan), *III* = lariciresinol (tetrahydrofuranový lig.), *IV* = sekoisolariciresinol (dibenzylbutanový lig.), *V* = matairesinol (dibenzylbutyrolaktonový lig.), *VI* = podofylotoxin (aryltetrahydro-naftalenový lig.), *VII* = sezamin, *VIII* = gomisin J (dibenzocykloooktadienový lig.)



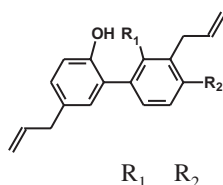
rovněž důležitá *R*-konfigurace na uhlíku C-2. Pikropodofylotoxin (*X*), který se liší od podofylotoxinu pouze konfigurací na C-2 se neváže na tubulin a jeho protinádorová aktivita je značně snížena⁶.

Deriváty 4'-demethylepipodofylotoxinu vykazují rovněž protinádorový účinek, působí však překvapivě zcela jiným

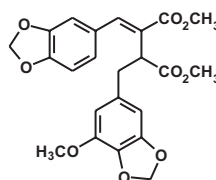
mechanismem. Tyto sloučeniny, které mají jen velmi malou afinitu k tubulinu¹³, inhibují topoisomerasu II. Do klinické praxe jako cytostatika byly zavedeny na konci sedmdesátých a na začátku osmdesátých let dva deriváty, teniposid (*XIa*) a etoposid¹⁴ (*XIb*). K hlavním indikacím etoposidu a teniposidu patří malobuněčný karcinom plic a testikulární nádory.



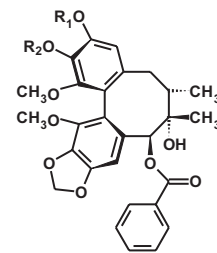
XVII



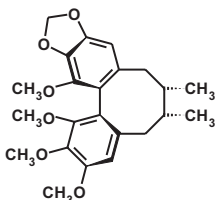
R₁ R₂
 XVIIIa OH H
 XVIIIb H OH



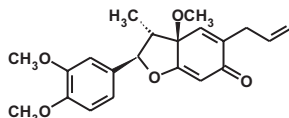
XIX



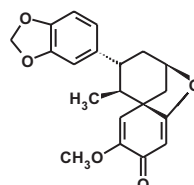
XXa R₁ = R₂ = -CH₂-
 XXb R₁ = R₂ = CH₃



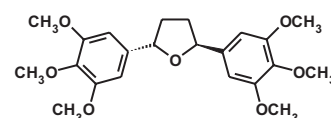
XXI



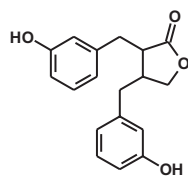
XXII



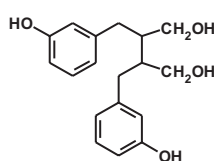
XXIII



XXIV



XXV



XXVI

Etoposid je často základní, těžko nahraditelnou součástí chemoterapie první volby^{15,16}. Etoposid se vyrábí semisynteticky z podofylotoxinu, jehož nejběžnějším zdrojem je *Podophyllum emodi*, původem z Indie¹⁷. Značná pozornost je věnována nalezení analog etoposidu s vyšším protinádorovým účinkem, vyšší aktivitou vůči liniím nádorových buněk rezistentních k cytostatikům a vylepšenou farmakokinetikou a biologickou dostupností. V roce 1996 byl schválen k použití proti karcinomu plic etopofos (XIIc), ve vodě rozpustný derivát etoposidu¹⁸. Ve 2. fázi klinického testování rovněž proti rakovině plic je ve vodě dobře rozpustný derivát etoposidu NK-611 (XId) (cit.¹⁸). Byly také syntetizovány deriváty podofylotoxinu (např. 4-O-butanoyl-4'-demethylpodofylotoxin), které jsou cytotoxické ve 100–1000× nižších koncentracích než běžná protinádorová léčiva a aktivní vůči liniím nádorových buněk rezistentních k etoposidu¹⁰.

Dobře známými mitotickými jedy jsou také dibenzocyklooktadienové laktony ze *Steganotaenia araliacea*. Struktura těchto látek je značně podobná předešlým tetrahydronaftalenovým lignanům. Nejsilnější antitubulinový a protinádorový účinek z lignanů této rostliny vykazuje steganangin (XII). Podobně jako u podofylotoxinu, nutnou podmínkou antitubulinové aktivity je přikondenzování laktonového cyklu v *trans*-konfiguraci. Pro inhibici polymerace tubulinu je také nezbytná *S*-konfigurace biarylu¹⁹. Také některé další dibenzocyklooktadienové lignany s methyldioxydovou skupinou vykazují protinádorový účinek, přestože se neváží na mikrotubuly. Příkladem je gomisin A (XIII) ze *Schisandra chinensis*, který tlumí u krys hepatokarcinogenní působení azobarviv²⁰ a aflatoxinů²¹ nebo schiarisanrin C (XIV) ze *Schisandra arisanensis*²².

Dalším terapeutickým lignanem je nordihydroguajaretová

kyselina (NDGA, masoprocol, XV), která se používá v prevenci a léčbě premaligních kožních lézí, především aktinické keratózy. NDGA je také v klinickém zkoušení při léčbě zhoubných nádorů⁵.

Současná studie ukázala, že lignany matairesinol (V), arctigenin (XVIa), machilin A (XVII) a neolignan honokiol (XVIIIa) inhibují *in vitro* růst buněk lidské myeloidní leukémie o koncentracích menších než 100 ng.ml⁻¹. Takové koncentrace jsou pouze o jeden řád vyšší než u cytostatik, které se běžně používají při léčbě leukémie. Lignany však byly na rozdíl od současných protinádorových léčiv podstatně méně cytotoxické²³.

3. Antivirová aktivita

Velmi dlouho je známo, že pryskyřice několika druhů rodu *Podophyllum* je účinná v léčbě kožních výrůstků, které jsou způsobeny papilomaviry, zejména u condyloma acuminatum. Lze ji použít i u lentigo senilis a seboroických bradavic. Účinnými látkami jsou tetrahydronaftalenové lignany. Alkoholový extrakt z oddenků rostlin rodu *P. emodi* nebo *P. peltatum* nazývaný podofylin a lignan podofylotoxin (VI) v masti nebo roztoku se používají v dermatologii k léčbě těchto obtíží²⁴. Aplikace většího množství podofylinu může vést k perkutánnímu vstřebávání a k toxickým projevům. Bezpečnější je proto podání čistého podofylotoxinu.

Podofylotoxin (VI), deoxy podofylotoxin (IXa) a β-peltatin (IXc) vykazují aktivitu proti viru spalniček a viru herpes simplex I (cit.⁶). Nezávisle na tom bylo zjištěno, že za antiherpetickou aktivitu extraktů z rostlin rodu *Juniperus* jsou zodpovědné rovněž arylnaftalenové lignany, zvláště deoxy podofylotoxin⁶. Roztok podofylotoxinu o koncentraci 1 μg.ml⁻¹ zcela inhibuje replikaci cytomegaloviru v tkáňové kultuře²⁵. Nedávno vzbudila pozornost aktivita rhinacanthinu E (XIX) proti viru chřipky typu A (cit.²⁶).

První poznatek o aktivitě lignanů proti viru HIV, původce onemocnění AIDS, publikovali Schröder a kol. v roce 1990. Izolovali z tropického popínavého keře *Ipomoea cairica* dva lignany, arctigenin (XVIa) a trachelogenin (XVIIb), které v submikromolárních koncentracích inhibovaly replikaci viru HIV-1

a reverzní transkriptasu²⁷. Avšak poměr mezi toxickou dávkou a efektivní dávkou (selektivní index) nebyl větší než 5. Byl rovněž připraven demetylovaný derivát arctigeninu, který je účinným inhibitorem HIV integrasy²⁸. Inhibitory HIV-1 integrasy představují velmi perspektivní skupinu sloučenin, která by se v budoucnu mohla uplatnit v terapii AIDS (cit.^{29,30}).

Nedávno bylo zjištěno, že gomisin J (VIII), dibenzocyklooktadienový lignan ze *Schisandra chinensis*, a jeho halogenované deriváty inhibují replikaci viru HIV-1 v submikromolárních koncentracích. Nejúčinnějším inhibitorem byl 2,9-dibromgomisin J se selektivním indexem přes 300. Tyto sloučeniny inhibovaly reverzní transkriptasu, ale zdá se, že to není jediný mechanismus účinku. Navíc halogenované deriváty gomisinu J působily synergicky s azidothymidinem (AZT) a byly účinné i proti klonům rezistentním k AZT (cit.³¹). Dalším dibenzocyklooktadienovým lignanem s S-konfigurací biarylu, který působí v tkáňové kultuře proti viru HIV-1 je schisantherin D (XXa), selektivní index 110) a gomisin G (XXb, EC₅₀ = 6 ng.ml⁻¹ a selektivní index 300)³². Byla také syntetizována analoga tetrahydraftalenových lignanů se selektivním indexem větším než 250 (cit.³³).

NDGA (XV) a zejména její 3'-O-methylether byly vyizolovány jako látky zodpovědné za anti-HIV-1 aktivitu extraktů z pouštní rostliny *Larrea tridentata*. Autoři se domnívají, že 3'-O-methylether NDGA se váže na LTR sekvenci HIV-1 a je tak schopen potlačit transkripci provirové DNA (cit.³⁴).

4. Kardiovaskulární aktivita

Je známo, že poměrně velké množství lignanů inhibuje cAMP fosfodiesterasu a tím zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP a stimuluje tak mimo jiné činnost myokardu. Inhibici vykazují především dibenzocyklooktadienové a dibenzylbutanové lignany s nejučinnějšími zástupci gomisinem N (XXI, IC₅₀ = 1,1.10⁻⁵ mol.l⁻¹) a NDGA (XV, IC₅₀ = 1.10⁻⁶ mol.l⁻¹) (cit.³⁵). Gomisin N se vyskytuje v plodech *Schisandra chinensis*, známé tonizující rostliny tradiční čínské medicíny.

Kadsurenon (XXII) a futoenon (XXIII), neolignany z *Piper futokadsura* jsou vedle diterpenových gingolidů z *Gingo biloba* velmi účinnými antagonisty fosfolipidu PAF (z anglického platelet activating factor, faktor aktivující trombocyty), který je endogenním aktivátorem agregace trombocytů. PAF se uplatňuje také při patologických stavech jako je vznik trombů, hypotenze, akutní zánět a anafylaktická reakce. Kadsurenon inhibuje vazbu PAF na jeho receptor (IC₅₀ = 1.10⁻⁷ mol.l⁻¹) a agregaci krevních destiček vyvolanou PAF (IC₅₀ = 9,9.10⁻⁷ mol.l⁻¹) (cit.³⁶). Antiagregační aktivita tetrahydrofuranových lignanů vedla k přípravě derivátu L-652731 (XXIV), který je účinným antagonistou PAF (IC₅₀ = 5.10⁻⁹ mol.l⁻¹) a inhibitorem agregace trombocytů (IC₅₀ = 19.10⁻⁹ mol.l⁻¹) (cit.³⁷).

Trachelogenin (XVIIb) z *Arctium lappa* a *Tracheolospermum jasminoides*, rostliny používané v tradiční čínské medicíně, je nejvýraznějším lignanovým blokátorem vápníkových kanálů. Jeho aktivita je přibližně šestinou aktivity verapamilu, kalciového blokátora, který se široce užívá v klinické praxi³⁸.

Extrakt z *Eucommia ulmoides* je užíván v Číně po staletí jako tonikum a má také antihypertenzní účinky. Pinoresinol diglukosid byl vyizolován jako látka zodpovědná za antihypertenzní efekt. Lignan pinoresinol (II) je také inhibitorem fosfodiesterasy^{6,36}.

Dobře je dokumentována antihypertenzní aktivita sezaminu (VII), lignanu sezamového oleje³⁹. Sezamin je schopen u krys zvýšit hladinu HDL-cholesterolu a snížit hladinu aterogenního LDL-cholesterolu⁴⁰. Sezamin je specifický inhibitor Δ-5 desaturasy a inhibuje tak biosyntézu arachidonové kyseliny (20:4, n-6) z dihomog-γ-linolenové kyseliny (20:3, n-6). Snížené množství kyseliny arachidonové vede k nižší koncentraci některých eikosanoidů, např. PGE₂ (cit.⁴¹).

5. Antioxidační aktivita

Velká pozornost je v současnosti věnována studiu antioxidantů, které jsou schopny potlačit účinky volných kyslíkových radikálů podlejších se na velkém množství patologických stavů v lidském organismu. Výzkum antioxidační aktivity lignanů je soustředěn především na furofuranový lignan sezamin (VII) ze sezamového oleje⁴², na neolignany honokiol (XVIIIa) a magnolol (XVIIIb) z rostlin rodu *Magnolia* a dibenzocyklooktadienové lignany ze *Schisandra chinensis*. Výrazné redukční účinky NDGA (XV) našly využití v potravinářství, kde se používá jako antioxidační aditivum⁴³. NDGA se také široce používá v laboratorních experimentech k inhibici lipoxygenas.

Neolignany honokiol (XVIIIa) a magnolol (XVIIIb) z kůry rostlin rodu *Magnolia* vykazují silnou antioxidační aktivitu v různých biologických systémech. Inhibují peroxidaci lipidů jak mitochondriálních⁴⁴, tak mikrosomálních⁴⁵ membrán a hemolýzu erytrocytů vyvolanou oxidačními činidly⁴⁵. Honokiol je silnější antioxidant než magnolol⁴⁶. Ačkoliv honokiol i magnolol vykazují nižší antiradikálový účinek než α-tokoferol v testech se syntetickým stabilním organickým radikálem⁴⁴, v biologických systémech je honokiol až 1000× účinnějším antioxidantem než α-tokoferol^{44,46}.

Sloučeninami s antioxidačními vlastnostmi jsou také dibenzocyklooktadienové lignany obsažené v plodech *Schisandra chinensis*. Cytoprotektivní aktivita těchto látek je intenzivně studována a dobře dokumentována⁴⁷. Pro účinek je pravděpodobně důležitá přítomnost methylenedioxydové skupiny^{48,49}. Tyto lignany sice nezhasí syntetické organické radikály^{49,50}, jsou však schopny zvýšit hladinu redukováného glutathionu v buňce a ochránit biologické membrány před lipoperoxidací v různých modelech oxidačního poškození⁴⁸. Antioxidační aktivita některých lignanů ze *S. chinensis* je také vyšší než u α-tokoferolu a tyto sloučeniny nevykazují prooxidační vlastnosti⁵¹. Mechanismus účinku není přesně znám, může spočívat mimo jiné v indukci detoxikačních enzymů a zvýšení proliferace endoplazmatického retikula v hepatocytech. Gomisin A (XIII) je u japonské firmy Tsumura v preklinické fázi vývoje jako hepatoprotektivní látka¹⁸.

6. Lignany u savců a člověka

Zájem o lignany prudce vzrostl, jakmile byly tyto sloučeniny identifikovány v séru a moči savců a člověka. Jedná se především o dva lignany enterolakton (XXV) a enterodiol⁵² (XXVI). Tyto „živočišné“ lignany mají hydroxylové skupiny pouze v pozicích meta aromatických jader. Taková substituce nebyla pozorována u lignanů rostlinného původu. Původně byly považovány za produkt metabolismu savců a člověka.

Tento endogenní původ a kolísání jejich koncentrace v průběhu menstruačního cyklu u žen s maximem v luteální fázi a v těhotenství nebylo později potvrzeno. Enterolakton a enterodiol vznikají jako produkt metabolismu střevní mikroflóry z rostlinných prekurzorů, především z matairesinolu (V) a secoisolariciresinolu (IV), které se nacházejí často v semenech rostlin, celozrnném pečivu, vláknině a v některé zelenině a ovoci. Daleko nejvyšší obsah matairesinolu a secoisolariciresinolu byl nalezen ve lněném semínku a je zde asi 100× vyšší než v ostatních zdrojích. „Živočišné lignany“ jsou vylučovány z organismu žlučí a močí v poměrně velkém množství (řádově μmol za den) jako glukuronidy a sulfoglukuronidy³⁶.

Lignany enterolakton a enterodiol působí jako slabé estrogeny. Podle hladiny estrogenů se váží nebo soutěží s estradiolem o vazbu na jaderný receptor pro estrogeny. Při nízké koncentraci estrogenů, např. u žen po menopauze, tak působí jako slabé estrogeny. Při vysoké koncentraci estrogenů mohou působit jako antiestrogeny^{53,54}.

„Živočišné lignany“ účinkují také jako slabé inhibitory agregace trombocytů a inhibitory Na^+/K^+ pumpy. Jsou přibližně o tři řády slabší inhibitory Na^+/K^+ pumpy než ouabain a neváží se na vazebné místo pro digitalisové glykosidy⁵⁵.

Neustále přibývá důkazů o tom, že příjem potravin s vysokým obsahem lignanů snižuje riziko vzniku kolorektálního karcinomu, rakoviny prsu u žen a rakoviny prostaty u mužů⁵³. Vysoká exkrece enterolaktonu v moči je spojována s nízkým rizikem rakoviny prsu^{54,56}. Tuto hypotézu podporují experimenty na zvířecích modelech⁵⁷ a tkáňových kulturách nádorových buněk⁵³. Enterolakton ve vysoké koncentraci také inhibuje růst nádorových buněk kolorektálního karcinomu⁵⁸ a rakoviny prsu nezávislé na estrogenech¹¹. Lignany mohou působit preventivně vůči nádorovým onemocněním nejen díky své antiestrogenní aktivitě, ale také díky schopnosti inhibovat klíčové enzymy biosyntézy steroidních hormonů 5α -reduktasu a aromatasu⁵⁹ a vyvolat indukci syntézy enzymů, které se podílejí na II. fázi detoxikace xenobiotik⁶⁰ nebo působit jinými zatím neznámými mechanismy.

LITERATURA

- Massanet G. M., Pando E., Rodriguez-Luis F., Zubia E.: *Fitoterapia* 60, 3 (1989).
- Davin L. B., Wang H. B., Crowell A. L., Bedgar D. L., Martin D. M., Sarkanen S., Lewis N. G.: *Science* 275, 362 (1997).
- Dinkova-Kostova A. T., Gang D. R., Davin L. B., Bedgar D. L., Chu A., Lewis N. G.: *J. Biol. Chem.* 271, 29473 (1996).
- Jegorov A.: *Chem. Listy* 90, 859 (1996).
- Castro M. A., Gordaliza M., Miguel del Corral J. M., San Feliciano A.: *Phytochemistry* 41, 995 (1996).
- MacRae W. D., Towers G. H. N.: *Phytochemistry* 23, 1207 (1984).
- Slanina J., Táborská E., Lojková L.: *Planta Med.* 63, 277 (1997).
- Chandra A., Nair M. G.: *Planta Med.* 61, 192 (1995).
- Lojková L., Slanina J., Mikešová M., Táborská E., Vejrosta J.: *Phytochem. Anal.* 8, 261 (1997).
- Ward R. S.: *Nat. Prod. Rep.* 14, 43 (1997).
- Wang C., Kurzer M. S.: *Nutr. Cancer* 28, 236 (1997).
- Viklický V., Hašek J., Streiblová E., Nečas O., v knize: *Cytoskelet* (Nečas O., ed.), str. 47. Academia, Praha 1991.
- Kokoshka J. M., Ireland C. M., Barrows L. R.: *J. Nat. Prod.* 59, 1179 (1996).
- Stähelin H. F., Wartburg A.: *Cancer Res.* 51, 5 (1991).
- Vítek P., Benešová K., Klener P.: *Remedia* 6, 194 (1996).
- Haber J., Klener P.: *Remedia* 8, 49 (1998).
- Bastos J. K., Burandt C. L., Nanayakkara N. P. D., Bryant L., McChesney J. D.: *J. Nat. Prod.* 59, 406 (1996).
- Shu Y. Z.: *J. Nat. Prod.* 61, 1053 (1998).
- Wickramaratne D. B. M., Pengsuparp T., Mar W., Chai H. B., Chagwedera T. E., Beecher C. W. W., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Pezzuto J. M., Cordell G. A.: *J. Nat. Prod.* 56, 2083 (1993).
- Nomura M., Nakachiyama M., Hida T., Ohtaki Y., Sudo K., Aizawa T., Aburada M., Miyamoto K. I.: *Cancer Lett.* 76, 11 (1994).
- Ip S. P., Mak D. H. F., Li P. C., Poon M. K. T., Ko K. M.: *Pharmacol. Toxicol.* 78, 413 (1996).
- Kuo Y. H., Kuo L. M. Y., Chen C. F.: *J. Org. Chem.* 62, 3242 (1997).
- Hirano T., Gotoh M., Oka K.: *Life Sci.* 55, 1061 (1994).
- Jirásková M., v knize: *Remedia compendium* (Suchopár J., ed.), kap. 13.22. Panax, Praha 1997.
- MacRae W. D., Hudson J. B., Towers G. H.: *Planta Med.* 55, 531 (1989).
- Kernan M. R., Sendl A., Chen J. L., Jolad S. D., Blanc P., Murphy J. T., Stoddart C. A., Nanakorn W., Balick M., Rozhon E. J.: *J. Nat. Prod.* 60, 635 (1997).
- Schröder H. C., Merz H., Steffen R., Müller W. E., Sarin P. S., Trumm S., Schulz J., Eich E.: *Z. Naturforsch. [C]* 45, 1215 (1990).
- Eich E., Pertz H., Kaloga M., Schulz J., Fesen M. R., Mazumder A., Pommier Y.: *J. Med. Chem.* 39, 86 (1996).
- Pommier Y., Pilon A. A., Bajaj K., Mazumder A., Neamati N.: *Antiviral Chem. Chemother.* 8, 463 (1997).
- Snášel J., Pichová I.: *Chem. Listy* 90, 927 (1996).
- Fujihashi T., Hara H., Sakata T., Mori K., Higuchi H., Tanaka A., Kaji H., Kaji A.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2000 (1995).
- Chen D. F., Zhang S. X., Xie L., Xie J. X., Chen K., Kashiwada Y., Zhou B. N., Wang P., Cosentino L. M., Lee K. H.: *Bioorg. Med. Chem.* 5, 1715 (1997).
- Charlton J. L.: *J. Nat. Prod.* 61, 1447 (1998).
- Gnabre J. N., Brady J. N., Clanton D. J., Ito Y., Dittmer J., Bates R. B., Huang R. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11239 (1995).
- Sakurai H., Nikaido T., Ohmoto T., Ikeya Y., Mitsuhashi, H.: *Chem. Pharm. Bull.* 40, 1191 (1992).
- Ghisalberti E. L.: *Phytomedicine* 4, 151 (1997).
- Hwang S. B., Lam M. H., Biftu T., Beattie T. R., Shen T. Y.: *J. Biol. Chem.* 260, 15639 (1985).
- Ichikawa K., Kinoshita T., Nishibe S., Sankawa U.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 34, 3514 (1986).
- Kita S., Matsumura Y., Morimoto S., Akimoto K., Furuya M., Oka N., Tanaka T.: *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1283 (1995).
- Umeda-Sawada R., Takahashi N., Igarashi O.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2268 (1995).
- Chavali S. R., Zhong W. W., Forse R. A.: *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 58, 185 (1998).
- Fauré M., Lissi E., Torres R., Videla L.: *Phytochemistry* 29, 3773 (1990).

43. Vodrážka Z. v knize: *Biochemie* [3], kap. 8.3.2, str. 138. Academia, Praha 1993.
44. Lo Y. C., Teng C. M., Chen C. F., Chen C. C., Hong C. Y.: *Biochem. Pharmacol.* *47*, 549 (1994).
45. Haraguchi H., Ishikawa H., Shirataki N., Fukuda A.: *J. Pharm. Pharmacol.* *49*, 209 (1997).
46. Chiu J. H., Ho C. T., Wei Y. H., Lui W. Y., Hong C. Y.: *Life Sci.* *61*, 1961 (1997).
47. Hikino H., Kiso Y., Taguchi H., Ikeya Y.: *Planta Med.* *50*, 213 (1984).
48. Ip S. P., Ma C. Y., Che C. T., Ko K. M.: *Biochem. Pharmacol.* *54*, 317 (1997).
49. Kiso Y., Tohkin M., Hikino H., Ikeya Y., Taguchi H.: *Planta Med.* *52*, 351 (1985).
50. Slanina J., Paulová H., Táborská E.: *Pharm. Pharmacol. Lett.* *7*, 53 (1997).
51. Mak D. H. F., Ip S. P., Li P. C., Poon M. K. T., Ko K. M.: *Mol. Cell. Biochem.* *165*, 161 (1996).
52. Setchell K. D., Lawson A. M., Mitchell F. L., Adlercreutz H., Kirk D. N., Axelson M.: *Nature* *287*, 740 (1980).
53. Mousavi Y., Adlercreutz H.: *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* *41*, 615 (1992).
54. Slavin J., Jacobs D., Marquart L.: *Nutr. Cancer* *27*, 14 (1997).
55. Fagoo M., Braquet P., Robin J. P., Esanu A., Godfrind T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *134*, 1064 (1986).
56. Ingram D., Sanders K., Kolybaba M., Lopez D.: *Lancet* *350*, 990 (1997).
57. Serraino M., Thompson L. U.: *Nutr. Cancer* *17*, 153 (1992).
58. Sung M. K., Lautens M., Thompson L. U.: *Anticancer Res.* *18*, 1405 (1998).
59. Evans B. A., Griffiths K., Morton M. S.: *J. Endocrinol.* *147*, 295 (1995).
60. Wang W., Liu L. Q., Higuchi C. M., Chen H.: *Biochem. Pharmacol.* *56*, 189 (1998).

J. Slanina (*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno*): **Biological and Pharmacological Activity of Lignans**

Lignans are secondary plant metabolites consisting of two phenylpropane units. Their antineoplastic, cardiovascular and antioxidant activities are discussed in the review. The podophyllotoxin derivatives etoposide and teniposide are used in medical practice as cytostatics. Enterolactone and enterodiol were identified in serum and urine of mammals. They are formed as metabolic products of intestinal microflora from plant precursors, acting in the organism as phytoestrogens and probably preventing some types of cancer.

MATERIÁLY PRO SNIŽOVÁNÍ HLUKU A VIBRACÍ

EUBOMÍR LAPČÍK, JR., VLADIMÍR CETKOVSÝ,
BARBORA LAPČÍKOVÁ a STANISLAV VAŠUT

Ústav fyziky a materiálového inženýrství, Fakulta technologická ve Zlíně, Vysoké učení technické v Brně, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, e-mail: lapcik@zlin.vutbr.cz

Došlo dne 15.III.1999

Klíčová slova: vibrace, hluk, tlumení, polyurethany, hydroxy-
lem končený polybutadien

Obsah

1. Úvod
2. Fyzikální veličiny
 - 2.1. Vyzařování zvuku
 - 2.2. Vzduchová neprůzvučnost
3. Základní konstrukční typy zvukové a vibračně pohltivých materiálů
 - 3.1. Zvukově absorpční lamináty
 - 3.2. Kompozitní vlasové smyčkové materiály
 - 3.3. Skeletové deskové systémy
 - 3.4. Planární panelové systémy s proměnnou tloušťkou vzduchové mezery
 - 3.5. Volně sypané částicové systémy
 - 3.6. Sendvičové pěnové kompozitní systémy
 - 3.7. Sendvičové kompozity s tvarovanými kanálky (drážkami) nebo bez nich
 - 3.8. Síťované polymerní systémy
 - 3.9. Protihlukové bloky
4. Závěr

1. Úvod

Zvuk je akustické vlnění o frekvenci 10 Hz až 16 kHz. Akustické vlnění se šíří směrem od zdroje ve všech směrech. Místa, do nichž dospělo vlnění ze zdroje za stejnou dobu, tvoří tzv. vlnoplochy, přičemž tato místa v daném okamžiku kmitají se stejnou fází. Podle přístupu k problematice snižování hlučnosti lze rozlišit následující metody:

- Metoda redukce – snížení hlučnosti samotného zdroje hluku, např. při konstrukci zařízení.
- Metoda zvukové izolace – obklopení zdroje zvuku materiálem s co nejvyšším stupněm neprůzvučnosti.
- Metoda zvukové pohltivosti – snahou je, aby ta část zvuku, která se při dopadu na stěnu odráží zpět, byla co nejmenší, tj. aby izolační materiál pohlcovал co největší část dopadající energie.

V našem případě jde o přípravu materiálu zvukově pohltivého; přiblížíme si tedy základní principy procesů probíhající v průběhu absorpce zvukové energie. V matici zvuko-

vě-vibračně tlumícího materiálu dochází k disipaci zvukového vlnění na mechanickou energii a teplo. To se děje kombinací následujících procesů:

- Tření rozkmitaných částic vzduchu o stěny při jejich vnikání do pórů pohltivého materiálu. Tím dochází ke snižování kinetické energie dopadajícího zvukového pole. Efektivita tohoto procesu se zvyšuje se zvyšující se porozitou absorpčního materiálu.
- Snižování potenciální energie zvukové vlny vnikající do materiálu. Tím dochází ke snížení akustického tlaku, což může být způsobeno výměnou tepla mezi vzduchem a skeletem pohltivého materiálu při periodických tlakových změnách.
- Nepružná deformace tělesa pohltivého materiálu.

Při cílené konstrukci vibračně nebo hlukově-izolačního materiálu je proto možné využít všech výše uvedených procesů k jejich synergickému působení pro dosažení maximální účinnosti tlumení. Toho lze dosáhnout jednak volbou geometrie dotyčného tělesa, jednak výběrem vhodné nosné matrice a pojidla. Jedním z vhodných systémů je např. recyklovaná pryž pojená elastomery na bázi kapalných polybutadienů. Vhodnou volbou molární hmotnosti a koncových skupin polybutadienu, jakož i výběrem síťovadla lze regulovat molekulární parametry výsledného elastomeru, totiž hustotu polymerní sítě a délku volných segmentů, a tím i komplexní složku dynamického modulu pružnosti, který ovlivňuje zvukovou pohltivost.

2. Fyzikální veličiny

Pohltivé vlastnosti materiálu nebo celé konstrukce vyjadřuje koeficient zvukové pohltivosti α :

$$\alpha = \frac{P_p}{P_{\text{dop}}} \quad (1)$$

kde P_p je pohlcený akustický výkon a P_{dop} je celkový dopadající výkon. Pro případ kolmo dopadajícího zvuku se definuje normálový koeficient zvukové pohltivosti α_n :

$$\alpha_n = \frac{(4r/\rho c)}{\left(\frac{r}{\rho c} + 1\right)^2 + (x/\rho c)^2} \quad (2)$$

kde $r/\rho c$ je akustický odpor (reálná část akustické impedance), $x/\rho c$ akustická reaktance (imaginární část akustické impedance). ρc je charakteristická impedance vzduchu, která obecně závisí na rychlosti šíření vzruchu prostředím, c . Rychlost šíření vzruchu je závislá na hustotě prostředí ρ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), teplotě T ($^{\circ}\text{C}$) a dalších veličinách. Tak např. pro vzduch o teplotě 0°C a tlaku 10^5 Pa je rychlost šíření vzruchu $332 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; pro teplotu -20°C a tlak 10^5 Pa je tato rychlost $319 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (cit.¹).

Charakteristiky zvukové pohltivosti pórovitých izolačních materiálů jsou závislé na akustické impedanci materiálu. Akus-

tická impedance (Z_a) je komplexní veličina, která se skládá z frekvenčně závislých složek akustického odporu a akustické reaktance a je definována jako komplexní podíl akustického tlaku a objemové rychlosti:

$$Z_a = \frac{p}{q} \quad (3)$$

Akustický tlak p je definován jako rozdíl mezi tlakem a statickým tlakem (statický tlak je časově průměrovaným tlakem prostředí). Objemová akustická rychlost q (neboli tok akustické rychlosti) je definován jako časová změna objemové akustické výchylky.

Akustická reaktance pórovitých izolačních materiálů je určována tloušťkou vrstvy a – v mnohem menší míře – plošnou hustotou vzduchově propustného povrchového filmu, kterým je pokryt povrch těchto materiálů. Akustický odpor (neboli akustická rezistance) pórovitého izolačního materiálu je určována odporem vůči průtoku vzduchu materiálem. Pro danou hodnotu akustické reaktance existuje optimální hodnota akustického odporu, při které se dosahuje nejvyšší zvukové pohltivosti. Protože reaktance pórovitého izolačního materiálu je určována hlavně tloušťkou vrstvy, je nastavení akustického odporu neefektivnějším způsobem regulace zvukové pohltivých vlastností pórovitých materiálů. Toto lze ovlivnit např. snížením průměrné velikosti pórů (tj. zvýšením objemové hustoty materiálu), zvýšením obsahu pojiva, různou perforací apod. Nevýhodou tohoto přístupu je nárůst materiálových nákladů, a tím i prodejní ceny finálního produktu.

2.1. V y z a ř o v á n í z v u k u

Akustický výkon vyzařený povrchem kmitající desky plochy S lze vyjádřit vztahem²:

$$P = v^2 \rho_0 c_0 S \cdot s \quad (4)$$

kde v je efektivní rychlost kmitání desky, ρ_0 – hustota prostředí, do něhož je zvuk vyzařován, c_0 – rychlost šíření zvuku v tomto prostředí (v našem případě ve vzduchu), s je činitel vyzařování zvuku. Rozlišujeme vlnění podélné – longitudinální a vlnění příčné – transversální. Toto se pak dělí na vlnění torzní, ohybové a povrchové (Rayleighovo vlnění). U pístové kmitající desky je tento činitel $s = 1$ a nezávisí na materiálu desky. Obvykle však desky kmitají ohybově. Pro nekonečně velkou desku ohybově kmitající s frekvencí f pak z teorie vyzařování zvuku plyne

$$s = \sqrt{1 - f_{kr}/f} \quad (5)$$

kde

$$f_{kr} = c_0^2 / (1,8 \cdot c_L \cdot h) \quad (6)$$

je tzv. kritická frekvence. V rovnici (6) značí h tloušťku desky a c_L je rychlost podélných vln v desce. Ta je dána vztahem:

$$c_L = \sqrt{\frac{E^{**}}{\rho}} \quad (7)$$

v němž ρ je hustota materiálu desky a E^{**} je cylindrický modul pružnosti desky určený rovnicí:

$$E^{**} = \frac{E}{1 - \nu_p^2} \quad (8)$$

kde E je modul pružnosti v tahu materiálu desky a ν_p Poissonovo číslo daného materiálu.

Ze vztahu (5) vyplývá, že v oblasti frekvencí menších než je kritická frekvence nedochází k vyzařování zvuku (s je imaginární). Deska vyzařuje zvuk teprve nad kritickou frekvencí, při níž je vyzařování zvuku teoreticky nekonečně velké. V případě konečných rozměrů však deska vyzařuje i v podkritické oblasti frekvencí, ale podstatně méně než nad kritickou frekvencí. To tedy znamená, že je výhodné z důvodu maximálního tlumení navrhnout takový materiál desky, aby její kritická frekvence ležela nad budící frekvencí při požadované tloušťce desky.

2.2. V z d u c h o v á n e p r ů z v u c n o s t

Schopnost dělicího prvku bránit přenosu zvuku šířícího se vzduchem se nazývá vzduchová neprůzvučnost a její velikost se vyjadřuje stupněm vzduchové neprůzvučnosti

$$R = 10 \log \frac{P_d}{P_{pr}} \quad (9)$$

kde P_d značí dopadající akustický výkon a P_{pr} akustický výkon prošlý dělicím prvkem. U jednoduchých dělicích prvků dochází v důsledku koincidence k poklesu vzduchové neprůzvučnosti ve frekvenční oblasti nad kritickou frekvencí, přičemž tento pokles je nejvýraznější při kritické frekvenci. Z toho je zřejmé, že jak z hlediska vyzařování zvuku, tak i z hlediska vzduchové neprůzvučnosti je žádoucí, aby kritická frekvence ležela mimo oblast budící frekvence a pokud možno co nejvýše nad ní.

3. Z á k l a d n í k o n s t r u k č n í t y p y z v u k o v ě a v i b r a č n ě p o h l t í v ý c h m a t e r i á l ů

Na následujícím schématu 1 jsou znázorněny nejběžnější typy konstrukce zvukové a vibračně pohltivých systémů. Jedná se zejména o různé typy laminátů^{3,4} (a), kompozitních vlasových smyčkových materiálů⁵ (b), skeletových deskových systémů⁶ (c), planárně panelových systémů s proměnnou tloušťkou vzduchové mezery⁷ (d), volně sypaných částicových systémů^{2,8-11} (e), sendvičově pěnových kompozitních systémů¹² (f), sendvičových kompozitů s tvarovanými kanálky (drážkami) nebo bez nich (g), síťovaných polymerních systémů¹⁴ (h) a protihlukových bloků¹⁵⁻²¹.

3.1. Z v u k o v ě a b s o r p č n í l a m i n á t y

Tyto systémy se vyznačují vysokou účinností útlumu při poměrně malé tloušťce vrstvy. Proto mají nejširší využití zejména v oblasti stavebnictví (vnitřní interiérové úpravy) a dopravy. Lamináty se skládají z pórovitého izolačního substrátu (např. z polymerní vláknové matrice nebo z plátu pěnové polymerní gumy) a povrchové tenké vrstvy s vysokým odpo-

rem vůči průtoku vzduchu³ (viz schéma 1). Zmíněná povrchová vrstva, která plní jednak zvukově izolační, jednak estetickou funkci, je přilepena k povrchu pórovitého substrátu pro zvýšení jeho zvukově pohltivých charakteristik. Při tomto konstrukčním uspořádání je odpor vůči průtoku vzduchu větší než případě samotného substrátu, a laminát má tak vyšší hodnotu koeficientu zvukové pohltivosti a navíc i lepší mechanické a pevnostní charakteristiky.

Jako příklad lze uvést patent Hainese a Flayea³, kde je jako povrchový materiál regulující průtok vzduchu systémem po-

užit papír, textilie, nebo perforovaný polymerní film. Jako pórovitá matrice byly použity systémy na bázi skleněných nebo polymerních vláken, případně polymerních pěnových materiálů.

Pomocí vztahů (10)–(12) je možné určit akustický odpor a akustickou reaktanci pro obě komponenty, a tak rozhodnout, zda povrchová vrstva (folie) může zvýšit akustické izolační parametry (odpor vůči průtoku vzduchu) nad mez, nutnou pro dosažení žádoucích hodnot koeficientu zvukové pohltivosti. Pro samotný substrát platí

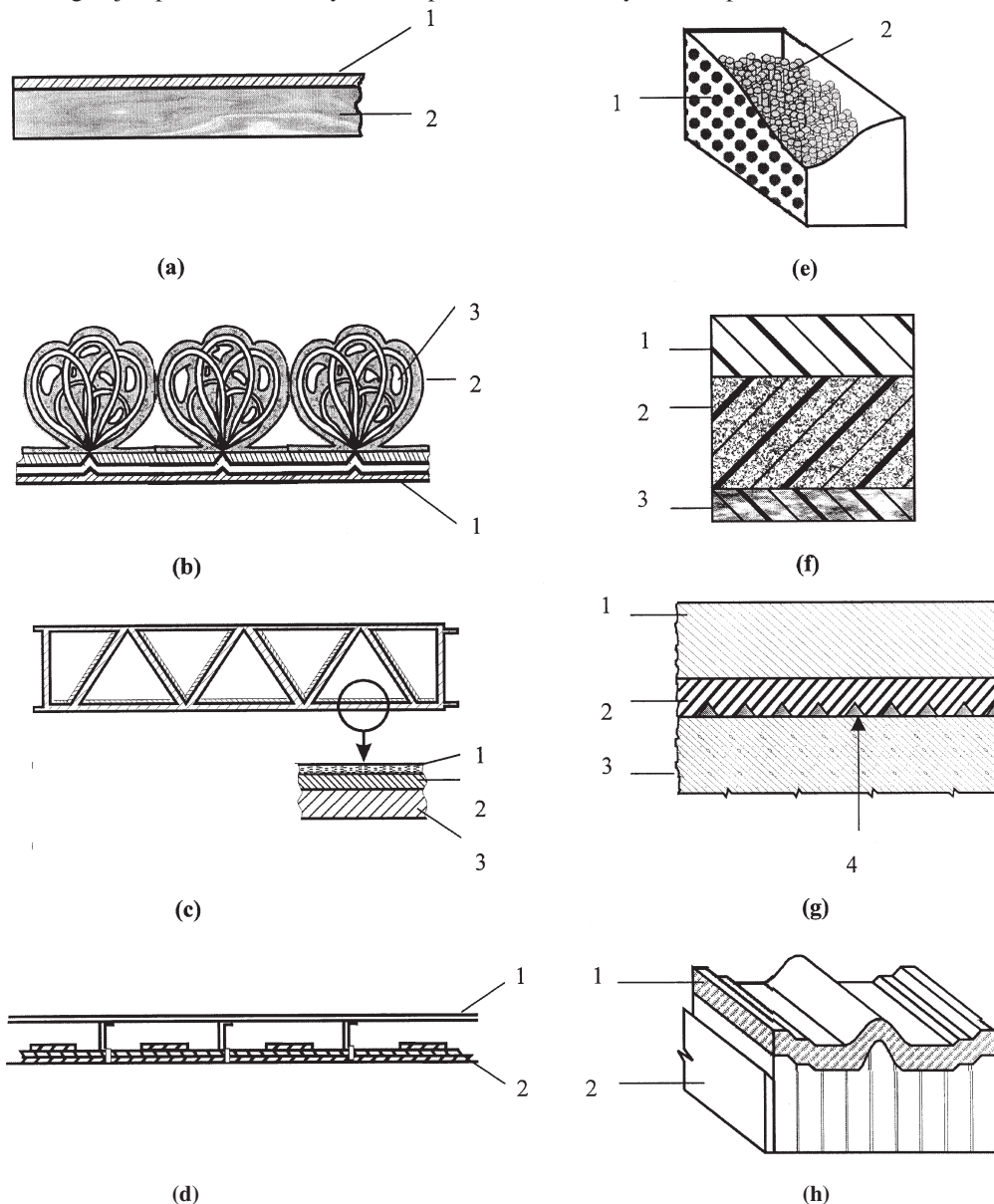


Schéma 1. Nejběžnější typy konstrukce zvukové a vibračně pohltivých systémů. (a) lamináty: 1 – perforovaný polymerní film, 2 – vata ze skleněných vláken; (b) kompozitní vlasové smyčkové materiály: 1 – podkladový materiál (např. PVC), 2 – polymerní vlákno pokryté elastomerem, 3 – prázdný prostor; (c) skeletové deskové systémy: 1 – povrchový polymerní film, 2 – pryžová vrstva tlumící vibrace, 3 – kovová nosná konstrukce; (d) planárně panelové systémy s proměnnou tloušťkou vzduchové mezery: 1 – betonový panel, 2 – sádrokarton; (e) volně sypané částicové systémy: 1 – polymerní fólie, 2 – drcená recyklovaná pryž; (f) sendvičové pěnové kompozitní systémy: 1 – podkladový materiál, 2 – pěnový polymerní systém plněný např. síranem barnatým, 3 – povrchový tkaný materiál na bázi syntetických vláken; (g) sendvičové kompozity s tvarovanými kanálky (drážkami) i bez nich: 1 – povrchová podlahová vrstva (např. parkety), 2 – tlumící materiál na bázi recyklované pryže, 3 – betonová podkladová vrstva, 4 – tvarované kanálky; (h) síťované polymerní systémy: 1 – lisovaná tlumící vrstva, 2 – podkladový materiál

$$r_s = 3180 \cdot t \cdot \rho_s^{1,53} / d^2 \quad (10)$$

kde r_s je odpor substrátu vůči průtoku vzduchu (rozměr N.s.m⁻⁴), ρ_s je hustota skleněného vlákna (pórovitého substrátu) (kg.m⁻³), d střední průměr skleněných vláken (μm), t je tloušťka izolační vrstvy (m). Akustický odpor laminátu ($r_L / \rho c$) se vypočítá dle vztahu (11):

$$r_L / \rho c = (r_s + r_f) / \rho c \quad (11)$$

kde $r_f / \rho c$ je akustický odpor povrchové vrstvy. Akustickou reaktanci ($x / \rho c$) můžeme vypočítat podle vztahu:

$$x / \rho c = \frac{-1}{\tan(2fL/c)} \quad (12)$$

kde f je frekvence (Hz), L vzdálenost mezi povrchovou vrstvou pórovitého substrátu a zadní neprůzvučnou stěnou (m), c rychlost zvuku (m.s⁻¹). Pro danou frekvenci platí mezi reálnou hodnotou odporu pro zvukově pohltivý laminát ($r_L / \rho c$) a akustickou reaktancí vztah:

$$r_L / \rho c = \sqrt{(1 + (x / \rho c))^2} \quad (13)$$

V dalším patentu⁴ bylo při výrobě zvukově izolačního laminátu použito pojivo na bázi epoxidové pryskyřice modifikované polybutadienovým elastomerem obsahujícím nejméně 90 mol.% 1,2-vázaných monomerních jednotek. Jako vláknová složka laminátu byla použita tkanina na bázi polyethylenových vláken. Tímto způsobem připravený laminát pak vykazoval lepší zvukově izolační vlastnosti při pokojové teplotě než v případě použití 1,4-vázaného elastomeru.

3.2. Kompozitní vlasové smyčkové materiály

Tyto materiály mají zvýšený odpor vůči smykovému námáhání a dvojitou funkci: tlumí rázy a zároveň zvukově izolují. Do prostoru mezi vlákna poměrně tvrdých polymerů⁵ (viz schéma 1(b)) se aplikuje kapalný polymerní elastomer takovým způsobem, aby se v matrici vláken vytvořily makroskopické dutiny za současného vzniku kompaktní povrchové vrstvy. Tímto způsobem se dosahuje synergického účinku hookovské elasticity pružných vláken tkaniny a viskoelasticity a plasticity elastomeru. Jako elastomer může být použita termoplastická kapalina, např. latex (přírodní, neoprenový, akrylonitril-butadienový, methylmetakryl-butadienový, některé z polyakrylátových), emulze (polyvinylacetátová, ethylen-vinylacetátová, polyesterová, polyuretanová, vinylová), polyvinylchlorid, polypropylen, nebo bitumenový základ. V této oblasti je možné využít kapalného kaučuku¹¹ (Kaučuk, a.s.). Jako pevná vlákna mohou být využity organické materiály, jako např. dřevěná vlákna, která mohou vytvořit trojrozměrnou propletenou strukturu. V technologickém reglementu se podle použitých komponent dále využívají různé typy zúšlechťovacích a stabilizačních přípravků (disperzanty, stabilizátory, antioxidanty a pod.).

3.3. Skeletové deskové systémy

Podpěrná trámová konstrukce je tvořena dvěma hliníkovými deskami (viz schéma 1(c)) a křížovými hliníkovými podpěrnými nosníky. Vibračně pohltivá vrstva se deformuje v kolmém směru na vnitřní plochy podpěrných nosníků a vnitřní stranu spodní deskové podpěry. Tímto uspořádáním se dosahuje tlumení proměnou vibračního pohybu na tepelnou energii. Při vlastní výrobě je nutno dosáhnout maximální adheze antivibračního materiálu k povrchu hliníkové konstrukce, s co možná nejvyšším obsahem vzduchových bublin⁶. Tímto způsobem je možné vyrobit plošné segmenty, které účinně tlumí vibrace a jsou vhodné pro konstrukci různých dopravních prostředků, zejména velmi rychlých vlaků. U vzorku je uváděno snížení hladiny hluku o 19–33 dB při frekvencích nad 630 Hz. Při frekvencích pod 500 Hz má tento systém poměrně nízkou tlumící charakteristiku, a to jen 6 dB. Jako tlumícího materiálu bylo použito skleněné vaty lepené plastickým lepidlem (tzv. gumoasfaltem nebo speciálním syntetickým butylkaučukem roztaveným při 130–150 °C).

3.4. Planární panelové systémy s proměnnou tloušťkou vzduchové mezery

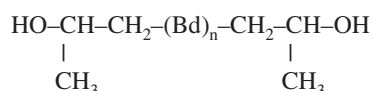
Konstrukční schéma těchto typů protihlukových zábran je znázorněno na schématu 1(d). Z obrázku je patrné, že tyto panely se skládají z vodících paralelních kovových (plastových) lišt, pokrytých jednou nebo více vrstvami materiálu (např. dřevotřískou, dřevem, sklem, styropěnou, sádkokartone apod.), čímž se dosahuje proměnné tloušťky vzduchové vrstvy. Pro tyto materiály jsou charakteristiky zvukové neprůzvučnosti důležitější než charakteristiky zvukové pohltivosti. Změnou tloušťky vzduchové mezery je možné tento systém patřičně naladit na požadované frekvenční hodnoty maxima zvukové pohltivosti. Bylo zjištěno, že příčný přenos zvuku panelem je způsoben zejména následujícími dvěma přenosovými mechanismy. Zaprvé, interakcí mezi panelem a uzavřeným objemem vzduchu v mezeře, tzv. „náhodným efektem“. Zadruhé, vlastní rezonancí panelu (a s ní spojené harmonické vibrace), která vede ke vzniku řady kritických frekvencí ve vyšším frekvenčním pásmu. Tímto způsobem je možné rozložit příslušné zvukové spektrum na několik kritických frekvencí o celkově nižší hodnotě zvukové energie než v případě jednoho intenzivního maxima⁷. Pro dosažení tohoto efektu se kromě tloušťky vzduchové mezery může měnit i tloušťka vlastního panelu. To se provádí již při konstrukci tak, že vlastní panel je složen z několika vrstev tvořících laminátovou konstrukci a majících v řezu trojúhelníkovou strukturu (např. pyramidální).

3.5. Volně sypané částicové systémy

Na výrobu těchto hlukově pohltivých systémů je možno použít např. drcenou recyklovanou pryž o různé zrnitosti, získanou z ojetých pneumatik⁸ (viz schéma 1(e)). Uváděné hodnoty koeficientu zvukové pohltivosti se v závislosti na tloušťce vrstvy (25–90 mm) pohybují v rozmezí 0,7–0,95, s maximy při frekvencích 1100, 2000 a 3000 Hz.

Do této kategorie je možno zahrnout systém na bázi drcené pryže (z recyklovaných ojetých pneumatik^{9,10}), jejíž částice

jsou spojeny vhodným pojivem¹¹. U těchto systémů se dosahuje zlepšení charakteristik zvukové pohltivosti tvarováním přední plochy pomocí řady děr ve tvaru rotačního elipsoidu. Jako nejhodnější pojivové systémy se jeví takové polybutadieny, které jsou v důsledku své nízké molární hmotnosti kapalné, a které v různých modifikacích vyrábí např. Kaučuk group, a.s., pod obchodním názvem Krasol, jakož i polyurethany od těchto polybutadienů odvozené. Receptura přípravy kapalných polybutadienů (založená na aniontové polymerizaci) umožňuje variabilitu číselných průměrů molárních hmotností v rozmezí 1900 až 4000 g.mol⁻¹ (cit.²²). Např. makromolekulu skupinami OH končeného (tzv. hydroxyl-telechelického) polybutadienu (Krasolu LBH) lze schematicky znázornit takto:



kde Bd je butadienová monomerní jednotka, která je v řetězci přítomna ve třech izomerních formách (1,4-*cis*, 1,4-*trans* a 1,2). Reakcí koncových skupin OH tohoto polymeru s různými diisokyanáty (v přítomnosti nízkomolekulárních dvoj- resp. vícefunkčních alkoholů nebo aminů, tj. extenderů, resp. síťovadel) vzniká polyurethan²³.

Z výše uvedeného je patrné, že u těchto materiálů lze měnit velký počet molekulárních parametrů, což umožňuje selektivně naladit příslušný tlumicí systém podle požadované kritické frekvence první rezonance (např. vhodnou volbou diisokyanátu, extenderu, a prostřednictvím síťovadla též volbou hustoty polymerní sítě). Hodnota vzduchové neprůzvučnosti *R* (rovnice (9)) se pohybuje u těchto materiálů v rozmezí 43 až 46 dB (cit.²⁴) (při tloušťce vrstvy 40 mm), kritická frekvence první rezonance v oblasti 2 kHz (cit.²⁵).

Podobně jako v předcházejících příkladech kompozitů z partikulární pryže, i v těchto aplikacích je možné využít krátkovláknových polymerních kompozitů². Dosažené výsledky umožňují i predikci jejich akustických vlastností – schopnosti vyzářovat zvuk a vzduchové neprůzvučnosti. Tato problematika je aktuální v souvislosti s materiály vzniklými mechanickou recyklací vláknových polymerních kompozitů, při níž dochází ke zkracování vláken a tím i ke změnám v jejich mechanickém chování. V důsledku destrukce výztuže při recyklaci je již obtížné takovéto recykláty použít na dílce s vysokými nároky na pevnost. Lze je však aplikovat na méně namáhané části strojů či interiérů budov, jako jsou odkládací plochy, kryty pohybujících se mechanismů, kanály pro vzduchotechniku aj., které kmitají a tím vydávají hluk. Rovněž je možno využít recyklátů jako dělicích prvků (stěny, protihlukové zástěny, kryty motorů a pod.), kde hlavní užitečnou vlastností je vzduchová neprůzvučnost. Obě uvedené akustické vlastnosti – vyzářování zvuku a vzduchová neprůzvučnost – spolu úzce souvisejí a jsou určeny především mechanickými vlastnostmi materiálů.

3.6. Sendvičové pěnové kompozitní systémy

Schematicky jsou tyto materiály znázorněny na schématu 1(f). Základními konstrukčními prvky jsou: pěnový polymerní systém plněný partikulárním materiálem pohlcujícím zvuk, tenká bariérová vrstva. Jako podkladový materiál může (ale

nemusí) být použit takový materiál (např. na bázi skleněných vláken, nylonu a pod.), který jednak tlumí zvuk, jednak má např. samozhášející nebo teplovzdorné vlastnosti¹². Jako bariérová vrstva byl použit tuhý PVC plněný síranem barnatým o koncentraci 60 %. Jako alternativní materiály pro polymerní bariéru byly použity polyestery, polyethery, polyurethany, polyamidy či polyethyleny. Vlastní polymerní pěnová matrice byla tvořena různými polyurethany, silikony, polyestery, polyethery, polyamidy nebo polyethylenem a také plněna síranem barnatým společně s dutými skleněnými mikrokuličkami. Pro zlepšení užitečných optických vlastností mohou být obě vrstvy kompozitu přibarveny přidávkem různých pigmentů. Důležitou vlastností této pěnové matrice je struktura její vnitřní porozity, vyznačující se systémem otevřených a vzájemně propojených porů.

3.7. Sendvičové kompozity s tvarovanými kanálky (drážkami) nebo bez nich

Tento materiál se využívá zejména na tlumení vibrací a kročejového hluku. Je vyroben z recyklované pryže z ojetých pneumatik. Skládá se z ploché vrchní vrstvy a tvarované spodní vrstvy do formy kanálek V- a U-tvaru, které jsou směřovány napříč plochou pod úhlem 45°. Tímto způsobem je snížena kontaktní plocha podkladového potěru (viz schéma 1(g)) s povrchovým potěrem v rozmezí 20–65 % vůči povrchové vrstvě podlahy¹³. Granulometrie použitých částic recyklované gumy poskytla maximální hodnotu průměru částic 2,5 mm. Pryžové částice byly dále tepelně a tlakově hněteny a formovány do výsledného bloku.

3.8. Síťované polymerní systémy

Výroba těchto systémů je založena na lisování vibračně a zvukově izolačních materiálů přímo do podoby tvarovek konkrétní části zařízení. Postup výroby spočívá v iniciaci termického síťování kapalné polymerní matrice přímo ve tvarovacím zařízení. Homogenní síťovací či polymerizační reakce se dosahuje použitím vstříkovaní horkého roztoku polymeru (monomeru) do formy pomocí suché přehřáté tlakové páry¹⁴. Největší využití těchto systémů je v automobilovém průmyslu. Jako síťovací systém byl použit fenolový novolak, fenol/formaldehydové, nebo čpavek/formaldehydové živice. Jako doplňky zvyšující užitečné vlastnosti mohou být přidány tkané nebo netkané látky přímo do lisované součástky.

3.9. Protihlukové bloky

Konstrukce těchto systémů je založena na využití geometrie tělesa sestaveného z neprůzvučného materiálu (např. betonu a pod.)¹⁵ a lze ji modifikovat přidávkou zvuk pohlcujícího částicového volně sypaného materiálu do volného objemu bloku¹⁶⁻²¹.

4. Závěr

Na základě výše uvedeného přehledu lze konstatovat, že pro konstrukci široké škály zvukově a vibračně izolačních systémů je výhodné využít odpadních polymerních materiálů

(zejména drčené pryže a plastů). To je však možné jenom po vhodné mechanické úpravě a separaci podle druhu, velikosti a tvaru částic recyklátů. Pro přípravu vlastního vibračně nebo zvukově izolačního systému je důležitý výběr vhodného pojiva. Vhodným systémem je např. polybutadien/polyurethanové pojivo odvozené od kapalného kaučuku Krasol LBH. Zvláštní pozornost při konstrukci a vlastní výrobě se musí věnovat také povrchové předúpravě drtě vzhledem ke zvýšení vzájemné adheze pojivo–částice.

Tato práce byla uskutečněna s podporou společnosti Kaučuk, a.s., Kralupy nad Vltavou (členem skupiny Unipetrol group) v rámci smlouvy o dílo ZČ 98-19 a výzkumného záměru FT Zlín č. CZT90015/99. Zvláštní poděkování patří dr. J. Poďěšovi (ÚMCH AV ČR) za pečlivou redakční úpravu textu.

LITERATURA

1. Smetana, C., v knize: *Hluk a vibrace. Měření a hodnocení* (Smetana C., ed.), kap. 1. Sdělovací technika, Praha 1998.
2. Vašut S., Šuba O.: *Plasty Kauc.* 35, 262 (1998).
3. Haines J. C., Fay R. M. (Schuller International, Inc., Denver, USA): WO 97/04445.
4. Tokura K., Uryu M., Matsuura S. (Sony Corporation, Tokyo, Japan): US 5663220.
5. Kishi S. (Reittec Co., Ltd., Yao, Japan): US 5654065.
6. Hatayama T., Yamagiwa I., Maekawa K., Iwai K., Tanaka T., Taniuchi M., Sanuki R., Ueki I., Sasaki T., Sugimoto A., Fujisawa K. (Kabushiki Kaisha Kobe Seiko Sho, Kobe, Japan): US 5690035.
7. Mackenzie R. K. (Edinburgh Acoustical Company, Ltd., Edinburg, UK): WO 97/33051.
8. Pfrezschner S. J., Simon H. F., Moreno A. A., Colina T. C. (Consejo Superior Investigaciones Cientificas, Madrid, Spain): WO 97/24492.
9. Fleischhacker G.: WO 97/47817.
10. Porter A. G.: WO 97/44220.
11. Medlín J.: CZ 9601268.
12. Veiga M. J., Satin R. J. (Bradford Industries, Inc., Lowell, USA): US 5622662.
13. Ducharme R. (Royal Mat International, Inc., Beauce, Canada): WO 98/21027.
14. Cavalloni C., La Grotteria A., Freyer H. (Matec Holding, A. G., Kunsnacht, Switzerland): US 5696201.
15. Vondross K. L. (Best Block Company, Butler, USA): US 5700983.
16. Briš P., Vašut S., Fišer V.: *J. Building Acoustics* 4, 223 (1997).
17. Vašut S., Briš P., Mikulica A.: *Užitný vzor*, CZ 9500321.
18. Vašut S., Briš P., Lapčík Jr. L., Fišer V., Cetkovský V.: *Collected Papers of the R '99 World Congress, Recovery, Recycling, Re-integration* (Barrage A., Edelman X., ed.), III, str. 509. Ženeva, 2.–5. únor 1999. EMPA, Ženeva 1999.
19. Vašut S., Briš P., Ponížil P., Hrabí L.: *Inter Noise 98 – The 1998 International Congress on Noise Control Engineering* (Marshall H., ed.), str. 180. Christchurch, 15.–18. listopad 1998. International Institute of Noise Control Engineering, Christchurch 1998.
20. Lapčík Jr. L., Briš P., Vašut S., Fišer V., Cetkovský V., Lapčík L.: *12. Internationales Symposium SWISSBONDING 98* (Schindel-Bidineli E. M., ed.), P06. Rapperswill am Zürichsee, 12.–14. květen 1998. Print Service Mühlheim, Rapperswill am Zürichsee 1998.
21. Lapčík Jr. L., Vašut S., Briš P., Fišer V.: *ICCE/5 Fifth International Conference on Composites Engineering* (Hui D., ed.), str. 515. Las Vegas, 5.–11. červenec 1998. International Community for Composites Engineering and College of Engineering, University of New Orleans, Las Vegas 1998.
22. Pulda J., Reissová A.: *Chem. Listy* 93, 445 (1999).
23. Pytela J.: *Chem. Listy* 93, 441 (1999).
24. Lapčík Jr. L., Cetkovský V., Vašut S., Briš P., Lapčíková B.: *J. Polym. Mater.*, v tisku.
25. Swift M. J., Briš P., Horoshenkov K. V.: *Appl. Acoustics* 57, 203 (1999).

E. Lapčík, Jr., V. Cetkovský, B. Lapčíková, and S. Vašut (*Institute of Physics and Material Engineering, Faculty of Technology, Technical University of Brno, Zlín*): **Materials for Noise and Vibration Attenuation**

This paper reviews construction principles and various materials used for production of noise and vibration dumping systems important in technical practice. Relations between material characteristics and end-use dumping properties are discussed. Basic physical parameters and their definitions are summarized. Suitable polyurethane/polybutadiene binder systems based on the liquid rubber Krasol™ are presented.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

SPOJENÍ MEMBRÁNOVÉHO VSTUPU S HMOTNOSTNÍM SPEKTROMETREM (MIMS)

PAVEL BROŽ, EVA DRBÁLKOVÁ,
PAVEL JANDERKA, PAVEL SITKO a JAN VŘEŠTÁL

Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Došlo dne 3.II.1999

Klíčová slova: membránový vstup, hmotnostní spektrometrie, separace, analýza, kinetika

1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie se v posledních dvou desetiletích významně prosazuje v řadě odvětví chemie jako selektivní a citlivá detekční metoda. Protože pro analýzu hmotnostním spektrometrem musí být vzorek ionizován, byla navržena a jsou používána mnohá spojení (interface), která umožňují komunikaci hmotnostního spektrometru zejména s výstupy ze zařízení, realizujících separační techniky na plynném nebo kapalném vzorku (Gas chromatography mass spectrometry – GCMS, Liquid chromatography mass spectrometry – LCMS, Capillary electrophoresis mass spectrometry – CEMS aj.). Spolupráce separačních technik s hmotnostním spektrometrem je výhodná zejména proto, že následkem fragmentace iontů v průběhu ionizace vzorku jsou hmotnostní spektra často velmi bohatá na druhy iontů. Separace významně usnadní interpretaci spekter a naopak hmotnostní detektor umožňuje získat podrobnější informaci o separovaných látkách. Spojení těchto technik jsou možná zejména proto, že vakuová technika již umožňuje tolerovat relativně velké přítoky plynů resp. zplyňovaných kapalin do iontového zdroje hmotnostního spektrometru.

V případech, kdy směs neobsahuje příliš mnoho látek (jedná se např. o sledování složek systému v průběhu reakce), je výhodné studovat změny koncentrace látek přímo v roztoku. Sledování koncentrace reagujících látek *in situ* je významné též v průmyslových aplikacích nebo při sledování koncentrace látek v životním prostředí.

Membránový vstup (Membrane introduction mass spectrometry – MIMS) se ukázal pro tyto účely jako velmi vhodná metoda. Obecně je MIMS považována za metodu pro analýzu velmi nízkých koncentrací těkavých organických látek přímo v kapalinách (např. ve vodě nebo organických rozpouštědlech), v plynech (např. ve vzduchu) nebo v pevných látkách (např. v půdách) bez úpravy vzorku¹. Spočívá v použití polopropustné membrány, která působí jako chemický separátor (síto) a umožňuje molekulám analytu selektivně proniknout do hmotnostního spektrometru, kde jsou ionizovány, hmotnostně analyzovány a detegovány. Byla navržena celá řada

membránových spojení s hmotnostním spektrometrem, jejichž přehled lze nalézt v literatuře²⁻⁸. Pro studium reakcí v plynné fázi navrhli takové zařízení již v r. 1963 Hoch a Hok⁹ pro studium fotosyntézy a respirace, v roce 1992 použili Schmidt a Vielstich¹⁰ polytetrafluorethylenové (teflonové) membrány podložené ocelovou fritou ke studiu kinetiky tvorby CO₂, který vzniká v roztoku v průběhu oscilující Belousovovy-Žabotinského reakce, v poslední době používal Lloyd¹¹ a Bohátka^{12,13} se spolupracovníky membrány ze silikonové pryže k analýze plynů, které se tvoří v průběhu biologických procesů v biologických systémech a jsou známa též komerční zařízení umožňující analýzu plynů v terénu touto metodou (např. mobilní hmotnostní spektrometr EM 640/IMPACTTM firmy Bruker) i analýzy kapalných vzorků (Direct insertion membrane probe – DIMP, MIMS Technology Inc., Palm Bay, FL). V literatuře lze nalézt další aplikace v analýze životního prostředí¹⁴⁻¹⁷ a biologii¹⁸⁻²¹. Přehledné práce o teorii a aplikacích MIMS lze nalézt např. v literatuře^{3,6,22-28}.

Pro studium reakcí v kapalně fázi je rozhodující správná funkce membrány, oddělující reakční nádobku od vakuového prostoru hmotnostního spektrometru a dostatečně výkonný vakuový systém. Membrána musí být selektivní vzhledem k analytu a dostatečně chemicky a fyzikálně stabilní. Bližší popis průchodu látky membránou spojeného s difúzním procesem lze nalézt např. v práci²⁹. Množství přenesené látky ve stacionárním stavu je úměrné rozdílu parciálního tlaku látky v roztoku a tlaku na vakuové straně membrány. Pro tok molekul látky membránou lze ve stacionárním stavu použít Fickův zákon difúze:

$$F = \frac{A}{L} \cdot D \cdot C \cdot \frac{s_m}{s_v} \cdot 10^{-3} \quad (1)$$

kde F je proud (mol.s⁻¹), A plocha membrány (cm²), L tloušťka membrány (cm), D koeficient difúze (cm².s⁻¹), C koncentrace analytu v roztoku (mol.dm⁻³), s_m a s_v je rozpustnost v membráně a ve vodě (mol.dm⁻³).

Protože za zvolených pracovních podmínek je koncentrační gradient mezi oběma povrchy membrány hlavní hnací silou průchodu látky membránou, lze touto metodou provádět kvantitativní stanovení analytu.

Pokud jsou plyny nebo sledované látky rozpustné v kapalině, pak je třeba membránu vhodně zvolit tak, aby byla selektivním vodičem pro sledované látky, a naopak aby kapalina (rozpuštědlo) nebyla do vakuového prostoru hmotnostního spektrometru propouštěna³⁰⁻³⁴.

Pozornost se obrací nyní zejména k analýze organických látek ve vodném prostředí pro její význam v životním prostředí jednak s použitím elektrochemických metod (DEMS – diferenční elektrochemická hmotnostní spektrometrie)³⁵⁻³⁷, jednak pro analytické cíle³⁸. V poslední jmenované práci³⁸ byla stanovena citlivost metody pro některé organické látky ve vodných roztocích s užitím methylsilikonové resp. methylpolysiloxanové membrány přímo a po acetylaci vzorků. V práci téhož kolektivu³⁹ bylo studováno chování řady dalších orga-

nických látek ve vodných roztocích metodou purge-and-membrane (PAM) hmotnostní spektrometrie a v práci¹ bylo pro zvýšení citlivosti metody použito ohřevu membrány CO₂ laserem.

Vhodnost membrán pro použití k separaci částic z roztoku závisí zejména na polárnosti a polarizovatelnosti molekul, které tvoří roztok (rozpuštědlo a rozpuštěná látka) a na celé řadě instrumentálních faktorů (tloušťka a materiál membrány, velikost pórů v membráně a jejich četnost, teplota roztoku a přítomnost rušících látek v něm).

Polárnost membrány a propouštěné látky jsou rozhodující pro hodnotu difuzního koeficientu, který je kvantitativní fenomenologickou mírou pro množství, které projde membránou za jednotku času. Ukázalo se, že polytetrafluorethylenová i polymethylsilikonová membrána propouští dobře nepolární nebo málo polární molekuly organických látek, obsažených ve vodných roztocích, podobně jako plyny, a zadržuje vodu^{35,10,39}.

Cílem této práce bylo ověřit a ilustrovat funkci chemického reaktoru pro sledování chemických reakcí hmotnostním spektrometrem *in situ* a prozkoumat vlastnosti některých komerčně dostupných membrán pro některé organické látky ve vodných roztocích z hlediska jejich použití v kinetických studiích.

2. Experimentální část

Požadavky na vlastnosti membrány jako interface mezi vodným roztokem (vnější tlak 1 bar) a vakuem (10⁻⁷ bar) jsou poněkud konfliktní³⁴. Membrána musí být hydrofobní, aby zadržela vodu, a dostatečně hustá, aby udržela dostatečné vakuum v ionizační komůrce (min. 10⁻⁷ bar). Na druhé straně se však požaduje, aby membrána měla dostatečnou průchodnost pro sledované molekuly, aby byla dosažena nízká mez detekce.

Podmínka pro dostatečnou porozitu (horní mez poloměru pórů r) membrány plyne z kapilární rovnice

$$r.p_0 < -2.\sigma.\cos \Theta, \quad (2)$$

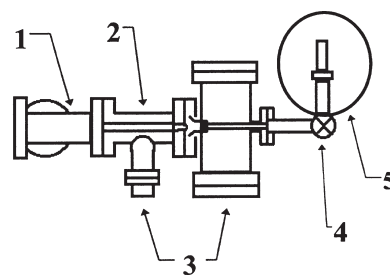
kde σ je povrchové napětí vody, Θ je kontaktní úhel vody s membránou a p_0 je atmosférický tlak. Dosazením číselných hodnot $\Theta = 126^\circ$ (cit.⁴⁰) a $\sigma = 72.10^{-5} \text{ N.cm}^{-1}$ (cit.⁴¹) dostaneme $r < 0,8 \mu\text{m}$.

Pro měření byly zvoleny tyto membrány:

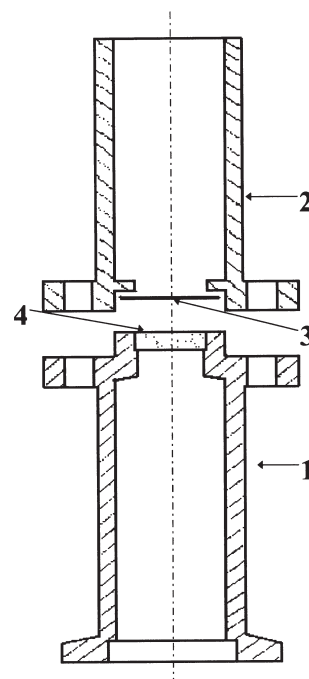
- Materiál PTFE (GoreTex, No. S10570), velikost pórů 0,02 μm , tloušťka 75 μm , porozita 50 %,
- materiál PTFE (na podložce PES, Schleicher & Schuel, TE30), velikost pórů 0,02 μm ,
- materiál PTFE (na podložce PES, Schleicher & Schuel, TE35), velikost pórů 0,2 μm ,
- materiál PVDF (Schleicher & Schuel, WESTRAN), velikost pórů 0,2 μm (PTFE – polytetrafluorethylen, PVDF – polyvinylidendifluorid, PES – polyester).

Aktivní plocha membrány byla ve všech případech 0,8 cm², což je dáno plochou frity, podložené pod folií, pro zajištění její mechanické stability proti vakuu. Jako fritu byla použita porézní hmota Siper^m R14 (Tridelta Siper^m GmbH, Dortmund, SRN), se střední velikostí pórů o průměru 14 μm a porozitou 26 % (průměr frity 10 mm).

Konstrukce interface k hmotnostnímu spektrometru je na obr. 1a, detail komůrky s fritou na obr. 1b. Komůrka byla



Obr. 1a. Celkové schéma interface MIMS; 1 – kvadrupólový analyzátor, 2 – iontový zdroj, 3 – přívody k vakuovým pumpám, 4 – spojovací ventil, 5 – reaktor (viz obr.1b)



Obr. 1b. Detail reaktoru interface MIMS; 1 – spojovací podstavec, 2 – teflonový reaktor, 3 – teflonová folie, 4 – ocelová fritu

zhotovena z materiálu PTFE, její vnitřní průměr činil 15 mm, vnější 26 mm a výška 70 mm. Vakuové spojení komůrky s iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru bylo zajištěno přes ručně ovládaný vakuový ventil (Balzers, typ EVA 016 HX) a vstupní ventil hmotnostního spektrometru (ventil sondy pro přímý vstup vzorku) přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru vedením vlastní konstrukce. K měření bylo použito kvadrupólového hmotnostního spektrometru TRIO 1000 (Finnigan MAT, Fisons Instruments, San José, California USA) s rozsahem hmot $m/z = 2-1000$, s násobičem iontů jako detektorem, vybaveným softwarem MASSLAB pro sběr a zpracování naměřených dat.

Naměřený iontový proud I_i částice i v hmotnostním spektrometru je úměrný jejímu parciálnímu tlaku p_i v iontovém zdroji a je funkcí řady veličin, závislých mj. též na nastavení přístroje. Bližší popis lze nalézt např. v práci⁴². Parciální tlak p_i a iontový proud I_i dané složky systému je vzhledem k per-vaporaci membránou úměrný její koncentraci v roztoku. Kvantitativní měření hmotnostním spektrometrem je relativní měření. Kalibrace a měření se tedy provádějí při stejném

nastavení přístroje (C, T, E, $\rho_i(E)$, η_i). Je proto nezbytné vést experiment časově tak, aby nedošlo k výrazným změnám v průběhu měření, případně provádět korekce na vnitřní standard. Toto omezení bylo při dalším experimentálním postupu respektováno.

3. Pracovní postup a výsledky

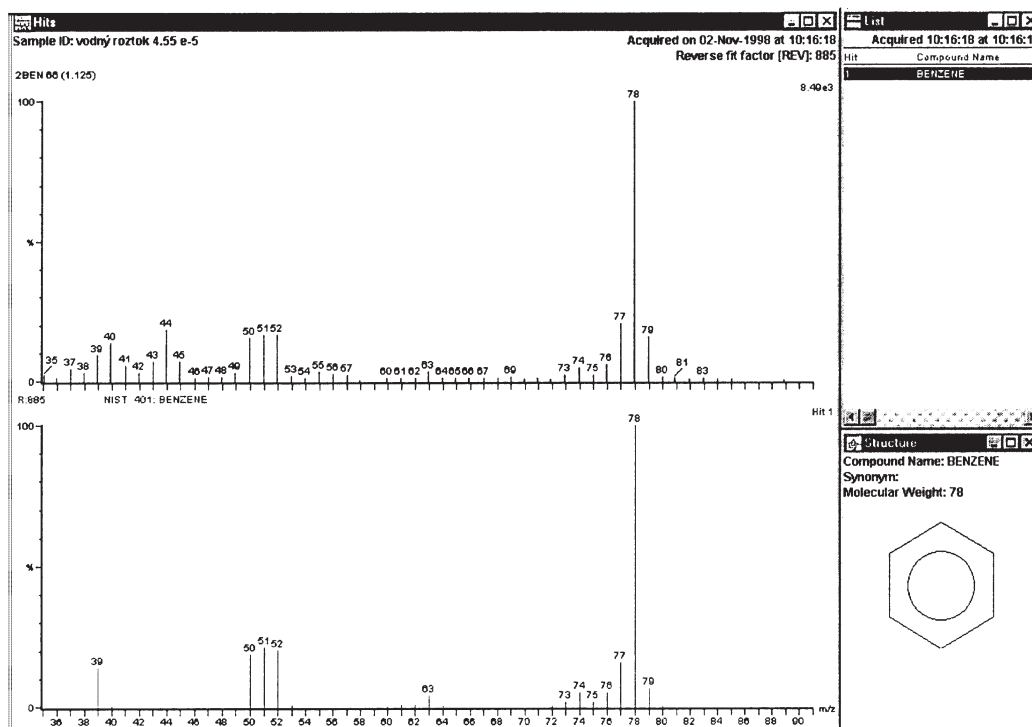
Analýzy organických látek ve vodném roztoku (voda z Millipore systému – Milli-Q RG, Millipore Corp., Bedford, MA) byly prováděny v SIM (selected ion monitoring) módu práce hmotnostního spektrometru. Vhodné ionty pro sledování v SIM-módu byly vybrány z naměřeného spektra získaného s reaktorem, obsahujícím roztok organické látky ve vodě po odečtení pozadí, naměřeného s reaktorem bez sledované látky. Výsledky jsou pro jednotlivé látky uvedeny v tab. I. Přestože byla spektra získávána ionizací nárazem elektronů (EI+), pík na hmotě (M+1) (M značí molekulový pík) byl u benzenu i naftalenu vyšší, než by odpovídalo jeho zastoupení vypočtenému pro obsah uhlíku C^{13} v přirozené izotopické směsi. Jedná se o příspěvek chemické ionizace sledované látky přenosem náboje molekulami H_3O^+ , které vznikají ionizací par vody, které pronikly do iontového zdroje membránou. Příklad spektra benzenu, naměřeného po průchodu membránou z nasyceného vodného roztoku, po odečtení pozadí, je na obr. 2 (nahore). Pro srovnání je uvedeno také spektrum z knihovny spekter NIST (obr. 2 – dole). Z obrázku je zřejmý vliv prostředí na ionizaci molekul. Intenzita signálu, závislá na koncentraci organické látky v roztoku, byla měřena jako rozdíl intenzity iontového proudu pro zvo-

lenou hmotu před a po přidání stanovované látky do roztoku. Naměřená intenzita iontového proudu byla normována na okamžitou hodnotu iontového proudu páry vody jako standardu. Přidávky byly realizovány jednotlivě do odměřeného objemu vody ze zásobních roztoků látek a roztokem bylo intenzivně mícháno. Před každým měřením byla nádobka promývána vodou pro odstranění paměťového efektu. Odezva hmotnostního spektrometru na přidání látky, daná průnikem látky membránou, byla v mezích pozorovacích chyb (± 1 s) okamžitá a výška signálu se po dobu několika minut neměnila. Bylo provedeno porovnání 4 různých druhů membrán pro benzen a naftalen. Závislost naměřeného iontového proudu pro detegovanou hmotu 78 pro benzen na koncentraci benzenu ve vodném roztoku je uvedena na obr. 3 a analogická závislost naměřeného iontového proudu pro detegovanou hmotu 128 pro naftalen na koncentraci naftalenu je uvedena na obr. 4. Jednotlivé přímky odpovídají membránám A, B, C a D. Meze detekce, stanovené porovnáním intenzity iontového proudu

Tabulka I

Meze detekce 3σ benzenu a naftalenu při použití jednotlivých membrán [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]

Parametr	Benzen	Naftalen	n-Propanol
Měřená hmotu (SIM)	78	128	43
Membrána A	$2,7\cdot 10^{-5}$	$6,0\cdot 10^{-6}$	$5,0\cdot 10^{-6}$
Membrána B	$1,7\cdot 10^{-5}$	$1,4\cdot 10^{-5}$	–
Membrána C	$1,4\cdot 10^{-5}$	$2,8\cdot 10^{-5}$	–
Membrána D	$4,5\cdot 10^{-5}$	$2,3\cdot 10^{-5}$	–

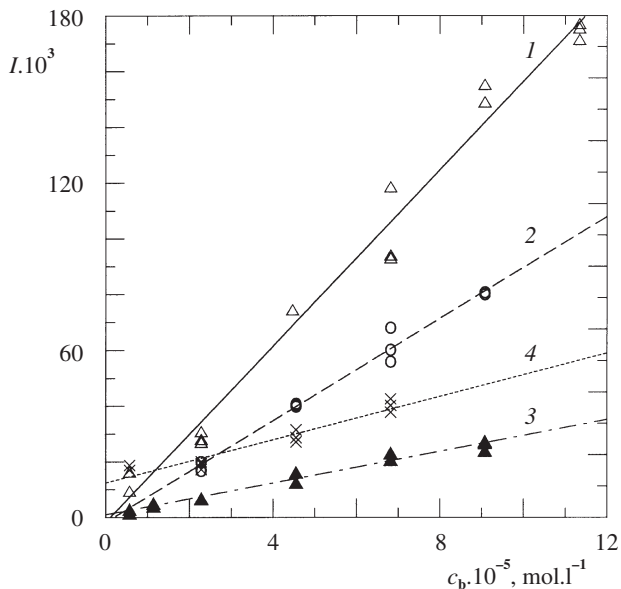


Obr. 2. Spektrum benzenu ve vodném roztoku po odečtení pozadí při použití popsaného interface MIMS (nahore), spektrum benzenu z knihovny NIST (dole)

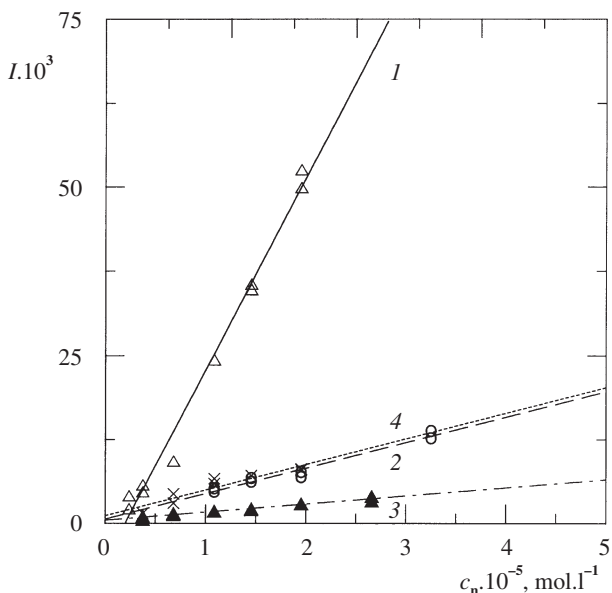
pozadí s naměřenou intenzitou iontového proudu vzorku podle vztahu:

Mez detekce = 3σ , kde σ je střední kvadratická odchylka jsou pro jednotlivé případy uvedeny v tabulce I.

Pro membránu A byla ještě dalším měřením na hmotě 43 zjištěna závislost iontového proudu na koncentraci n-propanolu. Výsledky měření pro benzen, naftalen a n-propanol jsou pro tuto membránu porovnány na obr. 5. Z obrázku je zřejmé,

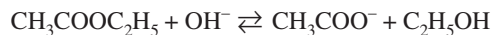


Obr. 3. Intenzita iontového proudu benzenu I v závislosti na jeho koncentraci c_b ve vodném roztoku při použití interface MIMS pro různé membrány; 1 – membrána A, 2 – membrána B, 3 – membrána C a 4 – membrána D



Obr. 4. Intenzita iontového proudu naftalenu I v závislosti na jeho koncentraci c_n ve vodném roztoku při použití interface MIMS pro různé membrány; 1 – membrána A, 2 – membrána B, 3 – membrána C a 4 – membrána D

že n-propanol je vzhledem ke své polaritě propouštěn membránou podstatně méně než benzen a naftalen. Vzájemný vliv benzenu a naftalenu na hodnotu naměřeného iontového proudu je uveden na obr. 6a, b. Ukazuje se, že citlivost metody (směrnice přímky, vyjadřující závislost odezvy na koncentraci), stejně jako mez detekce, je ovlivněna přítomností dalších látek. Jako příklad sledování kinetiky v roztoku byla zvolena reakce zmydlení ethylesteru kyseliny octové:



Byla sledována závislost iontového proudu pro hmotu 88 (ethyl ester kyseliny octové), která byla pomocí kalibrační křivky, sestavené při teplotě měření, transformována do koncentračních souřadnic a rychlostní konstanta byla vyhodnocena standardní metodou jako reakce 2. řádu:

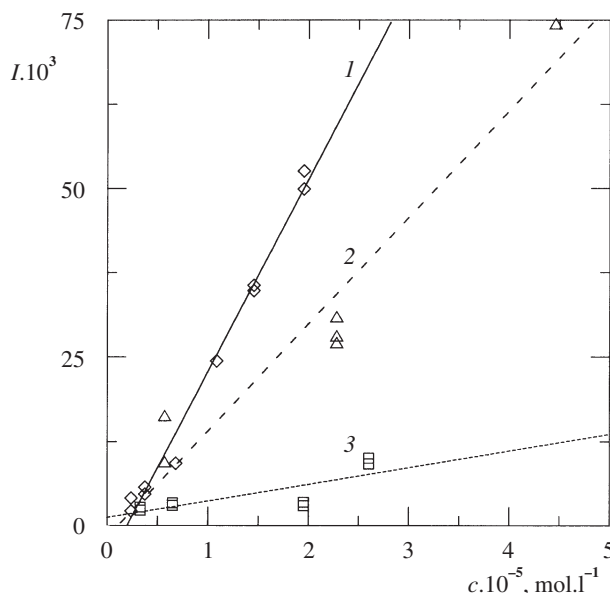
$$k = \frac{1}{[t(a-b)]} \cdot \ln \left[\frac{(a-x)b}{(b-x)a} \right] \quad (3)$$

Tabulka II

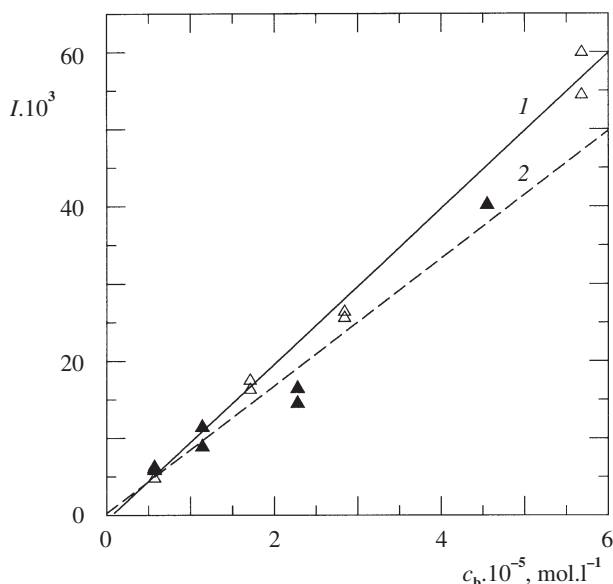
Hodnoty rychlostní konstanty reakce zmydlení ethylesteru kyseliny octové pro různé teploty stanovené metodou MIMS a metodou vodivostní v $[\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$

Teplota [°C]	Intenzivní míchání	
	MIMS	vodivostní měření
25	$11,7 \pm 0,3$	$11,9 \pm 0,5$
32	$12,8 \pm 0,8$	$12,3 \pm 0,5$
39	$13,7 \pm 0,9$	$13,5 \pm 0,5$

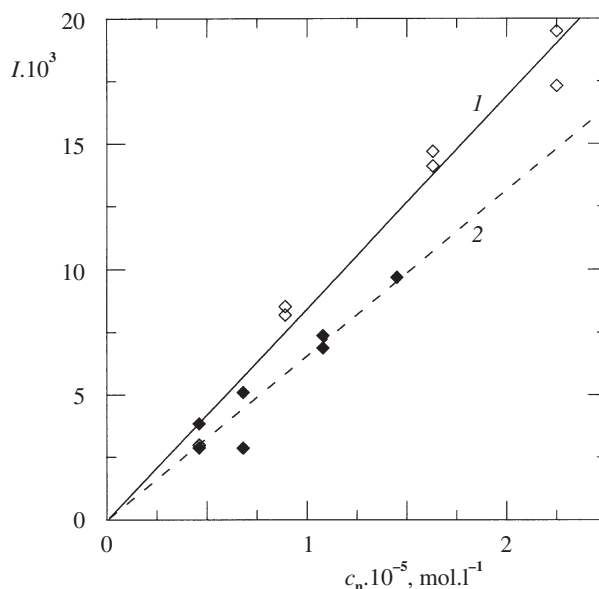
Pozn.: Hodnoty udány včetně směrodatných odchylek



Obr. 5. Iontové proudy (I) benzenu, naftalenu a n-propanolu ve vodném roztoku při použití interface MIMS a membrány A; 1 – naftalen, 2 – benzen, 3 – n-propanol



Obr. 6a. Iontový proud benzenu při použití interface MIMS ve vodném roztoku a ve vodném roztoku ve směsi s naftalenem; 1 – benzen ve vodném roztoku, 2 – benzen a naftalen ve vodném roztoku



Obr. 6b. Iontový proud naftalenu při použití interface MIMS ve vodném roztoku a ve vodném roztoku ve směsi s benzenem; 1 – naftalen ve vodném roztoku, 2 – naftalen a benzen ve vodném roztoku

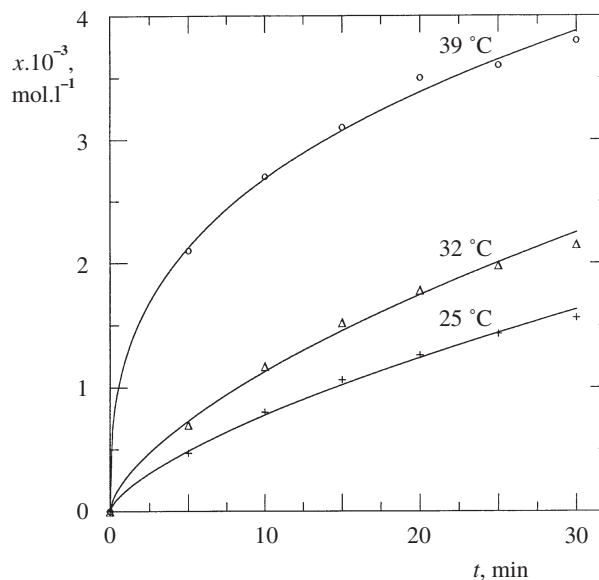
kde a , b jsou počáteční koncentrace ethylesteru a NaOH a x zreagovaný podíl ethylesteru v čase t . Čas $t = 0$ se vztahuje k okamžiku smísení reaktantů o známých počátečních koncentracích (0,0025 M ethylester kyseliny octové; 0,00375 M-NaOH). Směs byla intenzivně míchána. Průběh koncentračních změn je na obr. 7. Hodnoty konstanty k byly porovnány s hodnotami získanými vodivostním měřením, při kterém bylo směsí stejně intenzivně mícháno. Výsledky z obou metod jsou uvedeny v tabulce II.

4. Diskuse

Z tabulky I je zřejmé, že nejnižší meze detekce bylo dosaženo použitím membrány A, zatím co ostatní membrány mají meze detekce pro benzen i naftalen dosti podobné. Stejně závěry je možno učinit i o citlivosti metody (směrnice závislosti iontového proudu na koncentraci – obr. 3 a 4). Použitím membrány A je citlivost podstatně zvýšena a pro naftalen je navíc vyšší než pro benzen. Závislost intenzity iontového proudu na koncentraci je lineární pro všechny tři sledované organické látky (benzen, naftalen, n-propanol – obr. 5). Protože n-propanol je polární látka, je propustnost membrány pro něj nízká a citlivost jeho detekce malá. Jsou-li přítomny dvě látky společně (např. benzen a naftalen – obr. 6) pak z obrázku 6 je vidět, že citlivost klesá. Tento jev může souviset se vzájemným ovlivňováním difuze složek membránou. Z analytického hlediska lze v těchto případech doporučit metodu konstantního přídatku (kalibrace známým přídatkem přímo v měřeném roztoku).

Vyhodnocení koncentračních změn v závislosti na čase poskytlo výsledky v dobré shodě s výsledky získanými pomocí vodivostního měření změn koncentrace složek při reakci, jak je zřejmé z tabulky II.

Membránový vstup poskytuje možnosti citlivé detekce



Obr. 7. Sledování kinetiky reakce zmydelnění ethylesteru kyseliny octové hydroxidem sodným. Konverze hydrolyzy ethylesteru kyseliny octové na čase. 25 °C, 32 °C a 39 °C

změn koncentrace organických látek ve vodných roztocích a nabízí zcela nové možnosti získávání chemických informací.

Autoři děkují prof. dr. Helmutu Baltruschatovi, Univerzita Bonn, za poskytnutí folie A, firmě Schleicher & Schuel za poskytnutí folií B, C a D, firmě Tridelta Siper GmbH Dortmund za poskytnutí frity, Ing. Janu Dupákovi, CSc., ÚPT AV ČR Brno, za svaření spojení elektronovým paprskem a Františku Macourkovi za technickou asistenci.

LITERATURA

1. Soni M. H., Callahan J. H., McElvany S. W.: *Anal. Chem.* **70**, 3103 (1998).
2. Bier M. E., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **59**, 597 (1987).
3. LaPack M. A., Tou J. C., Enke C. G.: *Anal. Chem.* **62**, 1265 (1990).
4. Lauritsen F. R.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **95**, 259 (1990).
5. Slivon L. E., Bauer M. R., Ho J. S., Budde W.: *Anal. Chem.* **63**, 1335 (1991).
6. Kubáň V.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **23**, 323 (1992).
7. Dejarne L. E., Bauer S. J., Cooks R. G., Lauritsen F. R., Kotiaho T., Graf T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7**, 935 (1993).
8. Yakovlev B. S., Talrose V. L., Fenselau C.: *Anal. Chem.* **66**, 1704 (1994).
9. Hoch G., Hok B.: *Arch. Biochem. Biophys.* **101**, 160 (1963).
10. Schmidt V. M., Vielstich W.: *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **96**, 534 (1992).
11. Lloyd D., Thomas K., Price D., O'Neil B., Oliver K., Williams T. N.: *J. Microbiol. Methods* **25**, 145 (1996).
12. Bohátka S.: *Adv. Mass Spectrom.* **13**, 199 (1995).
13. Bohátka S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 656 (1997).
14. Kotiaho T., Hayward M. J., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **63**, 1794 (1991).
15. Cisper M. E., Gill C. G., Townsend L., Hemberger P. H.: *Anal. Chem.* **67**, 1413 (1995).
16. Virkki V. T., Ketola R. A., Ojala M., Kotiaho T., Komppa V., Grove A., Facchetti S.: *Anal. Chem.* **67**, 1421 (1995).
17. Gordon S. M., Callahan P. J., Kenny D. V., Pleil J. D.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1038 (1996).
18. Hayward M. J., Kotiaho T., Lister A. K., Cooks R. G., Austin G. D., Narayan R., Tsao G. T.: *Anal. Chem.* **62**, 1798 (1990).
19. Lauritsen F. R., Kotiaho T., Lloyd D.: *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 585 (1993).
20. Lauritsen F. R., Gylling S.: *Anal. Chem.* **67**, 1418 (1995).
21. Johnson R. C., Srinivasan N., Cooks R. G., Schell D.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 363 (1997).
22. Tsai G. J., Austin G. D., Syu M. J., Tsao G. T., Hayward M. J., Kotiaho T., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **63**, 2460 (1991).
23. Kotiaho T., Lauritsen F. R., Choudry T. K., Cooks R. G.: *Anal. Chem.* **63**, 875A (1991).
24. Wong P. S. H., Cooks R. G., Cisper M. E., Hemberger P. H.: *Environ. Sci. Technol.* **29**, 215A (1995).
25. Bauer S.: *Trends Anal. Chem.* **14**, 202 (1995).
26. Kotiaho T.: *J. Mass Spectrom.* **31**, 1 (1996).
27. Lauritsen F. R., Kotiaho T.: *Rev. Anal. Chem.* **15**, 237 (1996).
28. Srinivasan N., Johnson R. C., Kasthurikrishnan N., Wong P., Cooks R. G.: *Anal. Chim. Acta* **350**, 257 (1997).
29. Ketola R. A., Virkki V. T., Ojala M., Komppa V., Kotiaho T.: *Talanta* **44**, 373 (1997).
30. von Amerongen G. J.: *J. Appl. Phys.* **17**, 972 (1946).
31. Brubaker D., Kammermeyer K.: *Ind. Eng. Chem.* **45**, 1148 (1952).
32. Kotiaho T., Lauritsen F. R., Choudhury T. K., Cooks R. G., Tsao G. T.: *Anal. Chem.* **63**, 875A (1991).
33. Wong P. S. H., Cooks R. G., Cisper M. E., Hemberger P. H.: *Environ. Sci. Technol.* **29**, 215A (1995).
34. Cisper M. E., Hemberger P. H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1449 (1997).
35. Wolter O., Heitbaum J.: *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **88**, 2 (1984).
36. Bansch B., Baltruschat H., Heitbaum J.: *Electrochim. Acta* **33**, 1479 (1988).
37. Baltruschat H., Dülberg A., Schmieman U.: *Dechema Monographs* **125**, 489 (1992).
38. Ojala M., Ketola R. A., Virkki V., Sorsa H., Kotiaho T.: *Talanta* **44**, 1253 (1997).
39. Kostianen R., Kotiaho T., Mattila I., Mansikka T., Ojala M., Ketola R. A.: *Anal. Chem.* **70**, 3028 (1998).
40. Farbwerke Hoechst, Frankfurt, prospekt „Hochstaflon TF“, 1972.
41. *Handbook of Chemistry and Physics*, 55. vyd. CRC-Press, Boca Raton 1975.
42. Drowart J., Goldfinger P.: *Angew. Chem.* **79**, 589 (1967).

P. Brož, E. Drbálková, P. Janderka, P. Sitko, and J. Vřešťál (*Department of Theoretical and Physical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Coupling of Membrane Introduction with Mass Spectrometer (MIMS)**

The described interface for membrane introduction mass spectrometry (MIMS) makes it possible to directly determine concentrations of organic substances in water solution without any preconcentration technique. Some nonpolar, semipolar and semivolatiles substances were chosen as examples for demonstration of the MIMS function. Various kinds of membranes were tested. The detection limit, calibration curves and mutual interference of substances were determined for benzene, naphthalene and propan-1-ol. Ion current intensities were measured in the SIM mode. Hydrolysis of ethyl acetate with NaOH was chosen as an example of in-situ kinetic study using MIMS.

SCHOPNOSTĚ BAKTÉRIÍ VIAZAŤ A PREMIENÄŤ SELÉN NA BIOLOGICKY VYUŽITEĽNÚ FORMU

JOZEF GRONES a MARIÁN MAČOR

Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: grones@fns.uniba.sk

Došlo dňa 26.IV.1999

Kľúčové slová: selén, akumulácia selénu, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*

1. Úvod

Prírodné látky s antioxidantnými účinkami na organizmus v potravinách v poslednom období nabierajú na význame. Chránia jednotlivé komponenty buniek pred oxidačným stresom. Stres sa môže prejaviť ako dôsledok metabolizmu bunky, ale môže byť zapríčinený aj vonkajšími faktormi ako sú mutagény fyzikálneho a chemického pôvodu. Z tohto hľadiska nadobúdajú zvýšený význam najmä mikronutrienty s antioxidantnými vlastnosťami medzi ktoré patria vitamíny skupiny C a E, flavonoidy, antokyány a minerálne stopové prvky. A práve minerálne stopové prvky ako je zinok, selén, meď, chróm a ďalšie sú predmetom štúdia mnohých laboratórií zaoberajúcich sa racionálnou výživou živočíchov a človeka. Prírodné antioxidanty sú významné z hľadiska protektívneho účinku, nie len na LDL cholesterol, ale majú predovšetkým antikancerogénne a antimutagénne vlastnosti.

Selén v bunkách živých organizmov sa vyskytuje viazaný na selenocysteín, kde je jednou z integrálnych súčastí enzýmu glutationperoxidázy, ktorý sa zúčastňuje pri intracelulárnom opravnom mechanizme oxidatívnych poškodení v bunke. Selén je tiež prítomný v 5-iodotyronín-deamináze¹, v selenoproteíne P a ďalších selenoproteínoch². V poslednom období sa ukazuje, že selenoproteíny majú podstatný pozitívny vplyv na imunitný systém vyšších organizmov³.

Mnohé ochorenia ako je kardiomyopatia, postihuje prevažne malé deti a gravidné ženy a osteofria je spôsobená príjmom menej ako 19 µg selénu na deň⁴. Ak je selén v optimálnej koncentrácii v organizme, zabraňuje tvorbe rakoviny a hlavne potláča kardiovaskulárne ochorenia^{5,6}.

Selén sa v základných potravinách vyskytuje v dvoch formách. V organickej podobe, v bielkovinách ako súčasť selenometionínu a selenocysteínu, alebo v anorganickej forme ako seleničitan a selenan. Vzájomný vzťah oboch foriem pri metabolizme popísal Young⁷. Koncentrácia selénu v potravinách je závislá od prírodných podmienok, tj. od koncentrácie selénu v poľnohospodárskej pôde⁸. Selén sa naspäť do pôdy dostáva po biologickej recyklácii v organizme v podobe trimetylselenonia v močovine, ako aj vo forme elementárneho selénu a kovového selénu. Relatívne inertná forma selénu sa mení prostredníctvom pôdných baktérií na selenit a selenan⁹.

Množstvo selénu v prostredí je rozdielne a je závislé od prírodných podmienok v jednotlivých krajinách¹⁰. V Japonsku je to až 130 µg.kg⁻¹ zeminy¹¹, pričom na Slovensku iba

25 µg.kg⁻¹ zeminy čo sa negatívne odráža aj na jeho množstve v základných potravinách, ako je mlieko, syry, vajcia a chlieb. Najväčší obsah selénu je v rybách, obilninách, vajciach, šošovicí, hubách a v brazílskych orechoch.

I keď sa v poslednom období venuje značná pozornosť štúdiu vplyvu selénu na ľudský organizmus o jeho metabolizme v ľudských bunkách vieme ešte pomerne málo hoci poznáme efekt chemickej formy selénu na niektoré závažné ochorenia človeka. Mnohé štúdie potvrdzujú, že selenometionín do buniek prechádza aktívnym transportom podobne ako metionín, naproti tomu anorganický selén bunky absorbujú mechanizmom difúzie cez bunkovú membránu. Selenocysteín prechádza do bunky aktívnym mechanizmom spolu s ostatnými bázičnými aminokyselinami¹²⁻¹⁴.

2. Materiál a metódy

2.1. Bakteriálne kmene

Bakteriálne kmene *Acetobacter pasteurianus* a *Escherichia coli* použité v experimentoch pochádzajú zo zbierky mikroorganizmov na katedre molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave. Kmene *Lactobacillus* sú zo zbierky mikroorganizmov Výskumného ústavu potravinárskeho v Bratislave z pracovniaka VÚP Biocentrum Modra.

2.2. Kultivačné média a kultivácia baktérií

Kmene *E. coli* sme kultivovali na kvapalnom Luria-Bartoni (LB) médiu (5 g tryptón, 5 g kvasničný autolyzát, 5 g NaCl pH 7,2 na 1000 ml média), bunky *Acetobacter pasteurianus* na YPM médiu (5 g kvasničný autolyzát, 3 g peptón, 20 g manitol) pri teplote 28 °C a *Lactobacillus* na MM médiu (5 g kvasničný autolyzát, 10 g hovädzí extrakt, 10 g peptón, 20 g glukóza, 5 ml Tween 80, 2 g K₂HPO₄, 5 g octán sodný, 2 g citrónan amónny, 0,2 g MgSO₄·7H₂O, 0,05 g MnSO₄ pH 6,2 na 1000 ml média) pri teplote 37 °C. Pri príprave pevných médií sme pridávali 20 g agaru na liter média. Média boli suplementované seleničitanom sodným do koncentrácie uvedenej v jednotlivých experimentoch.

2.3. Stanovenie koncentrácie selénu

Rozrastené bunky sme usadili 10 min centrifugáciou pri 12 000 g a po zliati supernatantu sme bunky dvakrát premyli destilovanou vodou. Po mineralizácii supernatantu a sedimentu sme koncentráciu selénu stanovili atómovou absorbnou spektrometriou (merania sa uskutočnili vo Výskumnom ústave potravinárskom v Bratislave). Ako štandard sme použili seleničitan sodný.

3. Výsledky a diskusia

V európskych krajinách je príjem biologicky dôležitých nutričných antioxidantov oproti odporúčanému príjmu pomerne nízky. Tento stav je spôsobený rozdielom v stravovaní sa obyvateľstva. Preferuje sa zvýšená konzumácia predovšetkým rafinovaných tukov a cukrov na úkor nerafinovaných¹⁵.

Nemenej významným faktorom nízkeho príjmu selénu je predovšetkým nízka konzumácia ovocia a zeleniny, ktoré organizmus obohacujú nielen o antioxidanty minerálneho pôvodu, ale aj o polyfenolické zlúčeniny (taníny), antokyány, betakyány a zmes rôznych potrebných vitamínov.

Jednou z možností ako suplementovať nedostatok mikroelementov v potravinách je ich pridávanie do potravín v takej forme, ktorú je organizmus schopný najlepšie využiť. Najjednoduchšia suplementácia selénu do potravín je priame pridávanie anorganických solí. Z hľadiska efektívnosti je výhodnejšie selén pridávať prostredníctvom mikroorganizmov, ktoré ho zabudujú v organickej forme do aminokyselín a bielkovín v podobe selenoproteínov. Experimenty ukázali, že takéto začlenenie selénu do aminokyselín ako je cysteín a metionín prebieha prevažne v eukaryotických bunkách. Z potravinárskeho hľadiska najmä v bunkách mliečnych baktérií, ako je *Lactobacillus*, alebo v potravinárskych nepatogénnych kvasinkách. Iné typy baktérií ukladajú ťažké kovy, napr. telúr, vo forme kryštálov¹⁶. Bunky octových baktérií ukladajú selén v upravenej amorfnej metabolizovateľnej forme.

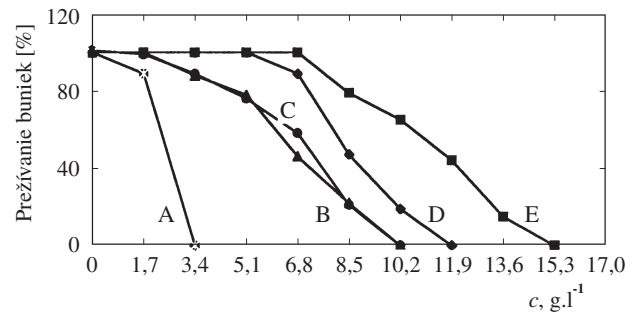
3.1. Schopnosť rastu buniek *E. coli* na médiách so selénom

Pri kultivácii na médiách so selénom, je potrebné sústrediť sa na kmene, ktoré sú schopné akumulovať selén či už v amorfnej forme, alebo vo forme selenoproteínov. Z hľadiska významu a využiteľnosti bakteriálnych druhov na kumuláciu selénu v bunkách sme testovali potravinársky významne druhy baktérií rodov *Lactobacillus* a *Acetobacter* v porovnaní s niektorými základnými laboratornými kmeňmi buniek *Escherichia coli*. Po pridaní bakteriálnej kultúry do potravín sa očakáva dosiahnutie potrebnej dennej dávky pre ľudský organizmus.

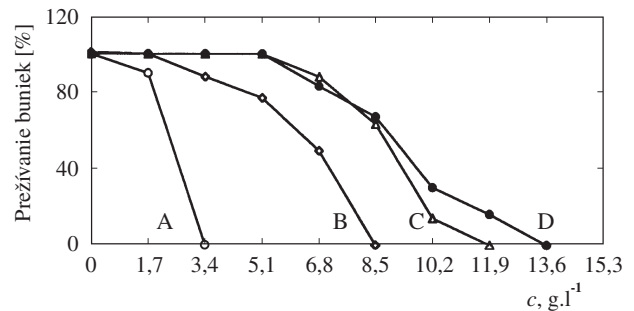
Deväť druhov buniek *Escherichia coli* sme kultivovali na tekutom LB médiu s prídavkom seleničitanu sodného v koncentráciách od 0,86–17,2 g na liter média. Všetky testované baktérie sú schopné rásť a prežívať do koncentrácie 1,72 g na liter média. Pri vyšších koncentráciách seleničitanu (obrázky 1 a 2) je schopnosť rastu a prežívania buniek menšia. Najnižšiu rezistenciu voči seleničitanu majú bunky *Escherichia coli* XL1 a *Escherichia coli* JM109, oproti tomu najvyššia rezistencia voči selénu sa prejavuje v bunkách *Escherichia coli* BB4. Ako ukazujú výsledky vyššie percento prežívania majú bunky, ktoré sa viac menej podobajú divým kmeňom oproti bunkám konštruovaným pre molekulárno biologické analýzy v laboratóriách.

3.2. Schopnosť rastu buniek *Lactobacillus spp.* rásť na seléne

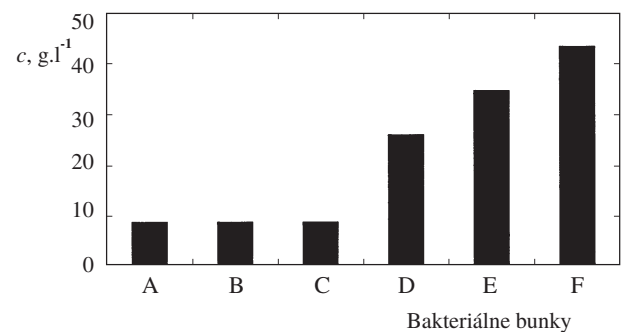
Z potravinárskeho hľadiska 18 významných baktérií rodov *Lactobacillus* sme testovali na schopnosť rastu na kultivačnom médiu, do ktorého sa pridával seleničitan rôznej koncentrácie. Dvanásť z nich *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* LM3/1, *Lactobacillus brevis* LM4/3, *Lactobacillus brevis* LM5/5, *Lactobacillus sake* 16, *Lactobacillus plantarum* 965, *Lactobacillus paracasei* LM5/6, *Lactobacillus bavaricus* M/401, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus* FBB 61, *Pediococcus pentosaceus* FBB 61/12 (tabuľka I) bolo schopných rásť v aeróbných podmienkach na médiách so seleničitanom do maximálnej kon-



Obr. 1. Percento prežívajúcich buniek *Escherichia coli* v tekutom kultivačnom médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu sodného. A *Escherichia coli* TG1, B *Escherichia coli* BB4, C *Escherichia coli* XL1, D *Escherichia coli* K12, E *Escherichia coli* HB101



Obr. 2. Percento prežívajúcich buniek *Escherichia coli* v tekutom kultivačnom médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu sodného. A *Escherichia coli* JM108, B *Escherichia coli* JM109, C *Escherichia coli* DH1, D *Escherichia coli* MC4100



Obr. 3. Rast buniek na médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu sodného. A *Lactobacillus plantarum* BILL DCAM 026, B *Lactobacillus plantarum* LV 4/10 DCAM 077, C *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* DCAM 088, D *Lactobacillus pentosus* DCAM 006, E *Lactobacillus sake* 16 DCAM 109, F *Lactobacillus plantarum* C11 DCAM 110

centrácie 6 g na liter média. Naproti tomu ďalších šesť druhov *Lactobacillus* rástlo na seleničitan v koncentračnom rozsahu od 8,6 do 43 g na liter kultivačného média (obrázok 3).

3.3. Schopnosť rastu buniek *Acetobacter pasteurianus* na seléne

Prokaryotické bunky *Acetobacter* patria podobne ako *Lactobacillus* medzi významné baktérie využívané v potravinárskom priemysle. Preto schopnosť buniek rásť na vyšších kon-

Tabuľka I

Schopnosť rastu baktérií mliečneho kvasenia na MM médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu sodného (c)

Baktérie	Medzinárodné označenie kmeňov	c [g.l ⁻¹]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DCAM 004	1,7
<i>Lactobacillus brevis</i> LM3/1	DCAM 080	0,8
<i>Lactobacillus brevis</i> LM4/3	DCAM 081	1,7
<i>Lactobacillus brevis</i> LM5/5	DCAM 082	3,5
<i>Lactobacillus sake</i> 16	DCAM 108	5,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> 965	DCAM 111	1,7
<i>Lactobacillus paracasei</i> LM5/6	DCAM 083	0,8
<i>Lactobacillus bavaricus</i> M/401	DCAM 112	3,5
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DCAM 009	1,7
<i>Pediococcus parvulus</i>	DCAM 116	4,2
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB 61	DCAM 113	5,2
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB 61/12	DCAM 114	1,7

centráciách selénu je z potravinárskeho hľadiska dosť významna. Pri štúdiu schopnosti kumulácie selénu do buniek baktérií *Acetobacter* sme testovali štyri druhy *A. pasteurianus* 2374, *A. pasteurianus* 3612, *A. pasteurianus* 3613 a *A. pasteurianus* 3614. Bunky na minimálnych tekutých ako aj pevných médiách rástli do koncentrácie seleničitanu 17,2 g.l⁻¹. Bunky *A. pasteurianus* 3612 a *A. pasteurianus* 3614 boli schopné rásť až do koncentrácie 56,8 g.l⁻¹ selénu. Z rozrastených buniek po ich niekoľkonásobnom premytí a mineralizácii sme stanovovali koncentráciu selénu v bunkách atómovou absorpčnou spektrometriou.

Pri porovnaní dvoch základných bakteriálnych druhov *Escherichia coli* a *Lactobacillus* vidieť, že prevažná väčšina buniek oboch druhov baktérií je schopná rásť na seličitane do koncentrácie 6 g.l⁻¹. Naproti tomu niektoré druhy sú schopné rásť na médiu s trojnásobnou koncentráciou seleničitanu a niektoré druhy *Lactobacillus* dokonca na médiu s koncentráciou selénu viac ako 40 g.l⁻¹. Tieto koncentrácie sú dostatočne vysoké na to, aby po suplementácii potravín živými bunkami rodu *Lactobacillus* alebo bielkovinami tohto druhu pokryli dennú dávku selénu potrebnú pre optimálnu reguláciu metabolických dráh vo vyšších organizmoch.

Na tomto mieste bude potrebné aj odpovedať na položenú otázku, od čoho závisí schopnosť kumulácie vyššej koncentrácie selénu v bunkách a akým mechanizmom sa selén do buniek dostáva. Experimenty ukázali, že bunky *E. coli* TG1 za normálnych podmienok rastú na seléne do koncentrácie 7,1 g.l⁻¹. Postupným preočkovávaním na vyššie koncentrácie seleničitanu je možné indukovať ich schopnosť rásť až na koncentráciách do 41,2 g.l⁻¹ na liter média. Podobne je to aj u buniek *A. pasteurianus*, ktoré bežne rastú na médiách s prídavkom 17,2 g.l⁻¹ selénu. Adaptovaním buniek v prostredí s vyššou koncentráciou selénu dosiahneme schopnosť rásť buniek až

na 56,8 g.l⁻¹ koncentracii, čo je trojnásobok pôvodnej koncentrácie. Pri meraní koncentrácie selénu v kultivačnom médiu a v bunkách baktérií pred kultiváciou a po skončení kultivácie sme zistili, že v médiu zostáva asi 11 % z pridávaného selénu. Toto množstvo je vždy rovnaké nech bunky kultivujeme pri akejkoľvek koncentracii selénu. Zostáva nezodpovedaná otázka, prečo bunky z prostredia pri nízkych koncentráciách neviažu selén úplne.

LITERATÚRA

1. Arthur J. R., Nicol F., Beckett F. J.: *Biochem. J.* 272, 537 (1990).
2. Sunde R. A.: *Ann. Rev. Nutr.* 10, 451 (1990).
3. Kiremidjian-Schumacher L., Stotzy G.: *Envir. Res.* 42, 277 (1997).
4. Yang G. A., Ge K., Chen J., Chen X.: *Wld. Rev. Nutr. Dietet* 55, 98 (1988).
5. Willett W. C., Stampfer M. J.: *Br. Med. J.* 297, 573 (1988).
6. Casey C. E.: *Proc. Nutr. Soc.* 47, 55 (1988).
7. Young V. R., Nahapetian A., Janghorbani M.: *Am. J. Clin. Nutr.* 35, 1076 (1982).
8. Geering H. R., Car E. E., Jones L. P. H., Allaway W. H.: *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.* 32, 35 (1968).
9. Diplock A. T.: *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.* 57, 256S (1993).
10. Yang G., Wang S., Zhou R., Sun S.: *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 872 (1983).
11. Kumpulainen J. T.: *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7, 107 (1993).
12. Mason A. C., v knihe: *Trace Minerals in Foods* (Smith K. T., ed), str. 325. Marcel Dekker, New York 1988.
13. Venderland S. C., Butles J. A., Whanger P. D.: *J. Nutr. Biochem.* 3, 359 (1992).
14. Fairweather-Tail S. J.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, 20 (1997).
15. Kumpulainen J. T., v: *Proceedings of the Technical Workshop on Trace Elements, Natural Antioxidants and Contaminants* (Kumpulainen J. T., ed.). Helsinki Espoo August 2526, 1995, REU Technical Series 49. The Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome 1996.
16. Burian J., Nguyen Tu, Kľučár L., Guller L., Lloyd-Jones G., Stuchlík S., Fejdi P., Siekel P., Turňa J.: *Folia Microbiol.* 43, 589 (1998).

J. Grones and M. Mačor (*Department of Molecular Biology, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Accumulation and Transformation of Selenite by Bacteria in Biologically Utilisable Form**

Prokaryotic and eukaryotic cells accumulate some heavy metals, storing and incorporating them in metalloproteins. This process was studied in nine bacterial strains of *Escherichia coli*, four strains of *Acetobacter pasteurianus* and eighteen genera of *Lactobacillus* bacteria. The results showed the ability of the studied strains to grow at various concentrations of selenium. For the *E. coli*, *A. pasteurianus* and *Lactobacillus* strains, the concentrations ranges were 1.7–17.2, 17.2–56.8 and 8.6–43 g.l⁻¹ of selenium, respectively.

STANOVENÍ DEXTROMETHORPHANU A JEHO METABOLITŮ V MOČI 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, Univerzita Karlova, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové, ^cÚstav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, 500 05, Hradec Králové

Došlo dne 11.V.1999

Klíčová slova: dextromethorphan, metabolity, HPLC

Úvod

Jako polymorfismus neboli interindividuální variabilita je označován jev, kdy odezva na léčivo mezi jednotlivci je kvantitativně i kvalitativně odlišná. I když jsou tyto rozdíly patrné u všech chemických i biologických dějů, kterým léčivo po vstupu do organismu podléhá, nejvýraznější je variabilita biotransformace léčiv. Pro metabolismus léčiv je primárně rozhodující geneticky určená aktivita enzymů, tj. metabolický genotyp jednotlivce. Informace o metabolismu léčiv a funkčnosti jednotlivých metabolických drah mohou předem zabránit použití přípravků, které by byly pro daného jedince toxické nebo naprosto neúčinné¹.

Náš zájem se soustředil na enzymový systém cytochromu P450 (CYP450), který katalyzuje většinu reakcí první fáze biotransformace xenobiotik v lidském těle. Jeho izoformu 2D6 (CYP2D6) charakterizuje výrazný genetický polymorfismus, který je ve srovnání s ostatními CYP450 nejvíce prozkoumán. V literatuře bylo popsáno již více než 50 alel, které kódují CYP2D6 s různou aktivitou a vysvětlují tak přítomnost pomalých, intermediárních, rychlých a ultrarychlých metabolizátorů CYP2D6 v lidské populaci².

Rychlost, s jakou daný jedinec xenobiotika – substráty CYP2D6 – metabolizuje, lze předpovědět buď určením genotypu (analýzou DNA), nebo určením fenotypu, tj. podáním vhodné modelové látky, jejíž metabolismus závisí výlučně na aktivitě CYP2D6. Fenotyp je pak možné zjistit na základě množství podané modelové látky a jejího metabolitu (–ů) v krvi nebo v moči.

Pro zjišťování aktivity CYP2D6 v pokusech *in vivo* jsou nejčastěji jako modelové látky používány debrisochin, spartein a dextromethorphan (DM). Velice výhodný je DM, protože nevykazuje závažné vedlejší účinky. V řadě studií v uspořádání *in vitro* a *in vivo* bylo prokázáno, že O-demethylaci DM na dextrothorphan (DEX) (obr. 1) v lidském organismu katalyzuje téměř výlučně CYP2D6. Indexem, který spolehlivě odráží aktivitu CYP2D6, je tzv. metabolický poměr (MP). MP je poměr molárních koncentrací DM a DEX v moči:

$$MP = C_{DM} / C_{DEX}$$

Jedinci s MP > 0,3 jsou pomalí metabolizátoři, zatímco ostatní jsou metabolizátoři rychlí.

Alternativní cesta metabolismu DM na 3-methoxymorphinan (MM) je katalyzována některými dalšími izoenzymy (CYP450, viz obr. 1). Tato cesta se na metabolismu DM podílí asi z 10 %. DEX a MM dále podléhají demethylaci na hydroxymorphinan (HM). DM a MM jsou vylučovány do moči přímo, DEX a HM převážně jako glukuronidy.

Cílem studie bylo vypracovat HPLC metodu pro stanovení DM a metabolitů v moči a ověřit ji při stanovení fenotypu CYP2D6 ve vzorku zdravých subjektů populace České republiky.

Experimentální část

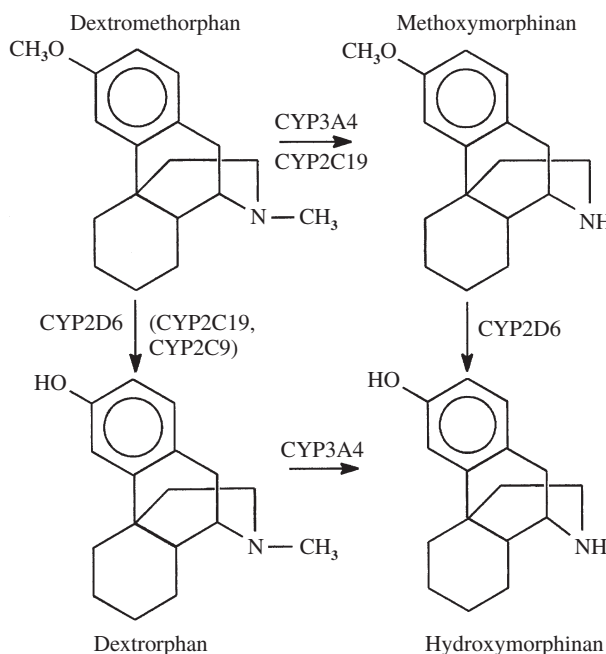
Studie se zúčastnilo 102 zdravých, nepřibuzných dobrovolníků ve věku 20–35 let (59 mužů, 43 žen). Jednorázově jim byl podán hydrobromid dextromethorphanu v dávce 27,5 mg per os (25 ml sirupu Wick Formula 44 Plus S, Wick Pharma, Gross-Gerau, SRN).

Dobrovolníci sbírali kvantitativně moč v intervalu 0–4 hodiny po podání látky. Objem moče byl stanoven vážením a odebrané vzorky (dvakrát 2 ml) byly uchovány při teplotě –80 °C až do analýzy (nejdéle 2 měsíce).

HPLC

Izolační postup sledovaných látek z moče a stanovení jejich koncentrací metodou HPLC s fluorescenční detekcí vznikl úpravou metod publikovaných v literatuře^{3–6}.

Konfigurace přístroje: Pumpa LC-10AS, dávkovací zařízení SIL-10A a fluorescenční detektor RF-10A (excitační a emisní vlnová délka 280 nm/310 nm) od firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko).



Obr. 1. Biotransformace dextromethorphanu v játrech

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), triethylamin (350 μl.l⁻¹), pH 3,6 (upraveno H₃PO₄, 0,1 mol.l⁻¹); průtoková rychlost mobilní fáze 0,7 ml.min⁻¹ (160–170 MPa); teplota kolony 30 °C, teplota autosampleru 10 °C; vnitřní standard: betaxolol (betaxololi hydrochloridum, Lokren 20 mg tbl., Synthelabo, Francie).

Standardy analyzovaných látek: dextromethorphan hydrobromid monohydrát, (+)-3-methoxymorphinan hydrobromid, (+)-3-hydroxymorphinan hydrochlorid a vlnan dextroprhanu monohydrát od firmy Hoffmann-La Roche, Švýcarsko.

Úprava vzorků moče před analýzou

DM a jeho metabolity byly ze vzorků moče izolovány metodou extrakce a reextrakce v systému kapalina–kapalina. Konjugáty DEX a HM s kyselinou glukuronovou byly před extrakcí hydrolyticky rozštěpeny enzymem β-glukuronidase. Při hydrolyze byl 1 ml moče s přísadkou 0,4 ml octanu sodného (0,2 mol.l⁻¹) a 0,031 ml (1,620 μkatal.l⁻¹) β-glukuronidasy inkubován ve vodní lázni temperované na 37 °C. Inkubační doba 18 h byla předem experimentálně ověřena jako dostatečná pro úplnou hydrolyzu glukuronidů.

Pro stanovení koncentrací DM a MM byly extrahovány vzorky neředěných inkubačních směsí a pro stanovení koncentrací HM a DEX byly použity vzorky inkubačních směsí ředěných slepou močí. Faktor ředění (10, 50 nebo 100) se u jednotlivých dobrovolníků lišil v závislosti na velikosti diurézy.

K 1 ml směsi ředěné i neředěné bylo přidáno 0,4 ml Na₂CO₃ (0,5 mol.l⁻¹), 0,1 ml vnitřního standardu (5 ng.l⁻¹, ředěno 0,1 mol.l⁻¹ HCl) a 4 ml extrakčního činidla (hexan: n-butanol, 9:1 v/v). Po 15 minutovém protřepání extrakční směsi následovala centrifugace (2200 rpm, 15 min). Potom byly zkumavky se vzorky vloženy do chlazené hexanové lázně (–20 °C). Po zmrznutí vodné fáze byla organická vrstva pře-

vedena do čisté konické zkumavky. Vodná fáze byla po rozmrazení extrahována ještě jednou stejným postupem. Organická fáze z obou extrakcí byly spojeny a použity k reextrakci. Ke spojeným organickým fázím bylo přidáno 0,3 ml KHSO₄ (0,01 mol.l⁻¹). Po 15 minutovém třepání následovala centrifugace (2200 rpm, 15 min). Potom byla vodná vrstva opět vymrazena a organická fáze byla odsáta. Vodná fáze byla po rozmrazení nastříkována na kolonu v objemu 3–50 μl.

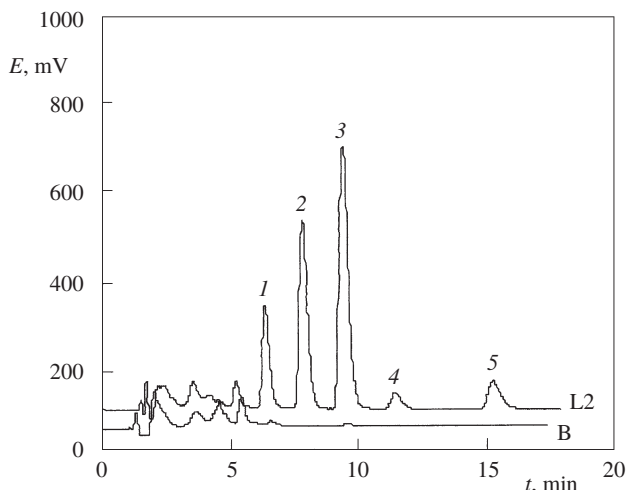
Kalibrační řada a vzorky kontroly kvality byly připravovány gravimetricky ředěním zásobních roztoků standardů slepou močí (konc. zásobních roztoků: DM 176,4 mg.l⁻¹, MM 143,0 mg.l⁻¹, DEX 1791,9 mg.l⁻¹ a HM 1073,0 mg.l⁻¹, ředěno 0,1 mol.l⁻¹ HCl). Rozsahy koncentrací jednotlivých látek v kalibrační řadě byly 4,87.10⁻³–0,159 mg.l⁻¹ pro DM, 5,16.10⁻³–0,167 mg.l⁻¹ pro MM, 0,0916–2,986 mg.l⁻¹ pro DEX a 0,0465–1,489 mg.l⁻¹ pro HM.

Parametry kalibračních závislostí byly získány ze závislosti poměru ploch pík stanovené látky a vnitřního standardu na teoretické koncentraci analyzované látky metodou vážené lineární regrese (součást programu NCSS 6. 0. 21, BMDP Statistical Software, Los Angeles, California).

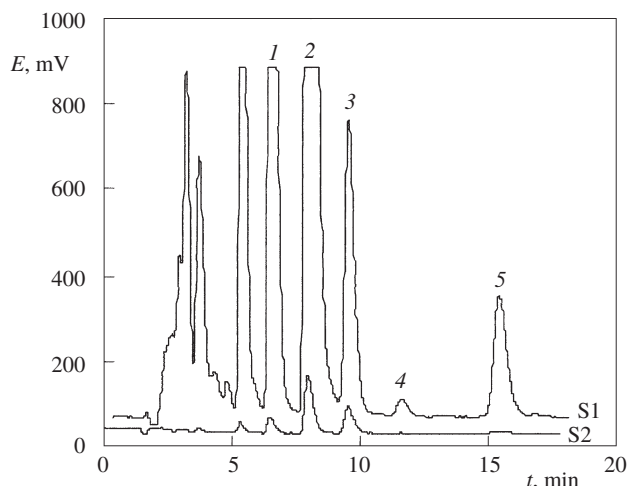
Výsledky a diskuse

Chromatografické záznamy analýz jsou uvedeny na obr. 2 a 3. Analýza jednoho vzorku trvala 17 minut. Zvolené chromatografické podmínky umožnily úplnou separaci a stanovení dextromethorphanu, jeho metabolitů a vnitřního standardu. Analýza močí získaných od 102 dobrovolníků před podáním dextromethorphanu prokázala, že endogenní látky neinterferují s látkami analyzovanými (obr. 2).

Extrakce DM a metabolitů z močí do organického rozpouštědla je problematická, protože HM a DEX jsou polárnější než MM a DM. Autoři dříve publikovaných extrakčních metod proto upřednostňovali použití opakované extrakce³, použití dvou extrakčních činidel⁴ nebo extrakci na pevných fázích⁵. Při extrakci směsí hexan–butanol je uváděna výtěžnost extrak-



Obr. 2 Chromatografický záznam analýz močí; B – chromatografický záznam slepé močí, L2 chromatografický záznam kalibračního bodu L2: 1 – hydroxymorphinan, 2 – dextroprhan, 3 – betaxolol, 4 – methoxymorphinan, 5 – dextromethorphan



Obr. 3 Chromatografické záznamy moče po inkubaci s β-glukuronidase: S1 – neředěná inkubační směs pro stanovení dextromethorphanu (5) a methoxymorphinanu (4), S2 – ředěná inkubační směs pro stanovení hydroxymorphinanu (1), dextroprhanu (2) a betaxololu (3)

Tabulka I
Výsledky analýz vzorků kontroly kvality

Vzorek kontroly kvality	Analyt	Teoretická koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Poměr naměřené a teor. konc. ve dnech							Průměr	CV ^a [%]	RE ^b [%]
			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.			
K1	DM	0,153	0,92	1,02	1,00	0,99	0,96	0,98	0,97	0,98	3,4	-2,2
	DEX	3,15	0,93	1,05	1,04	0,99	0,93	0,97	1,08	1,00	5,8	-0,3
	MM	0,178	0,91	1,00	0,99	0,93	0,88	0,99	0,88	0,94	5,8	-5,8
	HM	1,61	0,95	1,07	1,03	1,03	0,92	0,96	1,06	1,00	5,7	0,3
K2	DM	0,0531	0,95	1,03	1,08	1,01	1,03	1,04	1,06	1,03	4,1	3,0
	DEX	1,10	0,94	1,03	1,08	0,95	0,98	1,01	1,05	1,01	5,1	1,0
	MM	0,0631	0,99	0,96	1,17	1,11	0,95	1,21	1,05	1,06	9,9	6,2
	HM	0,528	0,97	0,94	1,04	0,99	0,98	1,04	1,04	1,01	3,9	0,2

^a Variační koeficient, ^b relativní odchylka

Tabulka II
Metabolický poměr (MP) a exkrece dextromethorphanu a jeho metabolitů do moče v intervalu 0–4 h po podání 85 μmol (27,5 mg) hydrobromidu dextromethorphanu ve skupině rychlých (RM) a pomalých (PM) metabolizátorů

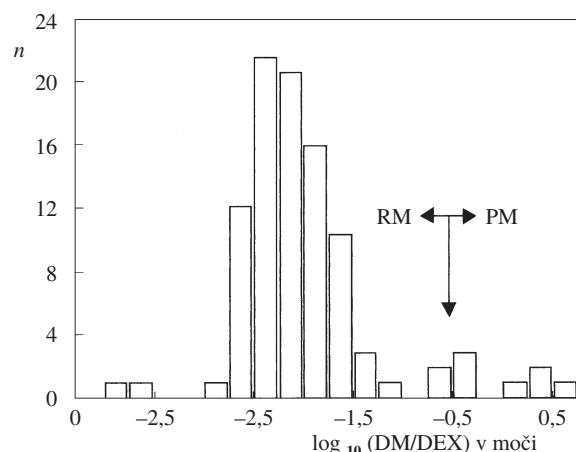
MP ^a	Medián (rozpětí)	
	RM (N = 95)	PM (N = 7)
	0,007 (0,0001–0,18)	1,3 (0,37–4,6)
DM	0,20 (0,005–2,2)	2,19 (0,96–13,5)
DEX	29,8 (3,70–50,8)	2,20 (0,46–8,85)
MM	0,02 (0,003–0,14)	0,13 (0,08–1,61)
HM	11,0 (0,94–19,3)	2,04 (0,09–4,53)

^a 4-h exkrece (% dávky); pro všechny látky statisticky významný rozdíl mezi RM a PM ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U-test)

ce pro DM a DEX v rozmezí 50–80 % (cit.⁶). Opakovaná extrakce vzorků moči směsí hexan–butanol a vymrazování vodné fáze před oddělením organické fáze vedly v této studii k vyšší extrakční výtěžnosti u všech analytů (DM 97 %, DEX 99 %, HM 83 %, MM 92 % a BX 101 %).

Korelační koeficienty kalibračních závislostí získaných pro DM a metabolity během sedmi po sobě jdoucích dnů byly ve všech případech vyšší než 0,998. Průměrné relativní odchylky teoretických a analyzovaných koncentrací kalibračních bodů se pro všechny látky pohybovaly v rozmezí od -3,2 % do 3,6 %. Z toho vyplývá, že kalibrační závislosti byly v koncentračních rozmezích uvedených v experimentální části pro všechny látky lineární.

Variační koeficienty naměřených koncentrací mezi dny ($N = 7$) byly pro všechny kalibrační body a látky v rozmezí od 2,3 % do 7,4 %. Přesnost analýz v jednotlivých dnech byla odhadnuta z hodnot poměrů naměřené a teoretické koncentrace pro 5 vzorků kalibrační řady. Variační koeficienty těchto poměrů v jednotlivých dnech se pohybovaly v rozmezí 1,2 % až 6,9 % (DM, DEX a HM) a 2,6 % až 9,2 % (MM). Přesnost a správnost analýz vzorků kontroly kvality vyplývá z údajů v tabulce I. Výsledky analýz kalibračních bodů s nejnižšími



Obr. 4. Frekvenční histogram rozložení dekadických logaritmů hodnot metabolického poměru dextromethorphan (DM)/dextromethorphan (DEX) ve skupině 102 vyšetřených osob (počet dobrovolníků n)

koncentracemi byly reprodukovatelné a správné. Tyto teoretické koncentrace (uvedené v experimentální části) je možné považovat za spodní meze stanovitelnosti analyzovaných látek. Pro hodnotu poměru signálu a šumu 5 byl odpovídající detekční limit pro DM a metabolity odhadnut na 0,035 ng, což odpovídá koncentraci v moči 0,23 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. V porovnání s publikovanými detekčními limity HPLC metod s fluorescenční detekcí^{4,6} je námi dosažená hodnota o jeden řád nižší. Hlavním důvodem tohoto rozdílu je pravděpodobně to, že zvolené separační podmínky vedly k úplné absenci interferujících píků endogenních látek. Dalším důvodem je o 20–30 % vyšší výtěžnost námi použité extrakční metody.

Podle mezní hodnoty metabolického poměru DM/DEX v moči bylo 7 (6,9 %) dobrovolníků označeno jako pomalí metabolizátoři a 95 (93,1 %) dobrovolníků jako metabolizátoři rychlí. Tyto výsledky se shodují se závěry studií, které byly provedeny u jiných evropských bílých populací s dextromethorphanem, sparteinem a debrisochinem jako modelovými substráty⁷. V populaci České republiky byla provedena studie s methoprololem (substrát CYP2D6), která našla fenotyp pomalého metabolizátora u 6 z 97 účastníků⁸ (6,2 %). Frekvenční histogram rozložení dekadických logaritmů hodnot MP ve skupině 102 vyšetřovaných osob je uveden na obr. 4. Rozdíl v kumulativní exkrezi DM a metabolitů do moče za 4 h

od podání látky byl mezi RM a PM pro všechny látky statisticky vysoce významný (tabulka II). Přesto stanovení exkrece samotného DM (nevyžadující hydrolyzu glukuronidů) nemožňuje ve všech případech odlišit RM a PM, protože se rozmezí hodnot exkrece pro mateřskou látku mezi oběma skupinami překrývají.

LITERATURA

1. Mičuda S., Martínková J., Chládek J., Anzenbacher P.: *Remedia* 8, 98 (1998).
2. Marez D., Legrand M., Sabbagh N., Lo Guidice J.-M., Spire C., Lafitte J.J., Meyer U. A., Broly F.: *Pharmacogenetics* 7, 193 (1995).
3. Jones D. R., Horski C. J., Hamman M. A., Hall S. D.: *J. Chromatogr. B* 678, 105 (1996).
4. East T., Dye D.: *J. Chromatogr.* 338, 99 (1985).
5. Ducharma J., Abdullah S., Wainer I. W.: *J. Chromatogr. B* 678, 113 (1996).
6. Lam Y. W. F., Rodriguez S. Y.: *Ther. Drug Monit.* 15, 300 (1993).
7. Alván G., Bechtel P., Iselius L., Gundert-Remy U.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39, 533 (1990).
8. Ulč, I., Ulč J., Čepeláková H.: *Cas. Lek. Cesk.* 129, 244 (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 Urine

An HPLC method for determination of dextromethorphan (DM), dextropran (DEX), methoxymorphinan (MM) and hydroxymorphinan (HM) in urine with fluorescence detection (excitation and emission wavelength 280 and 310 nm) was elaborated. The mobile phase was acetonitrile – 0.01 M-KH₂PO₄ 3:2, triethylamine 350 μl l⁻¹, pH 3.6; flow rate 0.7 ml.min⁻¹, internal standard betaxolol (BX). For isolation of the substances from urine, liquid-liquid extraction and re-extraction with freezing out the aqueous phase in all extraction steps was used. The extraction yields were 97, 99, 83, 92 and 101 % for DM, DEX, HM, MM and BX, respectively. The method was used for determination of phenotype of cytochrome P 450 of isoenzyme 2D6 in a set of 102 healthy, unrelated volunteers from Czech population. In dependence on molar concentration ratios of DM and DEX in urine (metabolic ratio, MP), seven volunteers (6.9 %) were classified as slow and 95 (93.1 %) as rapid metabolizers of DM (MP < 0.3). The median in the former group was 1.3 (0.37–4.6) and 0.007 (0.0001–0.18) in the latter.

Ústav jaderného výzkumu Řež a.s. přijme do centrální analytické laboratoře

1 pracovníka výzkumu a vývoje

pro oblast analýzy jaderných materiálů metodami hmotnostní spektrometrie, příp. analýzy vzorků životního prostředí na obsah radionuklidů a těžkých kovů.

Požadavky: VŠ vzdělání v oblasti jaderné nebo analytické chemie, praxe v oboru, znalost anglického jazyka, práce na PC, schopnost samostatné práce a rozhodování. Vědecká hodnota vítána.

Nabízíme: možnost realizace ve vedení pracovních týmů, možnost odborného růstu, účast v mezinárodních projektech, odpovídající platové podmínky.

Kontakt: ÚVJ Řež a.s., divize reaktorových služeb, 250 68 Řež, RNDr. Málek, CSc., tel. 02/6617 2485, nebo Ing. Kysela, CSc., tel. 02/6617 3526

PŘÍPRAVA A OVĚŘENÍ STANDARDNÍCH ROZTOKŮ NIKLU, SELENU, THALIA A ZINKU

OTO MESTEK, VOJTĚCH HRUBÝ
a MILOSLAV SUCHÁNEK

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 6, 166 28 Praha 6, e-mail: Oto.Mestek@vscht.cz

Došlo dne 27.V.1999

Klíčová slova: nikl, selen, thalium, zinek, nejistota, standardní roztok

Úvod

Návaznost chemických měření (určování látkového množství) bývá realizována souborem referenčních materiálů: od primárních referenčních materiálů, přes certifikované referenční materiály až k vnitrolaboratorním referenčním materiálům. Mol je veličina, jejíž jednotku nelze realizovat artefaktem, primární etalon (primární referenční materiál) nemůže proto být konečným článkem schématu návaznosti, ale je nutno zajistit jeho návaznost na základní jednotku SI soustavy a to nejlépe pomocí primárních měřicích metod, které vykazují nejvyšší stupeň správnosti a přesnosti. Z metrologického hlediska se chemická měření mohou dělit do tří kategorií¹. Primární metody využívají k získání výsledku výpočet založený na platných fyzikálních a chemických zákonech, vlastní měření má přímou návaznost na SI. Relativní metody porovnávají signál příslušející vzorku se sadou kalibračních vzorků o známém obsahu, matriční efekty mají zanedbatelný vliv. Komparativní metody také využívají srovnání vzorku se sadou standardů, významně se zde ale uplatňují matriční efekty. V současné praxi nalézají nejširší uplatnění právě metody relativní a komparativní. Metrologická kalibrace zajišťující návaznost k SI jednotce mol se u komparativních metod provádí výhradně pomocí maticových CRM.

Kalibraci relativních metod je možno provádět pomocí roztoků čistých chemikálií. Aby nebyl přerušen řetězec návaznosti, musí být tyto kalibrační roztoky navázané k molu a kromě koncentrace samotné musí být stanovena také její nejistota. Tyto roztoky budeme nazývat standardní roztoky (SR). Pro přípravu SR nestačí pouze rozpustit velice čistou chemikálii, ale je nutno provést ověření její koncentrace metodou vykazující dobrou návaznost, tedy některou primární metodou. Takto připravené roztoky pak slouží jako spojovací článek mezi primárními metodami a rutinními metodami analýzy.

Cílem předložené studie je na příkladu niklu, selenu, thalia a zinku ukázat možnou přípravu SR kovů a jejich ověření pomocí gravimetrických a titračních metod tak, aby byly zachovány všechny požadavky návaznosti a metrologické kalibrace.

Experimentální část

Chemikálie

SR niklu, thalia a zinku byly připraveny z velmi čistých kovů (všechny stupně čistoty puriss., Fluka, Buchs, Switzer-

land), SR selenu byl připraven z hydrátu seleničitanu sodného (Lachema Brno, ČR), kyselina dusičná použitá k rozpouštění kovů byla stupně Suprapure (Merck, Darmstadt, Germany). Chelaton 3 použitý k titračnímu stanovení byl čistoty p.a. (Lachema, Brno, ČR), stejně jako chlorid olovnatý, který byl navíc přečištěn krystalizací z redestilované vody. Jeho čistota byla ověřena analýzou obsahu nečistot metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a je větší než 99,99 %. Ke gravimetrickému stanovení byla použita tato srážedla: chroman draselný (Lachema Brno, ČR), biacetyldioxid (Fluka, Buchs, Switzerland) a kyselina chinaldinová (Aldrich, Milwaukee, WI). Pomocné chemikálie (metalochromní indikátory murexid a xylenolová oranž, hexamethylentetramin, amoniak, octan amonný, octan sodný, octová kyselina, chlorovodíková kyselina, hydroxid sodný, ethanol, aceton) použité při chelatometrickém a gravimetrickém stanovení kovů a přípravě SR byly všechny čistoty p.a. (Lachema Brno, ČR). Kalibrační roztoky pro AAS byly připraveny ředěním z roztoků obsahujících 1 mg.ml⁻¹ příslušných kovů (Merck, Darmstadt, Germany). Voda použitá pro přípravu všech roztoků byla buďto dvakrát destilovaná nebo demineralizovaná (Milli – Q system, Millipore, Bedford, MA, USA).

Přístroje a pomůcky

Veškeré použité odměrné nádoby (pipety 20, 50 a 100 ml a byreta 25 ml) bylo třídy A a před použitím bylo vyčištěno loužením v chromsírové směsi. Vážení bylo prováděno na vahách Mettler Toledo AB204 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) externě kalibrovaných pomocí závaží 100 g (sekundární etalon I. řádu – E 2) ověřeného v laboratořích Českého metrologického institutu. Stanovení zbytkového obsahu zinku ve filtrátu a promývací vodě po gravimetrickém stanovení bylo provedeno měřením atomovou absorpční spektrometrií (AAS) na přístroji GBC 332 (GBC, Dandenong, Victoria, Australie), stanovení zbytkového množství niklu, selenu a thalia bylo provedeno metodou ICP-MS (PE Elan 6000, Perkin-Elmer/Sciex, Norwalk, CT, USA). Kontrola pH při chelatometrickém stanovení kovů byla prováděna pomocí pH-metru OP-201/2 (Radelkis, Hungary).

Příprava SR

Nikl byl k dispozici v podobě prášku a byl rozpouštěn bez dalších úprav. Zinek a thalium (granulované thalium je uchováno pod vodou) byly od výrobce k dispozici v podobě kousků o průměrné velikosti 5 mm. Kovy byly krátce opláchnuty zředěnou kyselinou dusičnou (1 + 9), pak vodou a odmaštěny acetonem. Po oschnutí bylo odváženo do 250 ml PP kádinky přibližně po 2 g kovů a navážky byly rozpuštěny ve 100 ml zředěné (1 + 1) kyseliny dusičné. Roztoky byly převedeny do 2 l odměrných baněk, doplněny vodou na objem a převedeny do 2 l PP zásobních lahví. Roztoky jsou uchovávány v chladničce při teplotě 4 °C.

SR selenu o koncentraci přibližně 1 mg.ml⁻¹ byl připraven rozpouštěním vypočtené navážky hydrátu seleničitanu sodného v redestilované vodě, roztok byl okyselen 50 ml koncentrované kyseliny dusičné a převeden do 2 l odměrné baňky. Protože výchozí sloučenina byl hydrát neurčitého složení, byl tento připravený roztok nejprve porovnán s podobným komerčním roztokem (Merck) obsahujícím známé množství selenu měře-

ním metodou ICP-MS. Po provedení srovnání bylo ke standardnímu roztoku přiváženo ještě další množství seleničitanu takové, aby se celková koncentrace selenu blížila hodnotě 1 mg.l^{-1} . Roztok byl převeden do 2 l polyethylenové zásobní lahve a uchováván v chladničce při teplotě 4°C .

Nádobí (kádinky, odměrné baňky a lahve) použité pro přípravu všech SR bylo nové a bylo před použitím čištěno loužením ve zředěné (1 + 9) kyselině dusičné po dobu několika týdnů. Pro přípravu každého z roztoků byla použita originální sada nádobí.

Gravimetrické stanovení prvků^{2,3}

Stanovení niklu

50 ml SR niklu se naředilo vodou na objem přibližně 150 ml a roztok se zneutralizoval zředěným (1 + 1) roztokem amoniaku na bromthymolovou modř a okyselil několika kapkami zředěné (1 + 1) kyseliny chlorovodíkové do barevného přechodu indikátoru. Roztok se zahřál k varu, nikl se srazil 30 ml 1 %-ního roztoku dimethyldioximu v ethanolu a roztok se zneutralizoval přidávkem zředěného amoniaku. Po jednohodinovém stání na teplé topné desce se sraženina odfiltrovala zváženým skleněným filtračním kelímkem G4 a promyla a spláchla horkou destilovanou vodou. Sraženina se vážila po vysušení při 120°C . Poměr⁴ $M(\text{Ni})/M(\text{Ni}(\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2)_2)$ má hodnotu 0,20315. Spojený roztok filtrátu a promývací vody (300–350 ml) se převedl do kádinky ve které se srazilo a po okyselení 5 ml koncentrované kyseliny dusičné se v něm stanovil zbytkový obsah niklu metodou ICP-MS.

Stanovení selenu

200 ml (odpipetováno dvakrát 100 ml) SR selenu se na topné desce odpařilo na objem zhruba 50 ml, roztok byl zneutralizován zředěným roztokem amoniaku (1 + 9) do mírného zápachu amoniaku a potom byl okyselen 1 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (1 + 9). Roztok se přivedl k varu a selen se vyredukoval přidávkem asi 1 g síranu hydrazinia. Červený selen byl zahřátím k varu převeden na šedý selen, který se odfiltroval zváženým skleněným filtračním kelímkem G4. Po promytí horkou vodou byly ze sraženiny odstraněny matečné louhy trojnásobným promytím 96 % ním ethanolom. Sraženina se vážila po vysušení 105°C . Obsah zbytkového selenu ve filtrátu a promývacím roztoku byl stanoven metodou ICP-MS.

Stanovení thalia

100 ml SR thalia se zneutralizovalo zředěným roztokem (1 + 1) amoniaku, roztok byl zahřát k varu a thalium se srazilo 30 ml 10 %-ního roztoku chromanu draselného. Po ochlazení a 16-ti hodinovém stání se sraženina spláchla 1 %-ním roztokem chromanu draselného a odfiltrovala zváženým skleněným filtračním kelímkem G4, promyla se 80 %-ním roztokem acetonu a vysušila při 120°C . Poměr⁴ $2.M(\text{Tl}) / M(\text{Tl}_2\text{CrO}_4)$ má hodnotu 0,77896. Obsah thalia ve filtrátu a promývacím roztoku byl stanoven metodou ICP-MS.

Stanovení zinku

50 ml SR zinku se naředilo vodou na objem přibližně 100 ml a zneutralizovalo se 10 %-ním hydroxidem sodným do

prvního trvalého zákalu. Roztok se zneutralizoval 10 % ním roztokem kyseliny octové na methylčerveň, zahřál k varu a zinek se srazil 12 ml 3 %-ního roztoku chinaldinanu sodného (3 g kyseliny chinaldinové v přibližně 50 ml vody se zneutralizuje 10 %-ním hydroxidem sodným na fenolftalein a roztok se doplní na 100 ml). Sraženina se odfiltrovala zváženým skleněným filtračním kelímkem G4 a promyla a spláchla horkou destilovanou vodou. Sraženina se vážila po vysušení při 120°C . Poměr⁴ $M(\text{Zn})/M(\text{Zn}(\text{C}_{10}\text{H}_6\text{NO}_2)_2\text{H}_2\text{O})$ má hodnotu 0,15288. Spojený filtrát a promývací voda (300–350 ml) byl zpracován stejně jako v předešlých případech a obsah zinku byl stanoven metodou AAS.

Titrační stanovení kovů⁵

Stanovení niklu

Do titrační baňky se odpipetovalo 20 ml SR niklu, přidaly se dvě kapky 0,2 %-ního vodného roztoku murexidu a pH se upravilo přidávkem amoniaku do přechodu indikátoru do žluté barvy. Nikl se titroval roztokem chelatonu 3 o koncentraci $0,018 \text{ mol.l}^{-1}$ a těsně před dosažení bodu ekvivalence se přidalo ještě 5 ml koncentrovaného amoniaku.

Stanovení zinku

Do titrační baňky se odpipetovalo 20 ml SR zinku, pH bylo za potenciometrické kontroly upraveno nasyceným roztokem hexamethylentetraminu na hodnotu 5,5, objem roztoku byl upraven na 75 ml a přidaly se čtyři kapky 0,2 %-ního vodného roztoku xylenolové oranže. Titrace se prováděla roztokem chelatonu 3 o koncentraci $0,014 \text{ mol.l}^{-1}$.

Stanovení přesné koncentrace roztoků chelatonu 3

Navážka chloridu olovnatého (přibližně 80 mg pro koncentraci chelatonu 3 $0,014 \text{ mol.l}^{-1}$ a 100 mg pro koncentraci $0,018 \text{ mol.l}^{-1}$) se v titrační baňce rozpustila ve vodě, roztok se okyselil 0,4 ml kyseliny dusičné 1 mol.l^{-1} a pH bylo za potenciometrické kontroly upraveno nasyceným roztokem hexamethylentetraminu na hodnotu 5,8. Objem roztoku byl upraven na 75 ml a přidaly se čtyři kapky 0,2 %-ního roztoku xylenolové oranže a provedla se titrace.

Teplota analyzovaných SR, stejně jako teplota roztoku chelatonu byla udržována během operací na $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Výsledky a diskuse

Stanovení nejistot primárních operací

Vážení

Nejistota vážení na analytických vahách se skládá z několika složek. První složka odpovídá nejistotě kalibrace vah. Závaží použité ke kalibraci mělo jmenovitou hodnotu 100 g, odchylka od jmenovité hodnoty je $+0,01 \text{ mg}$ a standardní nejistota jmenovité hodnoty je $0,025 \text{ mg}$, viz⁶. Relativní nejistota kalibrace představuje tedy hodnotu přibližně $0,00003 \%$.

Tato složka nejistoty byla v dalších výpočtech zanedbána. Další složka nejistoty vážení odpovídá nelinearitě vah. Její hodnota byla odhadnuta na základě literárních údajů⁷ jako 0,05 mg. Část nejistoty vážení odpovídající opakovatelnosti byla stanovena opakovaným vážením ($n = 15$) 20 g závaží a má hodnotu 0,06 mg. Kombinace obou složek nejistot vede ke kombinované nejistotě vážení $u(m_1) = 0,08$ mg. Nejistota $u(m_1)$ má význam při přímém odvažování předmětů, odhad nejistoty vážení sraženiny sušené v kelímku do konstantní hmotnosti byl získán opakovaným vážením skleněného kelímku se sraženinou tak, že první vážení bylo provedeno po šestihodinovém sušení a další vážení vždy po dalším jednohodinovém sušení. Kelímky se sraženinou byly vždy před vážením uchovávány v exsikátoru po dobu 30 min. Opakovatelnost takového vážení má hodnotu 0,11 mg, což po kombinaci s nejistotou linearit vah vede ke kombinované nejistotě vážení $u(m_2) = 0,12$ mg.

Odměrování objemu

Kalibrace a stanovení nejistoty objemu odměrného nádobí (pipety a byreta) bylo prováděno opakovaným vážením odměřeného objemu redistilované vody v uzavřené váze. Teplota vody byla nastavena na $20 \pm 0,5$ °C. Při vážení vody se významně uplatňuje vztlak vzduchu: hustota vody je přibližně $999 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, váhy jsou však kalibrovány pomocí mosazného závaží o hustotě $8\,400 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Naměřená hmotnost byla proto na tento vztlak korigována. Standardní nejistoty odměrování objemu pomocí pipet jsou uvedeny v tabulce I. Za povšimnutí stojí zejména výborné vlastnosti téměř 60 let staré 50 ml pipety. Údaje získané vážením objemu vody vypuštěného z byrety byly použity pouze k její kalibraci. Nejistota vlastního odměrování objemu pomocí byrety zjištěná vážením (přibližně 0,01 ml pro 25 ml byretu) je mnohem nižší než nejistota spojená s odhadem bodu ekvivalence titrace za vizuální kontroly pomocí barevného indikátoru. Pro titraci zředěnými odměrnými roztoky může rozpětí, v němž leží bod ekvivalence, dosáhnout hodnoty až 0,05 ml, což odpovídá standardní nejistotě $0,05/\sqrt{3} = 0,029$ ml. Tato hodnota nejistoty byla uvažována i v dalších výpočtech.

Výpočet koncentrace chelatonu 3 a její nejistoty

Koncentrace c [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] roztoků chelatonu 3 se vypočte podle vztahu:

$$c = \frac{m_{\text{PbCl}_2}}{M_{\text{PbCl}_2} \cdot V_b} \quad (1)$$

Tabulka I

Standardní nejistoty odměrování objemu pomocí pipet

Objem	n	Střední hodnota [ml]	$u(V)$ [ml]
Pipeta 20 ml	15	19,97	$u(V_{20}) = 0,0086$
Pipeta 50 ml	12	50,00	$u(V_{50}) = 0,0092$
Pipeta 100 ml	12	99,97	$u(V_{100}) = 0,016$

kde V_b je spotřeba roztoku chelatonu 3 [ml] korigovaná na skutečný objem byrety a m_{PbCl_2} je hmotnost navážky chloridu olovnatého [mg]. Standardní nejistota molární hmotnosti chloridu olovnatého M_{PbCl_2} má hodnotu $0,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Opomene-li nejistotu způsobenou titrační chybou (barevný přechod indikátoru nenastává přesně v bodě ekvivalence) a nejistotu hmotnostního zlomku chloridu olovnatého, lze vypočítat nejistotu koncentrace chelatonu 3 podle vztahu⁷:

$$u(c) = c \cdot \sqrt{\frac{u(m_{\text{PbCl}_2})^2}{m_{\text{PbCl}_2}^2} + \frac{u(V_b)^2}{V_b^2} + \frac{u(M_{\text{PbCl}_2})^2}{M_{\text{PbCl}_2}^2}} \quad (2)$$

Vstupní údaje i vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce II. Relativní nejistoty obou koncentrací dosahují shodné hodnoty přibližně 0,2 %. Hodnota $u(\bar{c})$ má význam nejistoty průměrné koncentrace získané z n měření, zatímco hodnota $u(c)$ je nejistota jednotlivých výsledků. Pro výpočet nejistoty průměrné koncentrace je nutno zvážit, jak se do ní započítají jednotlivé složky. Vážení chloridu olovnatého a odměrování objemu byretou se opakuje s každou jednotlivou analýzou, do rovnice pro výpočet nejistoty průměrné koncentrace je proto nutné do jmenovatelů zlomků odpovídajících těmto příspěvkům doplnit počet analýz n . Složka nejistoty odpovídající molární hmotnosti chloridu olovnatého se nemění. Tabulka II pro ilustraci obsahuje i experimentálně získané hodnoty opakovatelnosti jednotlivých výsledků $s(c)$ (směrodatná odchylka vypočtená z n opakování). V případě roztoku chelatonu 3 pro stanovení niklu je hodnota opakovatelnosti ($0,000034 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) mírně vyšší než odhad nejistoty ($0,000030 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Tento rozdíl je však zřejmě způsoben náhodnými vlivy a pomocí statistického testu χ^2 nelze obě hodnoty rozlišit.

Výpočet koncentrace SR a její nejistoty

Titrační stanovení

Výslednou koncentraci stanovovaného kovu $\rho(\text{Me})$ [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] získanou titračním stanovením lze vypočítat podle vztahu:

$$\rho(\text{Me}) = \bar{c} \cdot M(\text{Me}) \cdot \frac{V_b}{V_p} \cdot 1000 \quad (3)$$

kde $M(\text{Me})$ je atomová hmotnost stanovovaného kovu [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$], V_b je spotřeba chelatonu 3 [ml] korigovaná na skutečný objem byrety a V_p je korigovaný pipetovaný objem SR [ml]. Kombinovaná nejistota $u(\rho(\text{Me}))$ odpovídající nejistotě individuálních hodnot koncentrací se vypočte podle vztahu:

$$u(\rho(\text{Me})) = \rho(\text{Me}) \cdot \sqrt{\frac{u(\bar{c})^2}{\bar{c}^2} + \frac{u(V_b)^2}{V_b^2} + \frac{u(V_p)^2}{V_p^2} + \frac{u(M(\text{Me}))^2}{M(\text{Me})^2}} \quad (4)$$

Tabulka II
Nejistota koncentrace c chelatonu 3

Parametr	Stanovení	
	Ni	Zn
n	10	12
$m(\text{PbCl}_2)$ [mg] (střední hodnota)	101	78
$u(m(\text{PbCl}_2))$ [mg] $\approx u_r(m(\text{PbCl}_2))$	0,08 \approx 0,08 %	0,08 \approx 0,10 %
V_b [ml] (střední hodnota)		20
$u(V_b)$ [ml] $\approx u_r(V_b)$		0,029 \approx 0,15 %
M_{PbCl_2} [g.mol ⁻¹]		278,11
$u(M_{\text{PbCl}_2})$ [g.mol ⁻¹] $\approx u_r(M_{\text{PbCl}_2})$ [%]		0,05 \approx 0,018 %
\bar{c} [mol.l ⁻¹]	0,01786	0,01431
$u(\bar{c})$ [mol.l ⁻¹]	0,000010	0,000008
$u(c)$ [mol.l ⁻¹]	0,000030	0,000026
$s(c)$ [mol.l ⁻¹]	0,000034	0,000025

Tabulka III
Chelatometrické stanovení koncentrace $\rho(\text{Me})$ v SR niklu a zinku

Parametr	Stanovení	
	Ni	Zn
n	11	12
V_p [ml]		19,97
$u(V_p)$ [ml] $\approx u_r(V_p)$		0,0086 \approx 0,043 %
V_b [ml] (střední hodnota)	19,0	21,5
$u(V_b)$ [ml] $\approx u_r(V_b)$	0,029 \approx 0,15 %	0,029 \approx 0,13 %
$M(\text{Me})$ [g.mol ⁻¹]	58,6934	65,39
$u(M(\text{Me}))^4$ [g.mol ⁻¹] $\approx u_r(M(\text{Me}))$	0,0001 \approx 0,00017 %	0,01 \approx 0,015 %
\bar{c} [mol.l ⁻¹]	0,01786	0,01431
$u(\bar{c})$ [mol.l ⁻¹] $\approx u_r(\bar{c})$	0,000010 \approx 0,055 %	0,000008 \approx 0,0056 %
$\bar{\rho}(\text{Me})$ [mg.l ⁻¹]	997	1009
$u(\bar{\rho}(\text{Me}))$ [mg.l ⁻¹]	0,7	0,7
$u(\rho(\text{Me}))$ [mg.l ⁻¹]	1,6	1,6
$s(\rho(\text{Me}))$ [mg.l ⁻¹]	1,6	1,7

Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce III. Veličina $u(\bar{\rho}(\text{Me}))$ má význam nejistoty průměrné hodnoty koncentrace získané z n stanovení. Při jejím výpočtu bylo opět vzato do úvahy, že standardní nejistoty koncentrace chelatonu a atomové hmotnosti kovu se s počtem analýz nemění, zatímco standardní nejistoty parametrů mající charakter náhodných vlivů (oba objemy) je nutno dělit odmocninou z počtu opakování.

Gravimetrické stanovení

Výslednou koncentraci daného prvku $\rho(\text{Me})$ [mg.l⁻¹] získanou gravimetrickým stanovením lze vypočítat podle vztahu:

$$\rho(\text{Me}) = f \cdot m_p \cdot \frac{1000}{V_p} + \Delta\rho(\text{Me}) \quad (5)$$

kde f je gravimetrický faktor, V_p je korigovaný pipetovaný objem SR [ml], m_p je hmotnost sraženiny a $\Delta\rho(\text{Me})$ je korekce na zbytkové množství kovu rozpuštěné ve filtrátu a promývací vodě. Kombinovaná nejistota jednotlivých výsledků koncentrací se vypočte podle vztahu:

$$u(\rho(\text{Me})) = \sqrt{\rho^2(\text{Me}) \cdot \left(\frac{u(f)^2}{f^2} + \frac{u(m_p)^2}{m_p^2} + \frac{u(V_p)^2}{V_p^2} \right) + u(\Delta\rho(\text{Me}))^2} \quad (6)$$

Standardní nejistota hmotnosti sraženiny má hodnotu $\sqrt{2} \cdot u(m_p)$ (diferenční vážení: váží se prázdný kelímek a kelí-

Tabulka IV
Gravimetrické stanovení koncentrace $\rho(\text{Me})$ ve standardních roztocích

Parametr	Stanovení			
	Ni	Tl	Se	Zn
n	4	4	6	4
f	0,20315	0,77896	1	0,15288
$u(f) \approx u_r(f)$	0,00005 \approx 0,025 %	0,00001 \approx 0,001 %	0	0,000024 \approx 0,016 %
V_p [ml]	50,00	99,97	199,94	50,00
$(V_p) \approx u_r(V_p)$	0,0092 \approx 0,018 %	0,016 \approx 0,016 %	0,023 \approx 0,011 %	0,0092 \approx 0,018 %
m_p [mg] (střední hodnota)	245,1	128,3	200,0	328,7
$u(m_p) \approx u_r(m_p)$	0,17 \approx 0,06 %	0,17 \approx 0,13 %	0,17 \approx 0,09 %	0,17 \approx 0,05 %
$\Delta\rho(\text{Me})$ [mg.l ⁻¹]	6,0	16,0	0,5	2,9
$u(\Delta\rho(\text{Me})) \approx u_r(\Delta\rho(\text{Me}))$	0,3 \approx 5 %	0,8 \approx 5 %	0,025 \approx 5 %	0,15 \approx 5 %
$\bar{\rho}(\text{Me})$ [mg.l ⁻¹]	1002	1015	1001	1008
$u(\bar{\rho}(\text{Me}))$ [mg.l ⁻¹]	0,4	0,7	0,5	0,3
$u(\rho(\text{Me}))$ [mg.l ⁻¹]	0,8	1,5	1,2	0,6
$s(\rho(\text{Me}))$ [mg.l ⁻¹]	0,5	1,2	0,9	0,5

Tabulka V
Výsledné koncentrace a rozšířené nejistoty koncentrací standardních roztoků, výsledky jsou udány v mg.l⁻¹

Parametr	Stanovení			
	Ni	Tl	Se	Zn
Dodané množství	1002	1017	–	1010
Titrační stanovení	997 \pm 1	–	–	1009 \pm 1
Gravimetrické stanovení	1002 \pm 1	1015 \pm 1	1000 \pm 1	1008 \pm 1
Rozšířená nejistota roztoků Merck	\pm 2	\pm 2	\pm 10	\pm 2

mek se sraženinou). Standardní relativní nejistotu korekce $\Delta\rho(\text{Me})$ lze odhadnout ze zkušeností s měřením metodami AAS a ICP-MS a nebude jistě větší než 5 %. I hrubý odhad nezatíží konečnou kombinovanou nejistotu velkou chybou; nejvyšší hodnoty dosáhla korekce $\Delta\rho(\text{Me})$ v případě stanovení thalia, avšak i v tomto případě tvoří její nejistota pouze menší příspěvek ke kombinované nejistotě celkové koncentrace prvku. Výsledky výpočtů jsou uvedeny v tabulce IV. Pro výpočet kombinované nejistoty průměrné koncentrace $u(\bar{\rho}(\text{Me}))$ byl gravimetrický faktor uvažován jako systematický vliv, ostatní parametry (odměřování objemu, vážení a korekce na zbytkové množství kovu) lze považovat za vlivy mající náhodný charakter a jejich standardní nejistoty je nutno pro účel toho výpočtu dělit odmocninou z počtu opakování analýz.

Shrnutí výsledků

Gravimetrické a titrační metody analýzy patří v dnešní době bohužel už k téměř zapomenutému umění. Jak ale bylo ukázáno na tomto příkladu, pro ověření koncentrace standardních roztoků prvků jsou nezastupitelné. Výsledky obou metod ověření koncentrací standardních roztoků včetně rozšířených nejistot (koeficient rozšíření 2) po zaokrouhlení na

jednu platnou cifru jsou uvedeny v tabulce V. Je patrné, že obě metody poskytly shodné hodnoty nejistot, u titračního stanovení bylo proto ale potřeba zvýšit počet analýz. Již dříve⁸ byla demonstrována na případě kadmia, mědí a olova dobrá shoda mezi výsledky gravimetrického a chelatometrického stanovení. Tato shoda byla potvrzena i pro stanovení zinku, v případě niklu však obě metody shodné výsledky neposkytly. Je to pravděpodobně způsobeno chybným určením bodu ekvivalence při tomto stanovení. Malý rozdíl mezi nalezenou a teoretickou hodnotou koncentrace v případě thalia a zinku byl zřejmě způsoben nedostatečným očištěním naoxidovaného povrchu granulí kovů.

Díky podstatnému omezení řady systematických vlivů pomocí kalibrace odměrného nádobí a vah se podařilo snížit rozšířenou nejistotu koncentrace SR až na hodnotu 1 mg.l⁻¹, což je hodnota poloviční oproti běžně udávaným 2 mg.l⁻¹ pro kalibrační roztoky kovů vyráběné komerčními výrobci, jako je Merck a pod. Pro kalibrační roztok selenu je dokonce udávaná hodnota nejistoty 10 mg.l⁻¹, v tomto případě se však jedná o roztok dodávaný bez certifikátu a není zřejmé, jakým způsobem byla tato hodnota vypočtena.

Vznik této práce byl podpořen grantem Ministerstva životního prostředí České republiky MR/14/95.

LITERATURA

1. ISO Guide 32: *Calibration of Chemical Analyses and Use of Certified Reference Materials*, ISO, 1995 (draft).
2. Jílek A., Koča J.: *Vážková analýza a elektroanalýza*, díl II. TVV, Praha 1951.
3. Kodama K.: *Methods of Quantitative Inorganic Analysis*. Wiley, New York 1963.
4. IUPAC: *Pure Appl. Chem.* 70, 237 (1998).
5. Příbyl R.: *Komplexometrie*. SNTL, Praha 1977.
6. Ověřovací list č. 153-OL-3231/98. Český metrologický institut, Praha 1998.
7. EURACHEM: *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, český překlad: Stanovení nejistoty analytického měření. Eurachem-ČR, Praha 1996.
8. Mestek O., Suchánek M., Hrubý V: *Accred. Qual. Assur.* 4, 307 (1999).

O. Mestek, V. Hrubý, and M. Suchánek (*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Pra-*

gue): Preparation and Testing of Standard Solutions of Nickel, Selenium, Thallium, and Zinc

Solutions of Ni, Tl and Zn of concentrations about 1000 mg.l⁻¹ were prepared by dissolving the pure metals in HNO₃, whereas the Se solution was prepared by dissolving sodium selenite in water. The solution concentrations were verified by gravimetric analysis (using biacetyl dioxime for Ni, hydrazine for Se reduction, potassium chromate for Tl and quinaldinic acid for Zn) and by complexometric titration (Ni and Zn). The results of the two methods are close only for zinc. A slight difference between both methods was found with nickel. The gravimetric determination can be regarded as more reliable, the titration being more prone to error due to the inaccurate end point reading. The uncertainty of the concentrations for all solutions attained 1 mg.l⁻¹, which is half of that typically given for similar solutions by manufacturers. To achieve such precise results, bias must be eliminated to the highest possible extent, particularly by calibrating both the balance and volumetric glassware used.

DISKUSE

JAK DÁL V CHEMICKÉM PRŮMYSLU

VĚRA DULOVÁ

Mládeže 5, 169 00 Praha 6

Došlo dne 20.X.1999

Chemické listy (93, 405 (1999)) otiskly tři příspěvky významných osobností české vědy, vysokoškolské výuky a řízení, přičemž poslední vyzývá k diskusi. Dovoluji si proto předložit diskusní připomínky:

Předseda AV ČR prof. Rudolf Zahradník si uvědomuje nedostatečnost interakce výzkumu a průmyslu, přičemž navrhuje, aby průmysl vytvořil funkci „styčného důstojníka“, který by vyhledával partnery a témata. Skutečnost je však obrácená: ten, kdo chce prodat, je výzkum, který musí nabízet své výsledky průmyslu a který musí vyhledávat problémy, jež bolí a tlačí průmysl, případně nabízet jejich řešení nebo spoluréšení. Lze souhlasit, že takový vyslanec výzkumu musí být jak odborně, tak ekonomicky zdatný, zkrátka obchodník s duchem schopným prodat i eskymákům ledničku, ale zároveň vědecko-technicky čestný, dbalý svého jména a jména ústavu. Od zvaní osobností průmyslu na přednášky výzkumníků nelze očekávat velký přínos, protože pokud se ze slušnosti dostaví, tak jejich myšlení bude proti jejich vůli zatíženo provozními starostmi. Snad by bylo účelnější pořádat účelové přednášky ve výrobních závodech pro širší technickou veřejnost, u níž ev. vyvolaný zájem může případně pomoci k realizaci výsledků výzkumu v průmyslové praxi.

Prof. Josef Pašek se zamýšlí nad tím, zda obstojí český chemický průmysl v globalizovaném světě. V podstatě lze souhlasit, ale nutno zdůraznit, že český chemický průmysl, který musí převážně většinu surovin, zejména ropu, dovážet, nikdy nemůže mít aktivní bilanci exportu. Exportním sektorem bylo, je a bude strojírenství. Samozřejmě chemický průmysl se musí snažit o co nejnižší negativní saldo zahraničního obchodu. Je nutné si uvědomit, že mezinárodní chemické společnosti nepřipustí samostatný český export chemických specialit, i kdyby je český chemický průmysl měl k dispozici. V podstatě je dosud českému chemickému průmyslu umožněn export komoditních plastů, který bude ekonomicky efektivní dotud, pokud budeme mít k dispozici levnou ropu, dále kvalitní poloproducty či meziproducty pro chemické speciality. Z toho důvodu je pro chemický průmysl ČR jediná cesta: vstup do Evropské unie a následovně do Evropské federace chemického průmyslu, v rámci které bude chemickému průmyslu ČR umožněno sjednávat kooperace, tj. spolu se zahraničním partnerem vstup na zahraniční trhy i v oblasti chemických specialit, u kterých se prodává nejen hmota, ale i duševní majetek české vědecko-technické základny. Pro sjednávání kooperací je však nutno mít k dispozici kvalifikované obchodně-technické speciality, tj. zkušené chemické inženýry vybavené postgraduálním vzděláním v oblasti ekonomiky zahraničního obchodu (obráceně doškolení ekonomy na vysoce kvalifikované chemické inženýry není reálné).

Ing. František Dvořák, Svaz chemického průmyslu ČR, vyzývá k diskusi o společných výzkumně-vývojových projektech v chemickém průmyslu. K navrhovaným tezí lze poznamenat,

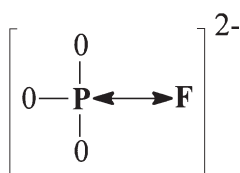
- že zapojení vědeckých a výzkumných pracovníků badatelského výzkumu do procesu sestavování plánů výzkumu chemických společností bylo a bude oboustranně prospěšné pro řízení chemického výzkumu, protože jediné takto lze koordinovat možnosti a potřeby, tj. zpětně formulovat požadavky chemických průmyslových společností na badatelská pracoviště,
- že již dříve se úspěšně osvědčily externí aspirantury výzkumných pracovníků z průmyslových podniků ve vědeckých ústavech AV a VŠ, naopak průmyslová praxe přiblížila vědecké pracovníky provozní realitě,
- že celoživotní systém vzdělávání o nejnovějších poznatcích badatelského výzkumu se osvědčuje v celém technicky vyspělém světě,
- že postupné rozšiřování kolektivu od badatelského přes výzkumný, poloprovozní včetně projekce až po najížděcí tým provozní jednotky se osvědčil. Jedná se zejména o osobní zodpovědnost za hodnověrnost výsledků formou závazných podkladů – samozřejmě vázanou na finanční ohodnocení všech účastníků po ukončení akce, tj. urychlení realizace. Vzácným příkladem může být právě prof. Josef Pašek, který dokázal převést vysokoškolský výzkum do průmyslového podniku – Moravských chemických závodů, Ostrava, kde se postupně vybudoval anilin 2000, anilin 8000 a pak anilin 50 kt/r, který nakonec produkuje 65 kt/r, a to díky nejen vynikajícím odborně pedagogickým znalostem, ale hlavně ohromné osobní vlastnosti „umění jednat s lidmi“, tj. stmelit různorodý tým jak profesně, tak charakterově do zaníceného tvůrčího kolektivu ve správném slova smyslu,
- že cílený badatelský výzkum, tj. vlastně výzkum na objednávku, nepotřebuje marketingovou propagaci, ale naopak ověřovací technologickou jednotku, a technologie, tak ev. z ní plynoucí nový produkt, potřebuje marketingovou propagaci s cílem prodeje potenciální licence či pro navázání partnerské kooperace se zahraničním partnerem a pro společný vstup na světové trhy,
- že inventura možností a profesní vybavenost, včetně reference osobností, by mělo být základním vybavením „styčného důstojníka“ akademických pracovišť při nabídce spolupráce tuzemským chemickým společenstvem,
- že vědecko-technický rozvoj bez technické politiky cíleného výzkumu a na tuto navazující investiční činnost je nemyslitelný, a musí být zaměřen na zvýšení ekonomické efektivnosti včetně zlepšení exportní výkonnosti, a to při respektování ekologických kritérií moderního chemického průmyslu,
- že centra špičkových průmyslových technologií a výrobků by měla zajistit nejen zapojení projekce a strojírenských vývojových dílen a výrobních strojírenských závodů tak, aby výsledkem byl nejen ověřovací poloprovoz, ale konečným produktem garanční jednotka pro nabídku ev. licence či navázání kooperace se zahraničním partnerem.

Prof. Luděk Holub (Chem. Listy 93, 464 (1999)) předkládá čtenářům historický přehled „Chemický průmysl českých zemí v období 1945–1990“, kde v rámci stručnosti uvádí, že „Po roce 1970 byla většina technologií nakupována především v USA a teprve v této době vznikala moderní petrochemie.“ K tomu je třeba poznamenat, že např. zplyňování mazutu musel český průmyslový výzkum dodělat: peletizace sazí a elementární síry, čištění odpadních vod, zdokonalení methanizace synplynu, zlepšení odsiřování surového plynu (dvoustupňové místo původního jednostupňového) a ve spolupráci s VŠCHT, katedra technologie silikátů: Shell-reaktor učinit provozu životným, protože vypadávala vyzdívka. Licenční smlouva byla však tak nešťastná, že po dobu 5ti let platila bezplatná vzájemná výměna zkušeností: výsledky českého průmyslového výzkumu si přivlastnil zahraniční licensor. Dal-

ším příkladem může být technologie ABS v Kaučuku, Kralupy, kde RNDr. Vladimír Myšík spolu s kolektivem Výzkumného ústavu syntetického kaučuku musel provozní jednotku nejen najet, ale hlavně dopracovat technologii do provozuschopného stavu, protože licensor před dokončením výstavby prostě zanikl. Tyto příklady je nutno třeba mít na paměti při jednání se zahraničními partnery, tj. v žádném případě nepřipustit likvidaci tuzemských výzkumně-vývojových pracovišť, protože jedině tato jsou jak odborně, tak jazykově schopna vstřebet modernizaci na základě zahraničních podkladů. Seriózní zahraniční partner si váží naší vědecko-výzkumné základny, která je nejen kvalitní, ale hlavně levnější. Lze se a priori domnívat, že podle postoje zahraničního partnera k české vědecko-výzkumné základně se pozná jeho spolehlivost.

Také struktury molekul či iontů mohou promlouvat

O řeči vzorců uvažoval už Fridrich August Kekulé, když v roce 1883 napsal: „... Strukturní vzorce jsou konkrétním vyjádřením velmi přesných představ. Nevyžadují komentáře a jsou pro toho, kdo je seznámen s principy řeči vzorců, snadno srozumitelné ve všech detailech, takže je naprosto nepotřebné zopakovat ještě jednou slovy myšlenky, které jsou jimi vyjádřeny. Vyhovují všem požadavkům, které lze mít na řeč chemických vzorců; je totiž účelem řeči vzorců uvést nás do stavu, v němž můžeme na malém prostoru přivést k vyjádření velký počet myšlenek, a to jednoznačným způsobem...“



Zdá se, že přání štěstí (pour féliciter) si pro poslední rok druhého tisíciletí zabudoval do své struktury i fluorofosfátový anion a promlouvá i k těm, kteří s řečí vzorců seznámeni nejsou. Nezbyvá, než se k tomuto iontu připojit.

František Liška a Alena Lišková

OSOBNÍ ZPRÁVY

SYMPOSION – o tom, že „Chemie je jen jedna“ konaný u příležitosti 75. narozenin prof. Ing. Milana Kratochvíla, CSc.

Katedra organické chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně uspořádala ve dnech 23. a 24. listopadu 1999 pod záštitou rektora prof. Jiřího Zlatušky slavnostní setkání organických chemiků a dalších spolupracovníků prof. Milana Kratochvíla u příležitosti oslav jeho 75. narozenin. Zúčastnilo se ho téměř 80 chemiků z České i Slovenské republiky.

Po úvodním slově vedoucího katedry organické chemie PřF MU prof. Milana Potáčka následovala gratulace za Masarykovu univerzitu proslavená prorektorem prof. Eduardem Schmidtem, ve které zhodnotil přínos jubilanta pro univerzitu. Poté prof. Kratochvíl převzal nejvyšší ocenění České společnosti chemické a Slovenské chemické společnosti. Byl též vyznamenán Palackého univerzitou v Olomouci. Slavnostní ceremoniál byl zakončen gratulacemi zástupců ostatních vysokých škol a dalších institucí (Lachema Brno, a. s., Merci, s.r.o. aj.) z České a Slovenské republiky a jeho blízkých spolupracovníků.

Jak už název naznačil – jednalo se o setkání spojené s oslavou narozenin – vědecký program byl, především v prvním dni, veden spíše filozoficky. Jednotliví přednášející poukazovali na souvislosti a přínosy jejich vědní disciplíny k rozvoji organické chemie. Na závěr prvního dne byl uspořádán velkolepý ohňostroj a společenský večer věnovaný diskusím a vzpomínání. V následujícím dni byla vystoupení přednášejících věnována oblastem odborného zájmu prof. Kratochvíla, tj. organické chemii, didaktice chemie a matematické chemii. V krátkých sděleních byly nastíněny trendy výzkumu na mateřské katedře a v laboratoři struktury a dynamiky biomolekul. Vrcholem programu byla přednáška „Jak zkoumat molekuly hmatem“ s praktickými ukázkami. Součástí odborného programu je také posterová sekce (v elektronické podobě přístupná na adrese: <http://www.chemi.muni.cz/~symp99>). Příspěvky věnované jubilantovi naleznete taktéž na uvedené adrese.

Stručně naznačený program ukázal, že odborný záběr prof. Kratochvíla byl velice široký. O uvedeném vypovídá i odborné curriculum vitae prof. Milana Kratochvíla.

Prof. Ing. Milan Kratochvíl, CSc. se narodil 20. prosince 1924 ve Stařeči. Středoškolské vzdělání ukončil v roce 1943 maturitou a následně byl totálně nasazen. V letech 1945–1949 byl posluchačem CHF VŠT v Brně, kde po absolutoriu působil do roku 1951 jako asistent. Po ukončení vojenské prezenční služby v roce 1953, pracoval jako odborný asistent na VTA v Brně a od roku 1961 v téže funkci na PřF UJEP (dnes MU) v Brně. Zde se v roce 1963 habilitoval a byl ustanoven docentem. Do roku 1972 přednášel organickou chemii. Potom byl nucen pedagogickou činnost zastavit. Následně působil na katedře organické chemie jako vědecký pracovník.

V roce 1979 byl přinucen Přírodovědeckou fakultu opustit a až do důchodového věku pracoval jako samostatný výzkumný pracovník ve Výzkumném ústavu čistých chemikálií, Lachema, kde se díky pochopení vedoucích pracovníků mohl

zabývat počítačem podporovanou organickou syntézou. Od roku 1990 je profesorem, později emeritním profesorem na katedře organické chemie PřF MU v Brně.

Zpracoval řadu učebních textů, ve kterých přicházel s neobvykle umělecky ztvárněnou grafickou úpravou, tehdy ještě obtížně prováděnou, s novým pohledem na výuku organické chemie. Ve svém přístupu důsledně vychází ze struktury molekul, vyhodnocuje reakční centra a z toho vyvozuje reaktivitu sloučenin. Pro svůj moderní přístup a vynikající přednes, spojený se společenskou elegancí, byl zván po spřátelených pracovištích. Ve vědeckovýzkumné práci (na KOCH do roku 1971) se zabýval studiem kyslíkatých heterocyklických sloučenin v aktivní spolupráci s významnými zahraničními pracovišti. Stál u zrodu Mezinárodního symposia o chemii heterocyklických sloučenin. Jak už jsme zmínili, po přechodu do VÚČCH Lachema se zaměřil na hledání logické struktury chemie a tvorbu jejího matematického modelu s praktickými výstupy (plánování organické syntézy apod.). S tím souvisí, že stál u zrodu hraničního vědního oboru – matematické chemie u nás. V uvedených oblastech je autorem či spoluautorem četných publikací.

Do dalších let života spojených s aktivní spisovatelskou činností, bez ní si jej už nedovedeme představit, mu přejeme hodně pevného zdraví a neutuchajících sil.

Milan Potáček a Jiří Šibor

Prof. Pavlu Kratochvílovi k sedmdesátinám

Když se caravella, na jejíž palubě cestovala v září r.1966 na sympozium do Tokia výprava československých makromolekulárních chemiků, mezi Hong-Kongem a Tokiem dostala do víru tajfunu a když tváře cestujících pozbývaly přirozené barvy, poznamenal suše jeden z nich: „Zdá se, že problém nedostatku funkčních míst v ústavu bude vyřešen“. (Problém vyřešen nebyl, neboť výprava dorazila bez úhony do Tokia a zpět do Prahy.) Pokud mne neklame paměť, byl autorem této poznámky dnešní sedmdesátník, prof. Ing. Pavel Kratochvíl, DrSc.

Uvádím tuto historku proto, že ilustruje jednu z charakteristických vlastností jubilantových: zachovat chladnou hlavu i ve zlých situacích a vyrovnávat se s nimi vtípem nebo lehkou ironií. Pomáhala mu i jindy, např. když přesně promyšlenými a jasně formulovanými návrhy nebo námitkami čelil mocným tohoto světa nebo když do střízlivých mezí uváděl nedomyšlené projekty. Humorem snižoval napětí, zbavoval diskusi politického nebo prestižního náboje a vnucoval jí věcnost.

Nezbytnými předpoklady tohoto jednání byla odvaha, pohotovost i pečlivá příprava. Nevím o skautské minulosti jubilantově, ale zdá se mi, že skautské „Buď připraven“ přijal za svou devizu: Chceš-li něčeho dosáhnout bez újmy na své cti, nespokoj se povrchní znalostí, uvažuj všechny stránky každého problému, neponechávej nic improvizaci a kriticky posuzuj i výsledky vlastní invence a práce. Pak můžeš jednat, publikovat, přednášet, učit, recenzovat, reprezentovat a řídit.

Jak jsem slychal, řídil se prof. Kratochvíl tímto heslem již jako student pražské Vysoké školy chemicko-technologické, později jako asistent VŠCHT v Pardubicích i jako aspirant v Ústavu makromolekulární chemie ČSAV v Praze. Z vlastní zkušenosti pak vím, že se toho hesla nevzdal ani na dalších stupních své vědecké kariéry v tomto ústavu: jako vedoucí laboratoře a vědeckého oddělení a posléze jako ředitel ústavu. Řídil se jím i v náročných funkcích školitele vědecké mládeže, vysokoškolského učitele, člena vědeckých rad vysokých škol a odborných komisí i jako zakládající člen Učené společnosti České republiky.

K pochopení prestiže a autority prof. Kratochvíla ve vědeckém světě nechť poslouží tento suchý a nepochybně neúplný seznam: více než 190 původních vědeckých sdělení, jedna vlastní monografie, příspěvky do tří mezinárodních monografií, více než 240 zvaných přednášek na zahraničních konferencích, univerzitách a ve výzkumných institucích. Tam jsou uloženy výsledky jeho soustavného a cílevědomého studia makromolekulárních systémů fyzikálně-chemickými metodami, zejména metodou rozptylu světla.

Přirozeným oceněním bylo udělení státní ceny, ceny ČSAV, stříbrné medaile Přírodovědecké fakulty Karlovy univerzity, medaile Vysokého učení technického v Brně, pozvání do redakčních rad zahraničních vědeckých časopisů a přijetí do významných zahraničních vědeckých společností a jejich

orgánů (britská Royal Society of Chemistry, Society of Chemical Industry UK, International Union of Pure and Applied Chemistry, International Symposia on Polymer Analysis and Characterization).

Domnívám se, že stejně milé může jubilantovi být vědomí, že jeho autorita a prestiž otvíraly cestu do světa mladší generaci pracovníků ústavu, že stále přitahuje do laboratoře, kterou vybudoval pro mládež z České republiky i ze zahraničí, a že vysoký standard a renomé laboratoře udržují i jeho bývalí žáci.

Funkci ředitele ÚMCH AV ČR přijal prof. Kratochvíl v roce 1990, v době, kdy se měnila česká společnost, česká ekonomika, Akademie věd i systém vědeckého výzkumu a kdy byla i v ústavu nutná některá nepříjemná opatření, včetně personálních. Víím, že otázka, jak je provést bez urážky důstojnosti druhých, byla předmětem dlouhých a důkladných úvah nového ředitele.

S funkcí ředitele vzal na sebe prof. Kratochvíl i úkol navázat na tradici, založenou prvním ředitelem ústavu, prof. O. Wichterlem. Tomuto úkolu čestně dostal. Jestliže v r. 1997 Dr. Bikales z americké National Science Foundation nalezl v oficiálním dokumentu pro ústav mimořádně lichotivá slova, ocenil tím i to, čím k prestiži ústavu přispěl prof. Kratochvíl jako vědec i jako ředitel.

Miloslav Bohdanecký

VÝUKA

ŠKOLNÍ POKUSY K TÉMATU SPONTÁNNÍ ENDOTERMICKÉ REAKCE

JAN ČIPERA^a, ZDENĚK MIČKA^b, MARTIN BÍLEK^c,
JIŘÍ BANÝR^d a LUBOR SVOBODA^e

^aKatedra učitelství a didaktiky chemie, ^bKatedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^cKatedra chemie, Pedagogická fakulta, Vysoká škola pedagogická, V. Nejedlého 573, 500 03 Hradec Králové, ^dKatedra chemie, Pedagogická fakulta, Univerzita Karlova, M. D. Rettigové 4, 116 39 Praha 1, ^eKatedra chemie a didaktiky chemie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita, Studentská 11, 370 05 České Budějovice

Došlo dne 18.X.1999

Klíčová slova: výuka chemie, spontánní endotermické reakce

Obsah

1. Úvod
2. Obecná východiska pro školní pokusy k tématu spontánní endotermické reakce a výběr vhodných reakcí
3. Reakce $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ s $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ jako modelový příklad spontánní endotermické reakce
4. Závěr

1. Úvod

Spontánnost chemických reakcí, které probíhají za konstantní teploty a tlaku, lze předpovědět z výpočtu změny Gibbsovy energie (ΔG) (cit.¹). Ta je závislá na změně entalpie (ΔH), tj. na reakčním teplu a na změně entropie systému (ΔS), v níž je zahrnuta jak entropie jednotlivých sloučenin, tak i další faktory, jako je počet a skupenství výchozích a vzniklých částic. Závislost mezi změnami Gibbsovy energie, entalpie a entropie lze vyjádřit vztahem

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

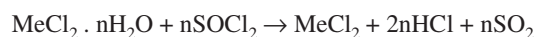
kde Δ představují rozdíl uvedených stavových veličin mezi konečným a výchozím stavem a indexy ⁰ znamenají, že hodnoty jsou vztaženy na standardní podmínky (25 °C; 0,1MPa; koncentrace výchozích látek v jednotkách mol).

Reakce za standardních podmínek probíhají spontánně jen v případě, že hodnota jejich ΔG^0 je záporná. Dlouhou dobu se předpokládalo, že spontánně mohou probíhat pouze exotermická reakce ($\Delta H^0 < 0$). Až J. Gibbs ukázal, že spontánně může probíhat i endotermický chemický děj ($\Delta H^0 > 0$) a to za předpokladu, že při něm dochází k výraznému vzrůstu entropie systému a že platí: $\Delta H \ll T\Delta S$. Hodnoty ΔS^0 , které lze v ně-

kterých případech zjistit z tabulek, jsou kladné a pro vznik produktů v chemické reakci příznivé, jestliže:

- a) reakce je provázena změnou skupenství pevného v kapalně či plynné nebo kapalného v plynné; zejména jestliže při reakci vznikají plynné produkty,
- b) počet molů produktů je podstatně větší než počet molů reaktantů.

První spontánní endotermickou reakci dekahydrátu síranu sodného s chloridem draselným popsal již v roce 1883 van't Hoff². Později se k tomuto problému vrátil v roce 1966 Matthues³. V didaktické oblasti se u nás problematika samovolného průběhu chemických reakcí stala v roce 1994 součástí učiva volitelného semináře pro IV. ročník gymnázií^{4,5}. Z dnes používaných učebnic, a to nejen v ČR (cit.⁵), ale i v zahraničí⁶⁻⁹, si mohou žáci tuto problematiku osvojit jen teoreticky. Na možnosti praktického využití spontánních endotermických reakcí v didaktické oblasti poukázal již v sedmdesátých letech Banýr. Ve své práci¹⁰ popsal reakce, při kterých se na krystalické chloridy některých kovů v oxidačním čísle II působí chloridem thionylu a které lze vyjádřit obecně rovnicí:



Z didaktického hlediska považuje autor za velice zajímavou zejména reakci chloridu thionylu s hexahydrátem chloridu kobaltnatého, protože její průběh je spojen se změnou barvy v důsledku změny koordinační sféry přechodného kovu. I když, jak uvádí autor, jsou uvedené reakce pro pochopení podstaty samovolně probíhajících endotermických reakcí významné, nenašly ve výuce vzhledem ke své experimentální náročnosti a aspektu bezpečnosti širší uplatnění. K problematice využití školních samovolných reakcí se u nás vrátil až v roce 1997 Bílek¹¹, který vyvinul počítačový měřicí systém pro jednoduché aplikace ve školní praxi, umožňující sledovat i teplotní změny spontánních endotermických reakcí.

V didaktické literatuře se dosud traduje, že provádění samovolných endotermických reakcí ve výuce je časově, materiálně i experimentálně náročné. Naší snahou bylo proto nalezení některých spontánně probíhajících reakcí za normální teploty, které pro jednoduchost provedení by byly vhodné pro využití ve výuce chemie.

2. Obecná východiska pro školní pokusy k tématu spontánní endotermické reakce a výběr vhodných reakcí

Na základě rozboru podmínek pro spontánní průběh endotermických reakcí a s přihlédnutím k didaktickým aspektům školní laboratorní praxe jsme vyhledávali takové pokusy, které splňují následující požadavky:

- při reakci vzniká větší počet molekul produktů oproti výchozím látkám a tím dochází k výraznému zvýšení entropie systému,
- při reakci dochází ke změně skupenství reagujících látek ve směru od pevné k plynné fázi,

- pro školní praxi se používají dostupné chemikálie a reakce vyžadují minimální materiálové zajištění (zkumavka nebo kádinka, teploměr, příp. tepelná izolace),
- průběh reakcí lze vizuálně sledovat z barevných změn nebo ze změny skupenských stavů reagujících látek,
- provedení reakcí je velmi jednoduché a odpovídá bezpečnostním hlediskům, například pouhé smísení příp. i nestechiometrických množství dvou pevných látek,
- empirické poznatky získané při provádění pokusů mohou žáci vysvětlit na základě dosud získaných vědomostí a dovedností.

Při vyhledávání vhodných pokusů jsme vycházeli z analogie se známou reakcí práškového zinku (hliníku, hořčíku) s jodem, ve které jako katalyzátor působí voda. Tuto reakci vyvolávají i některé krystalohydráty s vyšší tenzí vodní páry, než je tlak vodní páry v atmosféře. Takoveto hydráty uvolňují samovolně vodu, která pak působí jako katalyzátor dané reakce.

Podle výše uvedených požadavků na školní chemický experiment k danému tématu lze doporučit osm školních pokusů pro výuku chemie na středních, příp. i na základních školách. Jde o reakce pevného dekahydrátu uhličitánu sodného $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ nebo uhličitánu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ s následujícími látkami: $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Reakce lze provádět v tepelně izolovaných zkumavkách nebo kádinkách a změny teploty lze sledovat teploměrem zasunutým do reakční směsi. Průběh těchto reakcí je přitom tak průkazný, že není nutné dodržovat stechiometrické poměry reagujících složek a tepelnou izolaci reakčních systémů.

3. Reakce $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ s $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ jako modelový příklad spontánní endotermické reakce

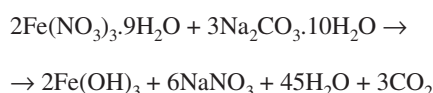
Provedení pokusu: v tepelně izolované zkumavce smícháme stechiometrická množství pevných látek $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Po promísení lze sledovat následující změny:

- a) pokles teploty na teploměru zasunutém do reakční směsi,
- b) vznik kapalné fáze obsahující tmavohnědě zabarvenou nerozpustnou látku,
- c) uvolňování plynného produktu.

Na základě pozorování těchto změn a dalších poznatků lze odvodit, že v systému:

- a) probíhá spontánní reakce, která vzhledem k poklesu teploty systému má endotermický průběh,
- b) v důsledku vyšších tenzí vodní páry krystalohydrátů dochází k uvolňování molekul vody a postupnému rozpouštění pevné fáze,
- c) vzniká tmavohnědý pevný produkt, kterým podle podmínek provedení reakce je $\text{Fe}(\text{OH})_3$ event. FeOOH ,
- d) uvolňuje se plynný produkt, který zaváděním do roztoku $\text{Ca}(\text{OH})_2$ lze identifikovat jako CO_2 .

Na základě uvedených skutečností lze sestavit příslušnou chemickou rovnici:



Podstatu průběhu této reakce lze vysvětlit tím že:

- a) při ní dochází v porovnání s reagujícími látkami ke vzniku velkého počtu molekul produktů,
- b) při reakci pevných látek vznikají ve velké míře produkty kapalného a plynného skupenství. Výsledkem je výrazný nárůst entropie ΔS , takže $\Delta H < T\Delta S$.

4. Závěr

Využitelnost navržených reakcí pro proces osvojování učiva o spontánním průběhu endotermických reakcí byla ověřena v seminářích pro studenty učitelství chemie na Přírodovědecké fakultě UK v Praze, na Zemědělské fakultě JU v Českých Budějovicích a v seminářích pro žáky vybraných středních škol.

Na základě získaných zkušeností lze říci, že zařazení navržených reakcí do pedagogické praxe středních škol je přínosné a užitečné. Pokusy jsou z hlediska experimentálních i finančních požadavků nenáročné a přinášejí řadu zajímavých pozorování, ze kterých mohou studenti odvodit celou řadu poznatků i z hlediska termodynamických zákonitostí průběhu chemických reakcí.

LITERATURA

1. Brdička R., Kalousek M., Schütz A.: *Úvod do fyzikální chemie*. SNTL, Praha 1972.
2. Schmidkunz H.: *Vom Berthelotschen Prinzip zur Triebkraft Chemischer Reaktionen*, PdN Chemie, Heft 11 (1982).
3. Matthues G. W. J.: *J. Chem. Ed.* 43, 476 (1966).
4. Čípera J.: *Chemie pro IV. ročník gymnazií*, 2. díl. SPN, Praha 1974.
5. Čípera J.: *Seminář a cvičení z chemie*. SPN, Praha 1987.
6. Neunfingerl F., Viehhauser M.: *Chemie I*. Bohmann Verlag, Wien 1989.
7. Häusler K.: *Chemie*. Oldenbourg, München 1989.
8. Moser A.: *Allgemeine und anorganische Chemie*. Pichler Verlag, Wien 1990.
9. Pazdro M. K., Danikiewicz W.: *Chemia dla licealistów*. Puzdro, Warszawa 1995.
10. Banýr J.: *Přírodní vědy ve škole* 8, 486 (1969–70).
11. Bílek M.: *Výuka chemie s počítačem*. Gaudeamus, Hradec Králové 1997.

J. Čípera^a, Z. Mička^b, M. Bílek^c, J. Banýr^d, and L. Svoboda^e (^a*Department of Teaching and Didactics of Chemistry*, ^b*Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*, ^c*Department of Chemistry, Pedagogical Faculty, Pedagogical University, Hradec Králové*, ^d*Department of Chemistry, Pedagogical Faculty, Charles University, Prague*, ^e*Department of Chemistry, Agriculture Faculty, South-Bohemian University, České Budějovice*): **School Experiments on Spontaneous Endothermic Reactions**

Appropriate systems illustrating spontaneous proceeding of chemical reactions are proposed for chemistry teaching purposes.

OBSAH

ÚVODNÍK	89
REFERÁTY	
<i>Ab initio</i> výpočty chemických posunů v biomolekulách	90
J. Czernek a V. Sklenář	
Afinitní kapilární elektrororéza	97
V. Pacáková, K. Štulík, S. Hubená a M. Tichá	
Mikrobiální produkcia farebných azafilónových metabolitov	105
M. Šturdíková, D. Slugeň, K. Lešová a M. Rosenberg	
Biologická a farmakologická aktivita lignanů	111
J. Slanina	
Materiály pro snižování hluku a vibrací	117
L. Lapčík, Jr., V. Cetkovský, B. Lapčíková a S. Vašut	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Spojení membránového vstupu s hmotnostním spektrometrem (MIMS)	123
P. Brož, E. Drbálková, P. Janderka, P. Sitko a J. Vřešťál	
Schopnosť baktérií viazať a premieňať selén na biologicky využiteľnú formu	129
J. Gronos a M. Mačor	
Stanovení dextromethorphanu a jeho metabolitů v moči metodou HPLC	132
G. Zimová, J. Chládek, J. Martínková a M. Beránek	
Příprava a ověření standardních roztoků niklu, selenu, thalia a zinku	136
O. Mestek, V. Hrubý a M. Suchánek	
DISKUSE	142
OSOBNÍ ZPRÁVY	144
VÝUKA CHEMIE	146

CONTENTS

EDITORIAL	89
REVIEW ARTICLES	
<i>Ab initio</i> Calculations of NMR Chemical Shifts in Biomolecular Systems	90
J. Czernek and V. Sklenář	
Affinity Capillary Electrophoresis	97
V. Pacáková, K. Štulík, S. Hubená, and M. Tichá	
Microbial Production of Coloured Azaphilone Metabolites	105
M. Šturdíková, D. Slugeň, K. Lešová, and M. Rosenberg	
Biological and Pharmacological Activity of Lignans	111
J. Slanina	
Materials for Noise and Vibration Attenuation	117
L. Lapčík, Jr., V. Cetkovský, B. Lapčíková, and S. Vašut	
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Coupling of Membrane Introduction with Mass Spectrometer (MIMS)	123
P. Brož, E. Drbálková, P. Janderka, P. Sitko, and J. Vřešťál	
Accumulation and Transformation of Selenite by Bacteria in Biologically Utilisable Form	129
J. Gronos and M. Mačor	
HPLC Determination of Dextromethorphan and Its Metabolites in Urine	132
G. Zimová, J. Chládek, J. Martínková, and M. Beránek	
Preparation and Testing of Standard Solutions of Nickel, Selenium, Thallium, and Zinc	136
O. Mestek, V. Hrubý, and M. Suchánek	
DISCUSSION	142
PERSONAL NEWS	144
EDUCATION IN CHEMISTRY	146

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 94 (2000), čís./no. 2 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 124, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 110 • ČASOPIS ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ • Bulletin roč./vol. 31 • Vydává Česká společnost chemická ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze a Fakultou chemicko-technologickou Univerzity Pardubice, 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: B. Kratochvíl • REDAKTOR/ASSOCIATE EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Gut, J. Hefflejš, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke, M. Bláhová (Bulletin), M. Ferles (Bulletin), B. Valter (Bulletin), I. Valterová (Bulletin) • 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, J. Hanika, J. Churáček, Č. Jech, J. Káš, J. Košťif, J. Koubek, L. Lapčík, J. Lederer, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, P. Pavlas, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ, INZERCÍ, 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 • SOUHRNY 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 © 2000 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 100 Kč, roční předplatné 2000 (12 čísel) 940 Kč. Předplatné ve Slovenské republice 2200 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 2000 (12 issues) DEM 440 • Podávání novinových zásilek povoleno ČP s.p. OZ VČ, č.j. PPI/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.