

Čeština v chemii

Jedním z poslání našeho časopisu je péče o kulturu odborné češtiny. Vlastně spíš než péče je to neustávající boj redaktora jak s autory, tak i se sebou samým. Každý z nás redaktorů se občas setkává s tak neuveritelnými jazykovými nehonoráznostmi, že zapochybujete o národnosti autora příslušného článku. Po těch několika letech práce pro Chemicke listy mě začíná mrzet, že jsem si nezaložil sbírku perliček, které bych v tomto úvodníku mohl dobré uplatnit pro pobavení čtenářů. A nejsou to jen prohřešky proti odbornému jazyku (o těch bude řeč dále), ale i takové, které známe ze školních slohových cvičení. Mohu zmínit třeba anakoluty typu „dívaje se z okna pršelo“, anebo načatá a nedokončená souvět, kdy čtenář ve spletě interpunkčních znamének marně pátrá, kde končí rozvíjející člen, případně ke kterému slovu se vztahuje vedlejší věta. Pomíjím takové drobnosti jako kostrbatý slovosled nebo nepochopení rozdílu mezi pomlčkou a spojovníkem.

Autoři si většinou jsou vědomi míry svého formulačního (anti)talentu. Chtěl bych proto využít této příležitosti a vyzvat ty, kteří mají pochybnosti o svých stylistických schopnostech, aby svůj rukopis před odesláním do redakce dali přečíst někomu s větším jazykovým citem. Není v silách redaktora, aby rekonstruoval každou druhou autorovu větu.

Pokud se týče odborných jazykových nepěkností, víme, že jich je mnoho druhů. Před šedesáti–sedmdesáti lety to bylo často způsobováno vlivem němčiny coby dominujícího jazyka chemie, kdežto dnes působí stále zesilující a téměř již bezkonturenční vliv angličtiny. Donedávna byla naše mateřšina ještě schopna odborná anglická slova vstřebávat, ať již vhodným překladem (například support – nosič, packing – náplň nebo těsnění) nebo převzetím a pouhým zčeštěním původního tvaru (například matrix – matrice, chromatography – chromatografie) tak, aby dotyčné slovo nebo slovní spojení bylo možné ohýbat. Dnes je ale přísun nových slov již tak rychlý, že čeština tomuto tempu nestačí. Příkladem je název metody MALDI TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry), který – jak se domnívám – dosud nemá český ekvivalent (a – upřímně řečeno – věru nevím, jak jej trefně přeložit). Při tvorbě nových slovních spojení je zkrátka angličtina mnohem pružnější.

Chtěl bych se zde zaměřit na určitý typ prohřešků, se kterým se setkáváme stále častěji, například ve formulacích „Nový McGregor produkt“ nebo „Mezinárodní Smith cena“. (Imaginární firmu McGregor a slavného učence Smithe jsem

si vymyslel.) Připomíná mi to ten typ vyjadřování, který někdy používají američtí Češi: „Bydlím v New York městě“. A přitom by stačilo napsat: „Nový produkt firmy McGregor“ nebo „Mezinárodní cena prof. Smithe“.

Řeč tedy bude o tom, jak používat cizojazyčné přívlastky, ať již v plné nebo zkratkové formě. Řada autorů bezostyšně převezme původní (anglický) slovosled a píše o „MALDI metodě“, „HALS stabilizovaných polymerech“ apod., někdy stvoří i takové hrůzy, jako „MALDI-metoda“ nebo „HALSem stabilizované polymery“. Nelze se zřejmě vyhnout použití anglických zkrátek, protože vymýšlení jejich českých protějšků ad hoc by způsobilo většinou zmatek. Je ale potřeba citlivě zvážit způsob jejich použití v českých větách.

Dovolím si zde učinit návrh. Pokud lze dotyčnou zkratku přečíst tak, aby měla tvar adjektiva, nechtějte možno ji umístit před příslušné substantivum. Například výraz „UV záření“ je myslím zcela v pořádku, protože jej lze dešifrovat jako „ultrafialové záření“. Tolerovat lze i výraz „GC stanovení“, čitelný jako „plynové chromatografické stanovení“. Ale pozor, formulace „AAS měření“ by se podle tohoto vzoru musela číst „atomově absorpcně spektrometrické měření“, což už je poněkud kostrbaté, takže doporučuji „měření metodou AAS“. V žádném případě ale nelze psát o „PCB vzorcích“, nýbrž zásadně jen o „vzorcích PCB“! Výše uvedený zrůdný výraz „HALS stabilizované polymery“ by tedy měl správně znít „polymery stabilizované pomocí HALS“. Shrnu: používejte-li v českých větách anglické zkratky, zkuste je v daném větném kontextu vyslovit nahlas v jejich nezkrácené podobě. Pokud vám bude věta znít rozumně, ponechte ji, pokud šroubovaně, pozměňte ji.

Nevím, je-li téma jazykových problémů vhodné pro úvodník. Možná by stálo za to zavést rubriku „jazykový koutek“, kde by se mohl otevřít prostor pro podobně zaměřené diskuse. Se vstupem do EU se význam „chemické češtiny“ paradoxně zvýší, což může být argumentem vůči téma, kdo by veškeré odborné texty nejraději přenechali angličtině. Ano, angličtina má výhradní postavení v původních sděleních, určených světové odborné veřejnosti, ale obecně zaměřené přehledné články, monografie, učebnice apod. musí i nadále pěstovat také kulturu odborného neanglického jazyka. EU má totiž zájem na tom, aby si jednotlivé národní jazyky uchovaly své nabýté bohatství i v oblastech speciálních.

Jiří Podešva

ON-LINE ÚPRAVA VZORKU V NESEPARAČNÍCH PRŮTOKOVÝCH METODÁCH

JITKA HUCLOVÁ a ROLF KARLÍČEK

Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail: Karlicek@faf.cuni.cz

Došlo 27.2.02, přepracováno 8.10.02, přijato 12.12.02.

Klíčová slova: průtoková injekční analýza, sekvenční injekční analýza, úprava vzorku, extrakce na tuhou fázi, extrakce kapalinou, dialýza

Obsah

1. Úvod
2. Reaktory s tuhou fází
 - 2.1. Uspořádání reaktorů s tuhou fází
 - 2.2. Typy reaktorů
 - 2.2.1. Enzymové reaktory
 - 2.2.2. Oxidačně-redukční reaktory
 - 2.2.3. Iontově výmenné reaktory
 - 2.2.4. Adsorpční reaktory
 - 2.2.5. Imunoafinitní reaktory
 3. Dialýza
 4. Extrakce kapalina–kapalina
 5. Současné trendy

1. Úvod

Úprava vzorku je klíčovým krokem řady analytických postupů. Před vlastní analýzou je většinou nutné analyt zkoncentrovat, případně jej částečně přečistit. Příprava vzorku zpravidla představuje časově nejnáročnější část celé analýzy a je zdrojem nepřesnosti a chyb¹. V současnosti je v instrumentální analýze patrná snaha o zavedení on-line úpravy vzorku, což umožňuje analytické metody automatizovat a miniaturizovat a snižuje riziko vnesení chyby do celého procesu analýzy.

Do skupiny neseparačních průtokových analytických metod patří dobře známá a popsaná průtoková injekční analýza² (FIA) a z ní vycházející novější sekvenční injekční analýza (SIA). Tyto techniky umožňují racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatným způsobem zvyšovat produktivitu zejména rutinních stanovení³. Možnosti úprav vzorku přímo v průtokových systémech byly studovány od vyvinutí téhoto technik². Předložený článek si klade za cíl podat přehled o různých způsobech úpravy vzorků v průtokových metodách, které nacházejí uplatnění v rozmanitých odvětvích analytické praxe.

2. Reaktory s tuhou fází

Souhrnný přehled o použití reaktorů s tuhou fází v průtokové injekční analýze a o jejich přípravě podal Šatinský⁴.

On-line zapojením reaktorů s tuhou fází (solid phase reactors – SPR) do systému průtokového analyzátoru se významně rozšiřuje potenciál průtokových metod zvýšením základních analytických parametrů, jako jsou citlivost a selektivita. SPR se používají pro svou schopnost reagovat s analyzovanou látkou na svém povrchu, chovat se jako extrakční sorbenty, nebo uvolňovat reakční činidla.

K nejčastěji využívaným reakcím patří enzymatické, oxidačně-redukční, iontově výmenné nebo imunochemické reakce.

Extrakční sorbenty slouží k odstranění interferencí a balastrních látek z matrice vzorku před vlastním stanovením analytu nebo k zakoncentrování analytu a tím zvýšení citlivosti stanovení. Tato technika extrakce na tuhou fázi (SPE – solid phase extraction) byla původně zavedena do separačních průtokových metod pro úpravu vzorku před stanovením vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

2.1. Uspořádání reaktorů s tuhou fází

Z hlediska uspořádání jsou v praxi nejčastěji používány plněné kolonové reaktory, které vyžadují jednoduchou přípravu a vykazují velký povrch, čímž dosahují vyšší reaktivity. Tyto kolonky jsou většinou připravovány přímo na pracovišti pro daný druh analýzy.

Způsob zapojení reaktorů do systému vyplývá především z účelu jejich použití a z použité analytické techniky⁴ (SIA, FIA). Pro urychlění analýzy metodou FIA je možno použít dvě mikrokolony, na nichž střídavě probíhá prekoncentrace a eluce, takže se vzájemně doplňují.

V SIA nachází v poslední době uplatnění tzv. „jet-ring“ celá. Aktivní náplň reaktoru je navázána na větší částice, většinou skleněná, polystyrenové nebo polyakrylamidové, které se zachytí ve štěrbině mezi celou a detektorem. Měření koncentrace analytu probíhá ve fázi, kdy je analyt přítomen v cele, přímo při jeho interakci s náplní reaktoru, nebo po jeho eluci. Po ukončení měření jsou částice odstraněny obrácením toku nosného proudu nebo zvětšením štěrbiny mezi pohyblivým tělem celý a detektorem. Při každém měření tak vzniká nový reaktor přímo v systému dávkováním suspenze obsahující částice s navázanou aktivní látkou. Odpadá tak nutnost promývání reaktoru, jeho reaktivace a riziko zkřížené kontaminace vzorků⁵. Nejčastěji se tento typ reaktoru používá pro imunochemické reakce^{6–10}.

Jiný typ průtokového reaktoru s obnovitelným povrchem využívá paramagnetické částice s navázanou aktivní náplní reaktoru, které jsou v systému imobilizovány pomocí magnetického pole. Jedná se o tzv. techniku MSPE¹ (magnetic solid phase extraction – extrakce na magnetickou tuhou fázi). Po odstranění magnetického pole se paramagnetické částice vyloupav do odpadu. V dalším cyklu měření se reaktor znova vytvoří nasátím aktivních paramagnetických částic a vložením

magnetického pole^{9,11}. Částice je možno opakovaně uvolňovat do roztoku při sání pumpy a vychytávat zpět do kolony při obrácení směru toku. Prekoncentrace analytu z roztoku je tak efektivnější, protože je podporována pohybem částic v systému¹¹.

2.2. Typy reaktorů

2.2.1. Enzymové reaktory

Enzymatické reakce slouží v průtokových systémech k převedení analytu na detegovatelný produkt^{12–14}, kterým může být i reakcí změněný kofaktor enzymatické reakce^{15,16}. Díky substrátové specifitě enzymů lze stanovit jednotlivé enantiomery^{14–16}. Je možné i stanovení analytu na základě jeho inhibičních vlastností^{17–20}.

Zapojením reaktorů s imobilizovanými enzymy se díky snížení spotřeby enzymů snižuje výše nákladů na rutinní analýzu, zjednodušuje se průtokový systém a zvyšuje se citlivost stanovení⁴. V případě metody SIA se navíc zkracuje doba potřebná na jednu analýzu, protože odpadá dávkování enzymu jako činidla v roztoku. Enzymy je možné uvnitř systému opakovat aktivovat³.

Na druhé straně je použití enzymových reaktorů omezeno několika faktory. Patří mezi ně například postupné klesání aktivity reaktoru v závislosti na čase (omezená životnost), použitych reakčních činidel a teplotě, desorpce enzymu a omezené použití drastických reakčních podmínek.

Stejnometerná aktivita enzymu a reprodukovatelnost měření je udržována temperováním reaktoru na konstantní teplotu³.

Reaktory se uplatní při stanovení látek, k nimž existuje enzym se substrátovou specifitou, nebo látek, které jsou známé jako inhibitory některé enzymatické reakce. Nejčastěji se užívají v potravinářství a při sledování fermentačních procesů.

Přehled stanovení s využitím enzymových reaktorů je uveden v tabulce I.

2.2.2. Oxidačně-redukční reaktory

Mikrokolonky obsahující oxidační nebo redukční materiál se v průtokových analytických systémech používají za účelem převedení analytu na vhodný oxidační stav pro následnou derivatizační reakci nebo za účelem oxidace či redukce analytu na požadovanou sloučeninu. Reakci lze urychlit temperováním reaktoru na požadovanou teplotu²¹.

Tyto kolonky nejsou schopny odstranit interferující látky ze vzorků se složitým pozadím, a proto se uplatňují zejména při analýze vod, kde umožňují současné stanovení různých oxidačních stavů prvků^{21–25}. Ve farmaceutické analýze se využívají pro stanovení účinných látek v léčivých přípravcích^{26–33}.

Příklady aplikací jsou uvedeny v tabulce II.

2.2.3. Iontově výmenné reaktory

I když se povrch těchto reaktorů účastní chemické reakce s analytem, funkcí většinou patří tyto reaktory k reaktorům extrakčním. Používají se pro prekoncentraci analytu nebo za účelem odstranění interferencí z matrice vzorku. Iontově výmenné reaktory se připravují přímo na pracovišti z komerčně dodávaných měničů iontů pro SPE úpravu vzorku před stano-

vením HPLC. Největší kapacitou se vyznačují porézní pryskyřice s organickou matricí, menší kapacitu mají měniče chemicky vázané na porézním silikagelu.

Iontoměničové fáze je možné vložit přímo do průtokové cely nedestruktivních optických detektorů. Na iontoměnič pak může být vychytáván buď reakční produkt, nebo analyt či činidlo, které se teprve reakce zúčastní.

Do systému SIA je možno zapojit i komerčně dodávané SPE disky obsahující iontoměnič, jak ukázali LeThanh a Lendl při stanovení organických kyselin a cukrů v nealkoholických nápojích³⁴.

Iontově výmenné reaktory často slouží k zakoncentrování analytu před stanovením s detekcí AAS (cit.^{35–37}).

Speciální iontově výmenný reaktor byl použit pro stanovení některých radioaktivních prvků v Jaderném odpadu pomocí SIA (cit.^{38–40}).

Díky rozmanitosti iontově výmenných fází najdou tyto reaktory široké uplatnění od analýzy vod přes potravinářský průmysl a farmaceutickou analýzu až po analýzu jaderného odpadu (viz tabulka III).

2.2.4. Adsorpční reaktory

Adsorpční reaktory slouží především pro prekoncentraci analytů. Značná výhoda spočívá v jejich použití při analýzách vzorků se složitou matricí, kdy je kromě prekoncentrace analytu požadováno odstranění balastních látek.

Jako adsorbenty se opět používají materiály běžně užívané při SPE.

Pro dosažení maximální odezvy je potřeba náhlá eluce analytu z kolonky pomocí organických rozpouštědel nebo kyselin a zásad. Snížená možnost použití koncentrovanějších organických rozpouštědel (methanol, ethanol, acetonitril) jako elučních činidel, jež byla hlavním limitujícím faktorem použití SPE ve FIA, odpadá v systému SIA z důvodu přítomnosti pouze teflonových materiálů a pístových, nikoliv peristatických pump⁴. Zde však eluce analytu organickým rozpouštědlem komplikuje spektrofotometrickou detekci, především v UV oblasti. Detektor reaguje na průchod jednotlivých zón a dává odezvu na samotné eluční činidlo; odezva je způsobena změnou indexu lomu. To představuje problém zejména v případě, kdy analyt přichází do detektoru na čele zóny elučního činidla, a základní linie odezvy detektoru se tak nestáčí nastavit na procházející eluční činidlo.

V posledních několika letech se v odborné literatuře objevují zmínky o tzv. materiálech s omezeným přístupem⁴¹ (restricted access materials – RAM). Tyto materiály umožňují přímý nástřik biologického vzorku do analytického systému bez jeho předchozí úpravy. Existuje několik různých strukturálních typů těchto materiálů, avšak jejich separační mechanismus je stejný.

Nízkomolekulární lipofilní analyt je na principu molekulových sít zachytáván v pórech sorbantu s limitovanou velikostí 60 Å zamezující vstupu makromolekulárních látek. Hydrofilní vrstva na povrchu sorbantu zamezí precipitaci proteinů, které se díky velikosti své molekuly do póru nedostanou a jsou vymyty z kolonky vodním fází s mrtvým objemem této kolonky. Uvnitř pórů se nachází hydrofobní vrstva (alkylové řetězce vázané na vnitřní povrch), na níž jsou nízkomolekulární látky děleny na principu adsorpční nebo iontově výměnné chromatografie.

Tabulka I
Příklady použití enzymových reaktorů

Analyt	Typ vzorku	Průtoková technika	Lit.
D-laktát	fermentační médium extrakt z vepřového masa	SIA FIA	15,79 16
L-laktát	víno	SIA	80
Glukóza	fermentační médium víno, pivo	SIA SIA	12–14,79,81,82 83
Penicilin	fermentační médium	SIA	12,13
Ethanol	víno, pivo	SIA	83
L-fenylalanin	fermentační médium sérum	SIA FIA	84 85
Močovina	sérum, moč	FIA	86
Chloramin	vodný roztok	FIA inhibice	17
Formaldehyd	pitná voda	FIA inhibice	18
Galaktóza	vodný roztok	FIA	87
Glycerol	vodný roztok	FIA	87
Neostigmin	vodný roztok	FIA inhibice	19
Galantamin	vodný roztok	FIA inhibice	19
Hypoxanthin	maso	FIA	88
Acetát	fermentační médium	FIA inhibice	20
Glutamát	potraviny	FIA	89

Tabulka II
Příklady použití oxidačně-redukčních reaktorů

Analyt	Typ vzorku	Průtoková technika	Lit.
Fe ²⁺ , Fe ³⁺	přírodní a odpadní vody	SIA	22
NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	přírodní a odpadní vody	SIA	22,23
Mn ²⁺	pitná, mořská, minerální voda	SIA	24
Adrenalin	pitná voda	SIA	21
Sulfadiazin	léčivé přípravky	FIA	26
N-substituované fenothiaziny	léčivé přípravky	FIA	27
Askorbová kyselina	léčivé přípravky	FIA	28
Sulfidy	odpadní vody	FIA	29

V literatuře je uveden přehled typů RAM, jejich výhody a použití. Materiály s omezeným přístupem byly v analytické praxi použity především jako náplně předkolon při HPLC analýze biologického materiálu, která byla provedena přímým nástřikem lidského séra do chromatografického systému s přepínáním kolon^{42–44}. Seznam aplikací s použitím těchto materiálů není zatím v odborné literatuře rozsáhlý, což je pravděpodobně způsobeno cenou těchto materiálů a nutností náročného přístrojového vybavení. Na druhé straně životnost RAM sorbentů v porovnání s konvenčními SPE sorbenty je až extrémně vysoká (je udávána teoretická životnost 2000 nástřiků 50 µl lidské plazmy bez změny separační účinnosti kolonky a změny zpětného tlaku)⁴⁵. Navíc se tyto sorbenty vyznačují menší velikostí částic, než mají klasické SPE sorbenty, a lépe zadržují analyt na kolonce.

Příklady uplatnění adsorpčních reaktorů v průtokových neseparačních metodách jsou uvedeny v tabulce IV.

2.2.5. Imunoafinitní reaktory

Tyto typy reaktorů se uplatňují zejména při stanovení antigenických materiálů makromolekulárního charakteru^{46–49}. Je tak možné stanovit buňky⁵⁰, ale i látky s relativně malou molekulou⁴⁹.

Afinitní ligandy (protilátky) imobilizované na stěnu reaktoru nebo na inertní nosič tvoří selektivní stacionární fázi. Po dávkování vzorku se analyt specificky váže na imobilizovanou protilátku a ostatní komponenty vzorku jsou bez zadržení eluovány.

Tvorba těchto biospecifických komplexů je velice citlivá na prostředí a je podmíněna nejen vhodným pH, iontovou silou, teplotou, ale i koncentrací kovových iontů, případně kofaktorů nebo jiných důležitých látek. Při změně reakčních podmínek můžeme analyt následně eluovat a detegovat.

Jako afinitní ligand pro izolace biologicky aktivních látek

Tabulka III
Příklady použití iontově výměnných reaktorů

Analyt	Typ vzorku	Průtoková technika	Lit.
Theofyllin	roztok kofeinu	SIA	90
Cu ²⁺	vodný roztok	SIA	91
	mořská voda	SIA	92
Tl	geochemické vzorky	SIA	36
Ni	odpadní vody	SIA	35
	moč	SIA	35
	mořská voda	SIA	92
Al, As, Co, Mn, Mo, Pb	mořská voda	SIA	92
Fe ³⁺	přírodní vody	SIA	37
Butan-2,3-diol a glycerol	bílé i červené víno	SIA	93
⁹⁰ Sr	jaderný odpad	SIA	38
⁹⁹ Tc	jaderný odpad	SIA	39
Am, Pu, Cm	jaderný odpad	SIA	40
Salbutamol	moč	FIA	94
Cd	odpadní vody	FIA	95
Monochlorooctová kyselina	reakční směs při výrobě betainu	FIA	96
Zn, Cd, Pb	pitná voda	FIA	97
Fe	povrchové vody, léčivé přípravky	FIA	98
Kaptopril	léčivé přípravky	FIA	99

Tabulka IV
Příklady použití adsorpčních reaktorů

Analyt	Typ vzorku	Průtoková technika	Lit.
NO ₂ ⁻	pitná voda	SIA	100
Cd	mořská voda	SIA	101
Cr ⁴⁺ , Cr ²⁺	voda	SIA	102
Polyaromatické uhlovodíky	voda	SIA	103
Pesticid naptalam	povrchové vody	FIA	104
Zn	biologický materiál	FIA	105
Pseudoefedrin	plazma	FIA	106
Polyfenoly	víno	FIA	107
Cd, Co, Cu, Mn, Pb	povrchové vody	FIA	108
Cd, Pb, Cu	voda	FIA	109
Kaptopril	léčivé přípravky	FIA	99
Salicylová kyselina	sérum	FIA	110

je vhodná každá sloučenina, která s těmito látkami tvoří bio-specifické, pevné a reverzibilní komplexy.

Nevýhodou imunoafinitních reaktorů je jejich náročná příprava, která spočívá ve složité imobilizaci afinitních ligandů na nosiči⁴.

V případě SIA jsou tyto reaktory často uspořádány jako „jet-ring“ celá^{6,7,10,51–55}. Toto uspořádání reaktoru umožňuje detekci analytu přímo navázaného na specifickou protilátku. SIA průtokový systém s kolonkou s obnovitelným povrchem byl aplikován dokonce na izolaci a čištění nukleových kyselin před jejich amplifikací a detekcí pomocí polymerasové řetězové reakce⁵⁶ (PCR). Růžička vyzkoušel i „jet-ring“ celu v „lab-on-valve“ uspořádání celého systému pro stanovení G proteinu⁵⁷.

Další příklady využití imunoafinitních reaktorů uvádí tabulka V.

3. Dialýza

Dialýza je separační metoda založená na diferenciálním transportu rozpuštěných látek přes semipermeabilní membránu v závislosti na velikosti jejich molekul nebo iontů. Selektivní transport analytů v dialyzační jednotce je řízen membránou, která působí jako molekulové síto⁵⁸.

Dialyzační jednotka se do průtokových systémů zařazuje za účelem oddělení analytu od interferujících složek matrice vzorku nebo pro jeho zředění^{59,60}.

Tabulka V
Příklady použití imunoafinitních reaktorů

Analyt	Typ vzorku	Průtoková technika	Lit.
BHK buňky	pufr	SIA	111
IgG1	pufr	SIA	6,9,10
Lidský sérový albumin	pufr	SIA	7
Insulin	pufr	SIA	8
2,4-Dichlorfenoxyoctová kyselina	voda	SIA	112
Biotin	pufr	SIA	10
Digoxin	pufr	SIA, FIA	113
Trijodothyronin	sérum	SIA, FIA	114
2,4-Dichlorfenoxyoctová kyselina, atrazin, simazin	roztok v pufru	SIA	49
Aflatoxin B1	potraviny	SIA	115
<i>E. coli</i>	potraviny	SIA	50
L-fenylalanin	sérum	FIA	85
Insulin	pufr	FIA	48

Tabulka VI
Příklady použití dialýzy

Analyt	Typ vzorku	Průtoková technika	Lit.
Fe	léčivé přípravky	SIA	116
Glukóza	krev	SIA	117
Cl ⁻	mléko	SIA	59
L-laktát	víno	SIA	71
Redukující cukry	víno	SIA	60
N ₂	siláž	SIA	61
NH ₃	fermentační médium odpadní vody, extrakt z atmosférického aerosolu	SIA	62
	odpadní vody	SIA	65
	povrchové vody, moč	FIA	118
Azidy	přírodní vody	SIA	68
SO ₂	víno	SIA	63
L-laktát	mléko, jogurt	FIA	119
Mléčná a jablečná kyselina	víno	FIA	120,121
Ca	rev	FIA	122

Používá se při stanovení plynných látek^{60–63} nebo látek, z nichž plyn vzniká v průtokovém systému chemickou reakcí^{61,64–68}, při stanovení iontů^{58,69} nebo malých neutrálních molekul^{59,70}.

Nevýhodou této techniky je omezená životnost dialyzační membrány^{59,62}. Pro její prodloužení se membrána proplachuje, případně regeneruje pomocí enzymu⁶¹.

Množství analytu difundovaného přes membránu závisí na typu stanovení. Maxima dosáhli Oms a spol. při stanovení amonných iontů ve vodě, kdy přes membránu procházelo 15 % analytu přítomného ve vzorku⁶⁴. Na účinnost dialýzy má kromě obecně známých faktorů (typ a plocha membrány, pohyb kapalin) vliv i objem vzorku – u FIA platí, že s rostoucím objemem vzorku roste množství látky difundované mem-

bránou. U SIA, v případě, kdy přes membránu difunduje látka teprve vznikající v systému chemickou reakcí, je objem vzorku limitován požadavkem kompletního překryvu zón vzorku a reakčního činidla⁶⁵.

Pro zvýšení výtěžnosti procesu dialýzy se využívá opakování obrácení toku proudu donoru při zastavení toku akceptoru^{65,67,69}.

Průtokové metody se zapojením dialyzační jednotky nacházejí uplatnění v kontrole životního prostředí^{65,67}, v potravinářském průmyslu^{58,62,63,66}, v kontrole fermentačních procesů⁶¹ a v dalších analytických laboratořích. Mikrodialyzéry ve spojení s průtokovými metodami se využívají při *in vivo* sledování některých krevních parametrů⁷¹, v rozpošťecích studiích pak nahrazují filtrace^{71,72}. Příklady uvádí tabulka VI.

Tabulka VII
Příklady použití extrakce kapalina–kapalina

Analyt	Typ vzorku	Průtoková technika	Lit.
V ⁴⁺ , V ⁵⁺	vodný roztok	SIA	75
Mo ⁶⁺	vodný roztok	SIA	77
Cr ³⁺ , Cr ⁴⁺	vodný roztok	SIA	76
Fenobarbital, amobarbital, secobarbital, pentobarbital, venlafaxin, sertralín, norsertralín, paroxetin	moč	SIA	123
Fe ³⁺ , celk. Fe	víno	SIA	124
Cd	povrchové vody	SIA	125
⁹⁰ Sr	voda, mléko, půda	SIA	78
CN ⁻ , SCN ⁻	sliny, roztok pralidoximu	FIA	126
Al	voda	FIA	127
Ranitidin	léčivé přípravky	FIA	128
Amfetamin	moč	FIA	129
Nitrofenoly	vodný roztok	MSFIA	130
O ₂	voda	FIA	131
Pd	částice ve vzduchu, katalyzátory výfukových plynů	FIA	132
Ni	Ni–Cu slitiny, galvanizační roztoky	FIA	133

4. Extrakce kapalina–kapalina

Extrakce kapalina–kapalina (LLE) patří k nejčastěji užívaným separačním a prekoncentračním technikám. Jejím zavedením do průtokových metod je možno tuto techniku automatizovat a snížit spotřebu rozpouštědel a množství vznikajícího organického odpadu.

Bylo popsáno několik způsobů provedení extrakce v průtokových metodách. Klasické provedení SE-FI (solvent extraction – flow injection)⁷³ vyžadující segmentor, extrakční cívku a separátor je u SIA nahrazováno extrakcí analytu do stacionárního filmu tvořeného organickým rozpouštědlem na vnitřním povrchu extrakční cívky^{74–77}.

Protože povrch kontaktní plochy mezi fázemi je vzhledem k objemu organické fáze velký, transfer analytu do organické fáze je rychlý a po určité době kontaktu i kvantitativní⁷⁴.

Existují tři způsoby transportu extrahovaného analytu do detektoru:

1. eluce dalším segmentem organického rozpouštědla, které tvoří film⁷⁵,
2. eluce jiným organickým rozpouštědlem⁷⁶,
3. zpětná extrakce analytu⁷⁷.

Druhé dva způsoby eluce jsou efektivnější, v prvním případě dochází k ustavení rovnováhy mezi vymývaným a nově tvořeným filmem a ke ztrátě analytu⁷⁴.

Tato technika extrakce se zařazuje do průtokových metod za účelem zvýšení jejich citlivosti a selektivity. Její výhodou je jednoduchost a nízká spotřeba organických rozpouštědel. Pro každé stanovení je tvořen nový film organické fáze, který je po každém cyklu odstraněn. Nedochází tu k opakovánemu použití organické fáze nebo k její regeneraci, a je tak zamezeno vzájemné kontaminaci vzorků. Přínosem tohoto způsobu extrakce oproti klasickému zpracování vzorku je i provedení

v uzavřeném systému a snížení kontaminace ovzduší parami organických rozpouštědel.

Většina publikovaných prací se zaměřuje na extrakci iontových párů nebo chelátů za účelem odstranění interferujících látek při stanovení kovových iontů^{75–77}, ale bylo popsáno i stanovení radioisotopu touto technikou⁷⁸. Přehled využití extrakce kapalina–kapalina je uveden v tabulce VII.

5. Současné trendy

V současné analytické praxi je třeba naplňovat zvyšující se požadavky na citlivost a selektivitu analytických metod, na snížení spotřeby činidel a na zjednodušení přípravy vzorku před stanovením. Z důvodu jednoduchosti, rychlosti, flexibilita, plné automatizace a snížení možnosti chyby vnesené do analýzy lidským faktorem jsou moderní analytické postupy charakterizovány co nejjednodušší úpravou vzorku, zejména přímo v analytickém systému.

Byla popsána řada způsobů úprav analytických vzorků, které lze provádět on-line ve spojení s průtokovými metodami. Toto spojení umožnuje přímé stanovení bez manuální úpravy vzorku, a splňuje tak požadavky současné analytické praxe. Stanovení je možno automatizovat, často se snižuje spotřeba činidel a rozpouštědel a množství vznikajícího odpadu. Zkracuje se doba potřebná k provedení analýzy. Pracovníci laboratoří jsou v mnohem menší míře vystaveni kontaktu se zdraví škodlivými látkami a biologickým materiélem.

Výběr konkrétní techniky závisí na typu analytu a povaze vzorku.

V současné době se nejvíce rozvíjí použití reaktorů s tuhou fází, především s obnovitelným povrchem. Poslední novinkou je tzv. „lab-on-valve“ uspořádání SIA systému, které přináší

výrazné snížení spotřeby vzorku a činidel a umožňuje použití tvorbu reaktorů s obnovitelným povrchem přímo v systému, opět s velmi nízkou spotřebou náplně reaktoru⁵⁷. Významnou charakteristikou této techniky, která nachází uplatnění zejména při monitorování biotechnologických procesů a při stanoveních založených na imunologických reakcích, je minaturizace a zvýšení citlivosti stanovení.

Spojení průtokových metod s on-line úpravou vzorku zjednoduší analýzu velkých sérií vzorků (rutinní analýzy vod, potravin, krve a moči) a sledování změn koncentrace analytů v průběhu různých procesů (řízení a optimalizace biotechnologických výrob, monitorování hladin léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách) zejména tam, kde je analyt součástí složité matrice. Tyto techniky také pronikají do oblasti imunoanalyzy, kde využitím komerčních imunosorbentů a „jet-ring“ celý výrazně zrychlují a zlevňují tyto velmi selektivní a citlivé analytické postupy.

Z uvedených skutečností vyplývá, že potenciál on-line úprav vzorku v průtokových metodách je značný a tyto techniky podstatně ovlivňují analytickou praxi.

Tato práce vznikla v rámci řešení výzkumného záměru MSM 111600001 a grantu FRVŠ č. 2247/G4.

LITERATURA

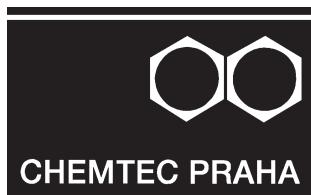
1. Šafaříková M., Šafařík I.: J. Magn. Magn. Mater. 194, 108 (1999).
2. Růžička J., Hansen E. H.: *Flow Injection Analysis*. Wiley, New York 1988.
3. Paseková H., Polášek M., Solich P.: Chem. Listy 93, 354 (1999).
4. Šatinský D., Karlíček R.: Chem. Listy 95, 150 (2001).
5. Růžička J., Scampavia L.: Anal. Chem. News Features 4, 257A (1999).
6. Pollema C. H., Růžička J.: Anal. Chem. 66, 1825 (1994).
7. Willumsen B., Christian G. D., Růžička J.: Anal. Chem. 69, 3482 (1997).
8. Růžička J., Ivaska I.: Anal. Chem. 69, 5024 (1997).
9. Pollema C. H., Růžička J., Christian G. D.: Anal. Chem. 64, 1356 (1992).
10. Růžička J.: Analyst (Amsterdam) 123, 1617 (1998).
11. Chandler D. P., Brockman F. J., Holman D. A., Grate J. W., Bruckner-Lea C. J.: Trends Anal. Chem. 19, 314 (2000).
12. Min R. W., Nielsen J., Villadsen J.: Anal. Chim. Acta 312, 149 (1995).
13. Min R. W., Nielsen J., Villadsen J.: Anal. Chim. Acta 320, 199 (1996).
14. Liu X., Hansen E. H.: Anal. Chim. Acta 326, 1 (1996).
15. Shu H., Hakanson H., Mattiasson B.: Anal. Chim. Acta 300, 277 (1995).
16. Shu H., Hakanson H., Mattiasson B.: Anal. Chim. Acta 283, 727 (1993).
17. Buck S., Stein K., Schwedt G.: Anal. Chim. Acta 390, 141 (1999).
18. Kiba N., Sun L. M., Yokose S.: Anal. Chim. Acta 378, 169 (1999).
19. Ghous T., Townshend A.: Anal. Chim. Acta 372, 379 (1998).
20. Tservistas M., Weigel B., Schuegerl K.: Anal. Chim. Acta 316, 117 (1995).
21. Naidoo E. B., Van Staden J. F.: Fresenius' J. Anal. Chem. 370, 776 (2000).
22. Galharo C. X., Masini J. C.: Anal. Chim. Acta 438, 39 (2001).
23. Lapa R. A. S., Lima J. L. F. C., Pinto I. V. O. S.: Analisis 28, 295 (2000).
24. Cerdá A., Oms M. T., Forteza R. M., Cerdá V.: Anal. Chim. Acta 371, 63 (1998).
25. Staden J. F., Kleuver L. G.: Anal. Chim. Acta 369, 157 (1998).
26. Kojo A., Calatayud J. M.: Anal. Chim. Acta 308, 334 (1995).
27. Romero A. M., Benito C. G., Calatayud J. M.: Anal. Chim. Acta 308, 451 (1995).
28. Kojo A., Calatayud J. M.: Talanta 42, 909 (1995).
29. Pereira A. V., Filho O. F.: Anal. Chim. Acta 366, 55 (1998).
30. Fatibello F. O., Marcolino J. L. H., Pereira A. V.: Anal. Chim. Acta 384, 167 (1999).
31. Barnett N. V., Bowser T. A., Gerardi R. D., Smith B.: Anal. Chim. Acta 318, 309 (1996).
32. Calatayud J. M., Mateo G. J. V.: Anal. Chim. Acta 264, 283 (1992).
33. Rivas G. A., Calatayud J. M.: Talanta 42, 1285 (1995).
34. LeThanh H., Lendl B.: Anal. Chim. Acta 422, 63 (2000).
35. Wang J., Hansen E. H.: Anal. Chim. Acta 435, 331 (2001).
36. Zhang-Run X., Shu-Kun X., Zhao-Lun F.: At. Spectrosc. 21, 17 (2000).
37. Rubí E., Jiménez M. S., De Mirabó F. B., Forteza R., Cerdá V.: Talanta 44, 553 (1997).
38. Grate J. W., Fadell S. K., Egorov O.: Analyst (Amsterdam) 124, 203 (1999).
39. Egorov O., O'Hara M. J., Růžička J.: Anal. Chem. 71, 345 (1999).
40. Grate J. W., Egorov O. B., Fiskum S. K.: Analyst (Amsterdam) 124, 1143 (1999).
41. Boos K. S., Grimm K. H.: Trends Anal. Chem. 18, 175 (1999).
42. Mislanová C., Stefancová A., Oravcová J., Horecký J., Trnovec T., Lindner W.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. 739, 151 (2000).
43. Lamprecht G., Kraushofer T., Stoschitsky K., Lindner W.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. 740, 219 (2000).
44. Mullett W. M., Pawliszyn J.: J. Pharm. Biomed. Anal. 26, 899 (2001).
45. Boos K. S., Rudolphi A., Vielhauer S., Walfort A., Lubda D., Eisebeiss F.: Fresenius' J. Anal. Chem. 352, 684 (1995).
46. Kiba N., Itagaki A., Furusawa M.: Talanta 44, 131 (1997).
47. Ruhn P. F., Taylor G. D., Hage D. S.: Anal. Chem. 66, 4265 (1994).
48. Khokhar M. Y., Miller J. N., Seare N. J.: Anal. Chim. Acta 290, 154 (1994).
49. Fránek M., Deng A., Kolář V.: Anal. Chim. Acta 412, 19 (2000).
50. Chandler B. P., Brown J., Call D. R.: Int. J. Food Microbiol. 70, 143 (2001).
51. Christian G. D.: Analyst (Amsterdam) 119, 2309 (1994).

52. Egorov O., Růžička J.: *Analyst* (Amsterdam) **120**, 1959 (1995).
53. Lindfors T., Lädesmäki I., Ivaska A.: *Anal. Lett.* **29**, 2257 (1996).
54. Mayer M., Růžička J.: *Anal. Chem.* **68**, 3808 (1996).
55. Garden S. R., Strachan N. J. C.: *Anal. Chim. Acta* **444**, 187 (2001).
56. Chandler D. P., Schuck B. L., Brockman F. J., Bruckner-Lea C. J.: *Talanta* **49**, 969 (1999).
57. Růžička J.: *Analyst* (Amsterdam) **125**, 1053 (2000).
58. Silva F. V., Souza G. B., Ferraz L. F. M., Nogueira A. R. A.: *Food Chem.* **67**, 317 (1999).
59. Araújo A. N., Lima J. L. F. C., Rangel A. O. S. S., Segundo M. A.: *Talanta* **52**, 59 (2000).
60. Silva F. V., Nogueira A. R. A., Souza G. B., Cruz G. M.: *Anal. Sci.* **16**, 361 (2000).
61. Lukkari I., Růžička J., Christian G. D.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **346**, 813 (1993).
62. Segundo S. A., Rangel A. O. S. S.: *Anal. Chim. Acta* **427**, 279 (2001).
63. Mataix E., Luque de Castro M. D.: *Analyst* (Amsterdam) **123**, 1547 (1998).
64. Oms M. T., Cerdá A., Cladera A., Forteza R.: *Anal. Chim. Acta* **318**, 251 (1996).
65. Oms M. T., Cerdá A., Cerdá V.: *Electroanalysis* (N.Y.) **8**, 387 (1996).
66. Decnop-Weever L., Kraak J. C.: *Anal. Chim. Acta* **337**, 125 (1997).
67. Echols R. T., James R. R., Aldstadt J. A.: *Analyst* (Amsterdam) **122**, 315 (1997).
68. Silva F. V., Nogueira A. R. A., Souza G. B., Reis B. F., Araújo A. N., Montenegro M. C. M. B. S., Lima J. J. F. C.: *Talanta* **53**, 331 (2000).
69. Van Staden J. V., Du Plessis H., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta* **357**, 141 (1997).
70. Araújo A. N., Lima J. L. F. C., Saraiva M. L. M. F. S., Zagatto E. A. G.: *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 428 (1997).
71. Zhao-Lun F.: *Anal. Chim. Acta* **400**, 233 (1999).
72. Zhao-Lun F., Qun F., Xue-Zhu L., Heng-Wu Ch., Chun-Lei L.: *Trends Anal. Chem.* **18**, 261 (1999).
73. Valcárcel M., Luque de Castro M. D.: *Flow-Injection Analysis. Principles and Applications*. Ellis Horwood, Chichester 1987.
74. Luo Y., Al-Othman R., Růžička J., Christian G. D.: *Analyst* (Amsterdam) **121**, 601 (1996).
75. Nakano S., Luo Y., Růžička J., Christian G. D.: *Microchem. J.* **55**, 392 (1997).
76. Luo Y., Nakano S., Holman D. A., Růžička J., Christian G. D.: *Talanta* **44**, 1563 (1997).
77. Nakano S., Luo Y., Holman D. A., Růžička J., Christian G. D.: *J. Flow Injection Anal.* **13**, 148 (1996).
78. Miró M., Gómez E., Estela J. M.: *Anal. Chem.* **74**, 826 (2002).
79. Schuhmann W., Wohlschläger H., Huber J.: *Anal. Chim. Acta* **315**, 113 (1995).
80. Araújo A. N., Lima J. L. F. C., Saraiva M. L., Zagatto E. A.: *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 428 (1997).
81. Lancaster H. L., Christian G. D., Růžička J.: *J. Flow Injection Anal.* **9**, 20 (1992).
82. Lindfors T., Lähdesmäki I., Ivaska A.: *Anal. Lett.* **29**, 2257 (1996).
83. Mayer M., Růžička J.: *Anal. Chem.* **68**, 3808 (1996).
84. Hedenfalk M., Mattiasson B.: *Anal. Lett.* **29**, 1109 (1996).
85. Kiba N., Itagaki A., Furusawa M.: *Talanta* **44**, 131 (1997).
86. Solich P., Polášek M., Karlíček R.: *Anal. Chim. Acta* **218**, 151 (1989).
87. Vega F. A., Nunez C. G., Weigel B.: *Anal. Chim. Acta* **373**, 57 (1998).
88. Numata M., Funazaki N., Ito S.: *Talanta* **43**, 2053 (1996).
89. Stalikas C. D., Karayannis M. I., Tzouwara-Karayanni S. M.: *Talanta* **41**, 1561 (1994).
90. Dockendorff B., Holman D. A., Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Commun.* **35**, 357 (1998).
91. Oliveira C. C., Zagatto E. A. G., Růžička J., Christian G. D.: *Anal. Lett.* **33**, 929 (2000).
92. Jiménez M. S., Velarte R., Castillo J. R.: *Spectrochim. Acta, Part B* **57**, 391 (2002).
93. Luca G. C., Reis B. F., Zagatto E. A. G.: *Anal. Chim. Acta* **366**, 193 (1998).
94. Šatinský D., Karlíček R., Svoboda A.: *Anal. Chim. Acta* **455**, 103 (2002).
95. Couto C. M., Lima J. L., Conceicao M., Montenegro B.: *Anal. Chim. Acta* **366**, 155 (1998).
96. Puig-Lleixa C., Bartroli J., Del-Valle M.: *Anal. Chim. Acta* **359**, 311 (1998).
97. Elsholz O., Schulze G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **353**, 119 (1995).
98. Staden J. F., Kluever L. G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **362**, 319 (1998).
99. Karlíček R., Solich P.: *Pharmazie* **53**, 549 (1998).
100. Miró M., Cladera A., Estela J. M., Cerdá V.: *Analyst* (Amsterdam) **125**, 943 (2000).
101. Zhang-Run X., Hong-Yan P., Shu-Kun X., Zhao-Lun F.: *Spectrochim. Acta, Part B* **55**, 213 (2000).
102. Marqués M. J., Morales-Rubio A., Salvador A., Guardin M.: *Talanta* **53**, 1229 (2001).
103. Erustes J. A., Andrade-Ejora A., Cladera A., Fortreza R., Cerdá V.: *Analyst* (Amsterdam) **126**, 451 (2001).
104. Diaz G. T., Valenzuela A. M. I., Salinas F.: *Anal. Chim. Acta* **384**, 185 (1999).
105. Jesus D. S., Cassella R. J., Ferreira S. L. C.: *Anal. Chim. Acta* **366**, 263 (1998).
106. Chen H. V., Fang Z. L.: *Anal. Chim. Acta* **394**, 13 (1999).
107. Arce L., Tena M. T., Rios A.: *Anal. Chim. Acta* **359**, 27 (1998).
108. Nickson R. A., Hill S. J., Worsfold P. J.: *Anal. Chim. Acta* **351**, 311 (1997).
109. Fang Z., Guo T., Welz B.: *Talanta* **38**, 613 (1991).
110. Karlíček R., Gargoš M., Solich P.: *J. Flow Injection Anal.* **13**, 45 (1996).
111. Růžička J., Pollema C. H., Scudder K. M.: *Anal. Chem.* **65**, 3566 (1993).
112. Wilmer M., Trau D., Renneberg R.: *Anal. Lett.* **30**, 515 (1997).
113. Dreveny D., Michałowski J., Seidel R.: *Analyst* (Amsterdam) **123**, 2271 (1998).
114. Dreveny D., Klammer C., Michałowsky J.: *Anal. Chim. Acta* **398**, 183 (1999).
115. Garden S. R., Strachan J. R. C.: *Anal. Chim. Acta* **444**, 187 (2001).
116. Van Staden J. F., Du Plessis H., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta* **357**, 141 (1997).

117. Fang Z. L.: *Anal. Chim. Acta* **400**, 233 (1999).
118. Mana H., Spohn U.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **366**, 825 (2000).
119. Palmisano F., Quinto M., Rizzi R., Zambonin P. G.: *Analyst (Amsterdam)* **126**, 866 (2001).
120. Mataix E., De Castro M. D. L.: *Anal. Chim. Acta* **428**, 7 (2001).
121. Lima J. L. F. C., Lopes T. I. M. S., Rangel A. O. S. S.: *Anal. Chim. Acta* **366**, 187 (1998).
122. Huang Y., Zhang Z., Lv J.: *Anal. Chim. Acta* **419**, 175 (2000).
123. Peterson K. L., Logan G. D., Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Chim. Acta* **337**, 99 (1997).
124. Costa R. C. C., Araújo A. N.: *Anal. Chim. Acta* **438**, 227 (2001).
125. Wang J., Hansen E. H.: *Anal. Chim. Acta* **456**, 283 (2002).
126. Themelis D. G., Tzanavaras P. D.: *Anal. Chim. Acta* **452**, 295 (2002).
127. Alonso A., Almendral M. J., Porras M. J.: *Anal. Chim. Acta* **447**, 211 (2001).
128. Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Tomás V.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26**, 609 (2001).
129. Maurí-Aucejo A. R., Pascual-Martí M. R., Llobat M.: *Microchem. J.* **69**, 199, (2001).
130. Miró M., Cladera A., Estela J. M.: *Anal. Chim. Acta* **438**, 103 (2001).
131. Sakai T., Takio H., Teshima N.: *Anal. Chim. Acta* **438**, 117 (2001).
132. Anthemidis A. N., Themelis D. G., Stratis J. A.: *Talanta* **54**, 37 (2001).
133. Chimpalee N., Chimpalee D., Keawpasert P.: *Anal. Chim. Acta* **408**, 123 (2000).

J. Huclová and R. Karlíček (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **On-line Sample Pretreatment in Nonseparating Continuous-Flow Analytical Methods**

The review deals with principles and applications of various methods of on-line sample pretreatment (SPE, LLE, dialysis, derivatization) in flow systems. The article concentrates on the advances in the development of sample analysis and enumerates the advantages of a combination of on-line sample preparation and determination using FIA and SIA. It involves 133 references covering the period from 1987 to 2001.



10. ročník mezinárodního veletrhu chemie a plastů

7.–9. října

Areál Výstaviště Praha

www.chemtecpraha.cz

Tradičně na podzim proběhne v Průmyslovém paláci na pražském Výstavišti v Holešovicích jubilejní 10. ročník mezinárodního veletrhu chemie a plastů – CHEMTEC PRAHA. Svaz chemického průmyslu ČR je v letošním roce odborným garantem i doprovodného programu.

Význam veletrhu dokládá každoroční účast předních společností českého chemického průmyslu. Za dobu své existence veletrh potvrdil, že je užitečným přínosem pro konfrontaci výsledků chemického výzkumu, vývoje výroby a také v obchodu a službách v této oblasti. Stal se vrcholným místem střetnutí výrobců a obchodníků z oblasti chemie, laboratorní a měřící techniky, technologických postupů a ekologie, i výzkumné ústavy a školy zde prezentují výsledky vědy a výzkumu.

Doprovodný program je oproti minulosti orientován více na průřezová a souhrnná odborná témata a větší prostor bude věnován prezentaci chemických firem. Jeho základním cílem je přispět k přípravě chemického průmyslu na území České republiky na vstup do EU. Nosná témata budou tvořit

- strategie chemického průmyslu
- výzkum a vývoj chemického průmyslu na území ČR a zapojení chemických subjektů do 6. rámcového programu EU
- chemická legislativa
- prezentace: chemických firem
 - významných studentských a doktorandských prací
- ochrana zdraví, bezpečnost a životní prostředí
- logistika a transport chemických láték.

Informace o doprovodném programu naleznete na www.chemtecpraha.cz. Kontakt na garanta: SPCH ČR, Kodaňská 46, 100 10 Praha 10, Ing. Otakar Podroužek, tel.: 234 064 133, fax: 234 064 130, e-mail: mail@schp.cz.

Incheba Praha Vás tímto srdečně zve k návštěvě a pevně věří, že i přes složitou ekonomickou situaci podnikatelských subjektů v oblasti chemie splní veletrh očekávání návštěvníků i vystavovatelů.

INCHEBA PRAHA

tel.: 220 103 476, 493, fax: 233 378 225, e-mail: chemtec@incheba.cz

KATALYTICKÝ ROZKLAD OXIDU DUSNÉHO

LUCIE OBALOVÁ^a a BOHUMIL BERNAUER^b

^aKatedra fyzikální chemie a teorie technologických procesů,
Vysoká škola báňská – Technická univerzita, tř. 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava, ^bÚstav anorganické technologie,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5,
166 28 Praha 6

e-mail: Lucie.Obalova@vsb.cz, Bohumil.Bernauer@vscht.cz

Došlo 11.4.02, přepracováno 1.10.02, přijato 29.11.03.

Klíčová slova: oxid dusný, katalytický rozklad, mechanismus, kinetika, inhibice

Obsah

1. Úvod
2. Termodynamické podmínky rozkladné reakce
3. Katalyzátory rozkladné reakce N₂O
 - 3.1. Katalyzátory na bázi kovů
 - 3.2. Katalyzátory na bázi oxidů
 - 3.3. Katalyzátory na bázi směsných oxidů
 - 3.4. Katalyzátory na bázi kalcinovaných sloučenin typu hydrotalcitu
 - 3.5. Katalyzátory na bázi zeolitů
4. Závěr

1. Úvod

Oxid dusný patří mezi látky přispívající ke skleníkovému efektu a jeho vzrůstající koncentrace v atmosféře je považována za jednu z příčin poškození ozónové vrstvy. Mezi významné zdroje oxidu dusného patří některé chemické výroby a spalovací procesy. N₂O vzniká rovněž při provozu automobilových motorů s třícestními katalyzátory^{1–3}. Shrnutí současného stavu problematiky emisí oxidu dusného spolu s přehledem technologií vyvíjených pro jejich snižování byl již věnován přehledný článek v tomto časopise⁴.

Je zřejmé, že nejjednodušším postupem likvidace oxidu dusného je jeho rozklad na kyslík a dusík v přítomnosti vhodného katalyzátoru. Výhodou navrhované metody je, že produktem reakce jsou přirozené složky ovzduší a lze ji aplikovat na stávající technologie. V porovnání s ostatními možnostmi, např. likvidací N₂O termickým rozkladem⁵, lze katalytický rozklad N₂O realizovat za nižších teplot, což snižuje energetické, a tedy i finanční nároky celého řešení. Ten-to postup proto v poslední době oprávněně vyvolává pozornost.

2. Termodynamické podmínky rozkladné reakce

Rozklad oxidu dusného podle rovnice (1) je vzhledem k hodnotě standardní Gibbsovy energie ΔG_f^o (298 K) = -103 kJ.mol⁻¹ reakcí termodynamicky schůdnou⁶.



Při rozpadu molekuly oxidu dusného dochází k rozštěpení slabší vazby N–O (rád vazby N–O je 1,6), zatímco silnější vazba N–N zůstává zachována (rád vazby N–N je 2,7, cit.⁷).

Rovnovážné konstanty K_p reakce (1) vypočtené z reakční isotermy⁸ pro různé teploty jsou uvedeny v tabulce:

T, K	298	400	600	800	1000	1200
K _p	1,787.10 ¹⁸	3,933.10 ¹⁴	1,116.10 ¹¹	1,843.10 ⁹	1,526.10 ⁸	2,827.10 ⁷

Rovnovážná konverze N₂O se v uvedeném rozsahu teplot 298–1200 K blíží 1.

Experimentálně však bylo zjištěno⁹, že reakce v homogenní fázi prakticky neprobíhá a k měřitelné konverzi N₂O dochází až při teplotách nad 1170 K. Důvodem této kineticé stability je fakt, že disproporcionace N₂O na N₂ a O₂ je reakcí spinově zakázanou, čemuž odpovídá¹⁰ i vysoká aktivační energie štěpení vazby N–O (250–270 kJ.mol⁻¹).

Realizaci rozkladu N₂O i za technicky zajímavých teplot lze docílit použitím vhodného katalytického systému.

3. Katalyzátory rozkladné reakce N₂O

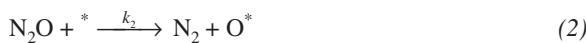
Katalytický rozklad oxidu dusného byl rozsáhle studován v přítomnosti katalyzátorů různého typu; šlo jak o samotné a nanesené kovy, tak o oxidy, směsné oxidy a zeolity. Přehled zkoumaných katalyzátorů zpracoval např. Kapteijn⁷.

Cílem velké části starších prací bylo objasnění mechanismu reakce. Teprve studie z posledních let jsou zaměřeny na praktické aplikace. Aktivita katalyzátorů je nejčastěji sledována při počáteční koncentraci N₂O odpovídající reálným koncentracím v odpadních plynech např. z výroby kyseliny dusičné a ze spalovacích procesů (300–1000 ppm), případně z výroby kyseliny adipové (25–30 mol. %). Snahou je vyvinout aktivní a stabilní katalyzátor, jehož katalytické vlastnosti nebudou negativně ovlivněny dalšími složkami běžně se vyskytujícími v odpadních plynech, především kyslíkem, vodní párou a dalšími (NO_x, SO₂, CO₂).

3.1. Katalyzátory na bázi kovů

Rozklad N₂O byl sledován na platině¹¹, zlatu¹², rhodiu¹³ a mědi¹⁴ s cílem navrhnut kinetickou rovnici reakce a posou-

dit inhibiční vliv kyslíku. Mechanismus rozkladné reakce N_2O na Rh při 220 °C byl studován pomocí isotopu ^{18}O a pomocí teplotně programované desorpce. Je navrhován Langmuirův-Hinshelwoodův mechanismus tvořený kroky:



kde $*$ označuje aktivní místo na povrchu katalyzátoru.

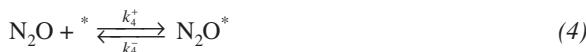
Disociační adsorpce N_2O – krok (2) – vzniká molekula dusíku a kyslík adsorbovaný na povrchu katalyzátoru; ten je po rekombinaci s dalším povrchově vázaným kyslíkem desorbován podle rovnice (3).

Rozklad N_2O byl také sledován na kovech Pd (cit.^{15,16}), Ru (cit.^{17–19}), Pt (cit.²⁰), Cu (cit.^{21–23}), Rh (cit.^{24–29}) nanesených na různých nosičích (Al_2O_3 , ZnO , ZrO_2 , CeO_2). Velmi aktivním katalyzátorem je Rh/ ZnO (cit.²⁹), v přítomnosti H_2O a NO_2 však dochází k poklesu reakční rychlosti. Teplota potřebná pro dosažení 100% konverze N_2O při zatížení $m_{\text{kat}}/V_{\text{celk}}$ = 1,25 g.min.l⁻¹ se zvýšila o 160 °C v přítomnosti O_2 , H_2O a NO_2 . Aktivním katalyzátorem je Ru na alumině, a to i v přítomnosti vodní páry¹⁷.

3.2. Katalyzátory na bázi oxidů

Rozklad N_2O byl sledován různými autory na řadě oxidů, nejrozšířejší jsou starší práce Wintera^{30,31} a Golodetse³². Katalytická aktivita byla pozorována u oxidů přechodných kovů VIII. skupiny (Co, Fe, Ni) a dále na oxidech kovů Rh, Ir, Cu a La. Rozklad je až na výjimky (Ca, Sr, La, Ce, Zn, Hf, Mg) inhibován kyslíkem obsaženým v reakční směsi, resp. kyslíkem uvolňovaným v průběhu rozkladné reakce. Novější práce se zabývají rozkladem N_2O na oxidech Co (cit.³³), Fe (cit.³⁴), Mn (cit.³⁵), Mg (cit.^{36,37}), Ca (cit.³⁸), Zr (cit.³⁹) a dále na Rh_2O_3 (cit.⁴⁰), RuO_2 (cit.⁴¹), CuO (cit.⁴²), BaO (cit.⁴³), CoO (cit.⁴⁴) nanesených na různých nosičích.

Reakční mechanismus rozkladu N_2O na oxidech je podle Wintera³¹ tvořen kroky (4), (5), (3) a (6):



kde kroky (4) a (3) jsou vratné. Za předpokladu ustáleného stavu a konstantního počtu aktivních míst na povrchu katalyzátoru byla odvozena rychlostní rovnice:

$$r = \frac{k_5 K_4 N_T \cdot p_{\text{N}_2\text{O}}}{1 + K_4 \cdot p_{\text{N}_2\text{O}} + \sqrt{p_{\text{O}_2}} / \sqrt{K_3}} \quad (7)$$

kde N_T je koncentrace aktivních míst na povrchu katalyzátoru, $p_{\text{N}_2\text{O}}$ označuje parciální tlak oxidu dusného, p_{O_2} označuje parciální tlak kyslíku.

Adsorpce oxidu dusného a kyslíku může způsobovat inhibici reakce. Bylo zjištěno, že adsorbované množství N_2O bývá malé. Kroky (4), (5) lze pak vyjádřit rovnicí (2), což vede k výrazu pro reakční rychlosť r :

$$r = \frac{k_2 N_T \cdot p_{\text{N}_2\text{O}}}{1 + \sqrt{p_{\text{O}_2}} / \sqrt{K_3}} \quad (8)$$

Pokud reakce není inhibována kyslíkem, přechází rovnice (8) do tvaru:

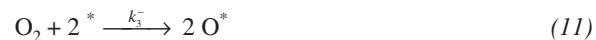
$$r = k_2 N_T \cdot p_{\text{N}_2\text{O}} \quad (9)$$

Tento případ nastává např. při rozkladu N_2O na katalyzátoru ZrO_2 (cit.³⁹):

Inhibice kyslíkem může být způsobena adsorpcí celé molekuly kyslíku na aktivní centrum podle rovnice (10), v tomto případě je desorpce kyslíku krokem určujícím celkovou rychlosť reakce:



nebo nevratnou disociační chemisorpcí molekuly O_2 na aktivní centra (zpětná reakce (3)):



3.3. Katalyzátory na bázi směsích oxidů

Z této skupiny katalyzátorů byly pro rozklad N_2O testovány spinely, perovskity, tuhé roztoky kovů a oxidy obohacené malým množstvím kovu.

Vhodnými katalyzátory pro praktické aplikace se jevily spinely⁴⁵ MAl_2O_4 ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Mg}, \text{Zn}$), Co_3O_4 (cit.³⁴) a perovskity⁴⁶ $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{B}'\text{B}''_{1-y}\text{O}_3$, ($\text{B}', \text{B}'' = \text{Mn}, \text{Co}, \text{Fe}$). Bylo zjištěno, že tyto katalyzátory jsou stabilní a odolné vůči katalytickým jedálům.

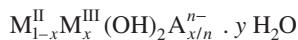
Na perovskitech typu ABO_3 ($\text{A} = \text{La}, \text{Ba}, \text{Sr}, \text{Ca}, \text{B} = \text{Ti}, \text{Mn}$) navrhli Tejuca a spol.⁴⁷ stejný reakční mechanismus jako v případě katalyzátorů na bázi oxidů tvořený reakčními kroky (4), (5), (3). Inhibice rozkladu N_2O kyslíkem byla různá. Autoři předpokládali, že do rozkladné reakce N_2O je zapojen i kyslík vázaný v mřížce perovskitu. Podle Songa a spol.⁴⁸ je aktivní místo na povrchu katalyzátoru tvořené sousedními atomy kov-O-kov. Bylo zjištěno, že na aktivitu má vliv oxidační stav iontu přechodného kovu a jeho koordinace. Oktaedricky koordinovaný Co^{2+} v MgAl_2O_4 je aktivnější než tetraedricky koordinovaný Co^{2+} . Deformace struktury u oktaedru vede k dvěma delšími vazbám Co–O, kde jsou slabší vazebné síly mezi kyslíkem a kobaltem⁴⁹. Cimino a Indovina⁵⁰ se zabývali vztahem mezi oxidačním stavem iontu přechodného kovu a jeho katalytickou aktivitou: katalytická aktivita iontů Mn^{3+} dispergovaných v matrici MgO je mnohem vyšší než iontů Mn^{2+} a Mn^{4+} .

Studie⁵¹ pevných roztoků iontů přechodných kovů Cu, Fe, Co, Cr, Mn a Ni v oxidech (Al_2O_3 , MgO) ukázaly detailnější obrázek aktivních center tvořených kationty přechodných kovů. Bylo pozorováno, že při velmi nízkých koncentracích, když lze ionty přechodného kovu považovat za izolované, byla katalytická aktivita iontů velmi vysoká. Se vzrůstající koncentrací aktivita iontů klesala. Ve zředěných tuhých roztocích iontů přechodných kovů byl inhibiční efekt kyslíku mnohem menší⁵², protože izolované ionty jsou neschopné chemisorpce O_2 podle rovnice (11).

Studie z posledních let se zabývají rozkladem N_2O na iontech přechodných kovů Ni (cit.⁵³), Cu (cit.⁵⁴), Co (cit.^{18,55}) v MgO a na systémech typu $(\text{CaO})_{1-x}(\text{MO})_x$, kde M = Ti, Cr (cit.⁵⁶).

3.4. Katalyzátory na bázi kalcinovaných sloučenin typu hydrotalcitu

Katalyzátory připravené termickým rozkladem (kalcinací) sloučenin typu hydrotalcitu lze na základě jejich struktury zařadit mezi směsné oxidy kovů. Prekurzory těchto katalyzátorů – sloučeniny typu hydrotalcitu, mají obecné chemické složení:



kde M^{II} značí dvojmocný kationt např. Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , M^{III} značí trojmocný kationt např. Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , A^{n-} je n -mocný aniont např. CO_3^{2-} , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$.

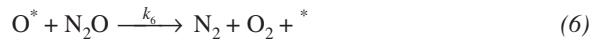
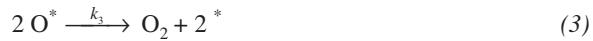
Pro rozklad oxidu dusného byly použity uhličitanové formy s aniontem CO_3^{2-} , jež bývají značeny $\text{M}^{\text{II}}-\text{M}^{\text{III}}-\text{HT}$.

Při tepelném rozkladu hydrotalcitu se uvolní strukturně vázaná voda a oxid uhličity a vznikne převážně amorfni směs oxidů kationtů M^{II} a M^{III} . Tako obdržené katalyzátory mají dobře definovaný obsah a rovnoměrnou distribuci aktivních složek, poměrně velký specifický povrch a jsou tepelně stálé.

Rozkladem N_2O na kalcinovaných hydrotalcitech s různými kombinacemi a poměry dvojmocných a trojmocných kovů ($\text{M}^{\text{II}} = \text{Mg, Co, Ni, Cu, Zn}$ a $\text{M}^{\text{III}} = \text{Al, Fe, Cr}$) se ve své práci zabýval Kannan⁵⁷. Zjištěnou vysokou katalytickou aktivitu vysvětlil nestechiometrií a velkou disperzí vzniklých směsných oxidů kovů. Armor a spol.⁵⁸ studovali rozklad N_2O v simulovaném procesním plynu na kalcinovaných hydrotalcitech $\text{M}^{\text{II}}-\text{Al}-\text{HT}$, kde $\text{M}^{\text{II}} = \text{Co, Ni, Cu, Co/Pd, Co/Rh}$ a Co-Mg . Bylo zjištěno, že přítomnost vodní páry a kyslíku neovlivňuje významně konverzi na katalyzátoru připraveném kalcinací Co/Rh-Al-HT a Co-Mg-Al-HT (100% konverze N_2O v přítomnosti vodní páry a O_2 při 450°C , počáteční koncentrace 985 ppm N_2O , prostorová rychlosť $30\,000\text{ h}^{-1}$).

Rovněž kalcinovaný hydrotalcit Zn-Al, Rh-HT je katalyzátor vhodný pro rozklad N_2O při nízkých teplotách (400°C); jeho aktivita zůstala zachována i v přítomnosti NO_2 , O_2 a vodní páry⁵⁹.

Kinetická data rozkladu N_2O na kalcinovaných sloučeninách typu hydrotalcitu byla vyhodnocena Kannanem⁵⁷ s použitím rychlostní rovnice 1. řádu vzhledem k $p_{\text{N}_2\text{O}}$ bez inhibičního vlivu kyslíku – rovnice (9), čemuž odpovídá reakční mechanismus navrhovaný Dandlem a Emigem⁶⁰, sestávající z reakcí (2), (3) a reakce (6):



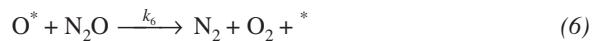
Reakce (3) je však v tomto případě nevratná, což vede k tomu, že reakční rychlosť není inhibována kyslíkem. Složitější reakční mechanismus rozkladu N_2O byl navržen Románem-Martínezem a spol.⁶¹ Předpokládá účast kyslíku z mřížky katalyzátoru v reakci. Podle autorů dochází k migraci adsorbovaných kyslíkových atomů a migraci kyslíkových atomů z mřížky katalyzátoru. Adsorbované kyslíkové atomy se spojují s kyslíkovými atomy z mřížky za vzniku molekulárního kyslíku podle rovnice (3).

Pérez-Ramírez a spol.⁶² prováděli rozklad N_2O na kalcinovaných hydrotalcitech v přítomnosti O_2 a SO_2 s cílem simuloval odpadní plyny ze spalovacích procesů ve fluidním loži. Bylo zjištěno, že přítomnost Mg v katalyzátoru má stabilizující roli a odstraňuje irreverzibilní otravu katalyzátoru při nízkých teplotách (90% konverze N_2O na Co, Mg-Al, Rh-HT při 320°C , počáteční koncentrace 1000 ppm N_2O v He, zatížení $m_{\text{kat}}/n_{\text{N}_2\text{O}}^0 = 224\text{ g.mol}^{-1}$).

3.5. Katalyzátory na bázi zeolitů

Zeolity s vyměněnými ionty přechodných kovů (Fe, Co, Cu, Rh) v různých matricích (ZSM-5, ZSM-11, mordenit, USY, ferrierit) jsou aktivními katalyzátory^{63–68} rozkladu N_2O . Přehled starších studií je uveden např. v práci Kaptejna a spol.⁷ Nejlepší výsledky (100% konverze N_2O při 320°C , zatížení $m_{\text{kat}}/V_{\text{celk}} = 2,5\text{ g.min.l}^{-1}$, počáteční koncentrace 500 ppm N_2O v He) byly dosaženy na katalyzátorech⁶⁹ Ru/ZSM-5, Ru-Na/ZSM-5 a Ru-NaUSY, v přítomnosti kyslíku však došlo k poklesu reakční rychlosti. Li a Armor⁶⁶ publikovali jako nejaktivnější zeolity Rh/ZSM-5 a Cu/ZSM-5. Aktivita katalyzátoru je určena kombinací kationtu kovu a typu zeolitu. Aktivitu kationtu kovu lze odhadnout na základě katalytické aktivity oxidu daného kovu.

Na zeolitickém katalyzátoru Fe-ZSM-5 byl navržen⁶⁵ mechanismus zahrnující reakce (2) a (6):



Kinetika reakce se řídí kinetickou rovnicí 1. řádu vzhledem k $p_{\text{N}_2\text{O}}$:

$$r = \frac{2k_2k_6N_T}{k_2 + k_6} p_{\text{N}_2\text{O}} \quad (12)$$

Na zeolitech Fe-Y a Fe-Mor je předpokládáno zapojení kyslíku z mřížky katalyzátoru při reakci. Dochází k rychlé výměně kyslíku mezi N_2O a katalyzátorem, kterou lze popsat rovnicí (3).

Inhibice reakce kyslíkem byla u jednotlivých zeolitických katalyzátorů různá. Na katalyzátorech Rh-ZSM-5 a Cu-ZSM-5 byl rozklad inhibován kyslíkem pouze do určité koncentrace kyslíku⁶⁸ a tato inhibice byla způsobena⁷⁰ nevratnou disociační chemisorpcí molekuly O₂ na aktivní centra podle reakce (11). Rozklad N₂O v přítomnosti ZSM-5 s vyměněnými ionty kovů Pd, Fe a Co nebyl inhibován kyslíkem vůbec⁶⁶. Katalytická aktivita katalyzátorů na bázi zeolitů byla až na výjimky negativně ovlivněna přítomností vodní páry, což omezuje jejich praktické použití⁶³. Na některých zeolitech byly pozorovány oscilace reakční rychlosti^{71,72}.

4. Závěr

Nalezení vhodného katalytického systému pro rozklad oxidu dusného představuje nyní hlavní krok k využití rozkladu jako nejjednoduššího postupu likvidace emisí oxidu dusného v odpadních plynech. Výzkum je zaměřen na vývoj katalyzátorů aktivních za nízkých teplot, jež budou odolné vůči inhibici kyslíkem a vodní párou. Z tohoto hlediska se jeví nadějnými katalyzátory připravené kalcinací sloučenin typu hydrotalcitu, jež snadno desorbují kyslík a jejichž aktivita není na rozdíl od zeolitů negativně ovlivněna vodní párou.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, číslo projektu CEZ 273 60 0002 a Grantové agentury České republiky, číslo projektu GA 106/02/0523.

LITERATURA

- Soete G. G.: Rev. Inst. Fr. Petr. 48, 413 (1993).
- Noskov A. S., Abdulin I. R.: Chem. Sustain. Develop. 1, 351 (1993).
- Badr O., Probert S. D.: Appl. Energy 42, 129 (1992).
- Bernauer B., Markvart M., Obalová L., Fott P.: Chem. Listy 95, 392 (2001).
- Reimer R. A., Slaten C. S., Seapan M., Koch T. A., Tomlinson P. E.: *Proceedings of 6th International Workshop on Nitrous Oxide Emissions* (Hupa M., Matinlinna J., ed.), Turku, Finland 1995, str. 521.
- Barin I., Knacke O.: *Thermochemical Properties of Inorganic Substances*. Verlag, Düsseldorf 1973.
- Kapteijn F., Rodriguez-Mirasol J., Moulijn J. A.: Appl. Catal., B 9, 25 (1996).
- Obalová L.: *Teze dizertační práce*. VŠB-TU, Ostrava 2000.
- Klikorka K., Hájek J., Votinský J.: *Obecná a anorganická chemie*. SNTL/ALFA, Praha 1985.
- Greenwood N. N., Earnshaw A.: *Chemie prvků I, II*. Informatorium, Praha 1993.
- Takoudis C. G., Schmidt L. D.: J. Catal. 80, 274 (1983).
- Kalback W. M., Sliepečník C. M.: Ind. Eng. Chem. Fundam. 17, 165 (1978).
- Uetsuka H., Aoyagi K., Tanaka S., Yuzaki K., Ito S., Kameoka S., Kunimori K.: Catal. Lett. 66, 87 (2000).
- Wolohan P., Welsh W., Friedman R. M., Ebner J. R.: ACS Symp. Ser. 721 (Transition State Modeling for Catalysis), 259 (1999); Chem. Abstr. 130, 317112 (1999).
- Basinska A., Machej T., Matachowski L., Schroeder G., Domka F.: Arch. Ocgr. Srodowiska 25, 91 (1999).
- Wu B., Wang S., Zhuang Y.: Spectrosc. Lett. 30, 1165 (1997).
- Wang X., Zeng H. C.: Appl. Catal., B 17, 89 (1998).
- Zeng H. C., Qian M., Pang X. Y.: Stud. Surf. Sci. Catal. 116, 485 (1998).
- Pinna F., Scarpa M., Strukul G., Guglielminotti E., Bocuzzi F., Manzoli M.: J. Catal. 192, 158 (2000).
- Malfoy P., Granger P., Lamonier J. F., Leclercq L.: Phys. Chem. 41, 109 (1997).
- Dandekar A., Vannice M. A.: Appl. Catal., B 22, 179 (1999).
- Morterra C., Giannello E., Cerrato G., Centi G., Perathoner S.: J. Catal. 179, 111 (1998).
- Ma J., Rodriguez N. M., Vannice M. A., Baker R. T. K.: Top. Catal. 10, 27 (2000).
- Koichi Y., Takayoshi Y., Shin-ich I., Kimio K.: Catal. Lett. 47, 173 (1997).
- Centi G., Galli A., Montanari B., Perathoner S., Vaccari A.: Catal. Today 35, 113 (1997).
- Imamura S., Jindai H., Koyama Y., Ohgoshi S. (Nikon Fine Gas K. K.): JP 2000 317307; Chem. Abstr. 133, 366775 (2000).
- Centi G., Dall'Olio L., Perathoner S.: J. Catal. 192, 224 (2000).
- Oi J., Junko A., Ogata A., Bamwenda G. R., Yagita H., Kushiyama S., Koichi M.: Appl. Catal., B 12, 277 (1997).
- Oi J., Tanaka R., Obuchi A., Ogata A., Bamwenda G. R., Kushiyama S.: Phys. Chem. 41, 119 (1997).
- Winter E. R. S.: J. Catal. 19, 32 (1970).
- Winter E. R. S.: J. Catal. 34, 431 (1974).
- Golodets G. I.: Stud. Surf. Sci. Catal. 15, 200 (1983).
- Guo L., Wu B., Zhuang Y., Li Q., Zhu H.: Huanjing Kexue Xuebao 18(5), 457 (1998); Chem. Abstr. 129, 249518 (1998).
- Goto T., Niimi A., Hirano K., Takahata N., Fujita S., Shimokawabe M., Takeyawa N.: React. Kinet. Catal. Lett. 69, 375 (2000).
- d.Soete G. G.: Rev. Inst. Fr. Petr. 48, 413 (1993).
- Žemva P., Lesar A., Senegačník M., Kobal I.: Phys. Chem. Chem. Phys. 2, 3319 (2000).
- Lu X., Xu X., Wang N., Zhang Q.: J. Phys. Chem. B 103, 3373 (1999).
- Satsuma A., Akahori R., Kato M., Komai S., Yoshida H., Hattori T.: J. Mol. Catal. A: Chem. 155, 81 (2000).
- Miller T. M., Grassian V. H.: Catal. Lett. 46, 213 (1997).
- Dann T. W., Schulz K. H., Mann M., Collings M.: Appl. Catal., B 6, 1 (1995).
- Li K., Wang X. F., Zeng H. C.: Chem. Eng. Res. Des. 75, 807 (1997).
- Tagawa K., Miura K., Kodama S., Shimizu A., Tanaka K. (Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha): PCT Int. Appl. WO 99 25461; Chem. Abstr. 130, 342219 (1999).
- Xie S., Lunsford J.: Appl. Catal., A 188, 137 (1999).
- Drago R. S., Jurczyk K., Kob N.: Appl. Catal., B 13, 69 (1997).
- Baier M., Fetzer T., Hofstadt O., Hesse M., Burger G., Harth K., Schumacher V., Wistuba H., Otto B. (BASF A.-G.): PCT Int. Appl. WO 2000 023176; Chem. Abstr. 132, 297873 (2000).
- Burgkhardt W., Froehlich F., Seifert F. (Inocermic Gesell-

- schaft für Innovative Keramik m.b.H.): DE 19700490; Chem. Abstr. 129, 126432 (1998).
47. Tejucá G. L., Fierro J. L. G., Tascón J. M. D.: *Adv. Catal.* 36, 237 (1989).
 48. Song C., Shen M., Wang J., Qin Y.: *Rashao Kexue Yu Jishu* 5, 186 (1999); *Chem. Abstr.* 131, 290394 (1999).
 49. Angeletti C., Pepe F., Porta P.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 74, 1595 (1978).
 50. Cimino A., Indovina V.: *J. Catal.* 17, 54 (1970).
 51. Egerton T. A., Stone F. S., Vickerman J. C.: *J. Catal.* 33, 299 (1974).
 52. Cimino A., Bosco R., Indovina V., Schiavello M.: *J. Catal.* 5, 271 (1966).
 53. Izumi Y., Shimizu T., Kobayashi T., Aika K.: *Chem. Commun.* 2000, 1053.
 54. Sato S., Takahashi R., Sodewawa T., Yuma K., Obata Y.: *J. Catal.* 196, 195 (2000).
 55. Qian M., Zeng H. C.: *J. Mater. Chem.* 7, 493 (1997).
 56. Loukatzikou L. A., Sdoukos A. T., Pomonis P.: *J. Mater. Chem.* 7, 1587 (1997).
 57. Kannan S.: *Appl. Clay Sci.* 13, 347 (1998).
 58. Armor J. N., Braymer T. A., Farris T. S., Li Y., Petrocelli F. P., Weist E. L., Kannan S., Swamy C. S.: *Appl. Catal., B* 7, 397 (1996).
 59. Oi J., Obuchi A., Ogata A., Bamwenda G. R., Tanaka R., Hibino T., Kushiyama S.: *Appl. Catal., B* 13, 197 (1997).
 60. Dandl H., Emig G.: *Appl. Catal., A* 168, 261 (1998).
 61. Román-Martínez M. C., Kapteijn F., Overeijnder J., Moulijn J. A.: *Proceedings of 4th International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies* (Riemer P., Eliasson B., Wokaun A., ed.), str. 343. Elsevier, Amsterdam 1999.
 62. Pérez-Ramírez J., Mul G., Xu X., Kapteijn F., Moulijn J. A.: *Stud. Surf. Sci. Catal.* 130, 1445 (2000).
 63. Kapteijn F., Marban G., Rodriguez-Mirasol J., Moulijn J. A.: *J. Catal.* 167, 256 (1997).
 64. Rauscher M., Kesore K., Monning R., Schwieger W., Tissler A., Turek T.: *Appl. Catal., A* 184, 249 (1999).
 65. Fu C. M., Korchak V. N., Hall W. K.: *J. Catal.* 68, 166 (1981).
 66. Li Y., Armor J. N.: *Appl. Catal., B* 1, L21 (1992).
 67. Chen L., Chen H. Y., Lin J., Tan K. L.: *Surf. Interface Anal.* 28, 115 (1999).
 68. Shimokawabe M., Hirano K., Takezawa N.: *Catal. Today* 45, 117 (1998).
 69. Chang Y.-F., McCarty J. G., Wachsman E. D., Wong V. L.: *Appl. Catal., B* 4, 283 (1994).
 70. Kapteijn F., Rodriguez-Mirasol J., Moulijn J. A., Mul G., Marban G.: *Proceedings of 11th Congress on Catalysis* (Hightower J. W., Delgass W. N., ed.), str. 641. Elsevier, Amsterdam 1996.
 71. El-Malki E. M., van Saten R. A., Sachtler W. M. H.: *Microporous Mater.* 35–36, 235 (2000).
 72. Ochs T., Turek T.: *Chem. Eng. Sci.* 54, 4513 (1999).

L. Obalová^a and B. Bernauer^b (^a*Department of Physical Chemistry and Theory of Technological Processes, Technical University of Ostrava, Ostrava, b*^b*Department of Inorganic Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Catalytic Decomposition of Dinitrogen Oxide**

The article summarizes the current state of research in the development of catalysts for dinitrogen oxide decomposition. The catalysts are assessed from the viewpoint of practical utilization for decomposition of nitrous oxide emissions in waste gases. Attention is focused on the activity of the investigated catalysts and their sensitivity to inhibition by oxygen, water vapour and other components of waste gases. The proposed mechanisms of the decomposition are discussed.

Zavedená farmaceutická firma hledá pro své
pracoviště v Praze do výzkumného oddělení

organického chemika

Náplň práce: syntéza nových léčiv, vývoj
syntetických metod a vývoj procesů.
Dobrá znalost angličtiny podmínkou.

Žádosti s profesním životopisem zašlete na
Interpharma Praha, a.s., Komoranská 955, 143 10 Praha 12,
fax 241 773 235, e-mail: interpharma@interpharma-praha.cz,
www.interpharma-praha.com.

VYUŽITIE PRÍRODNÉHO ZEOLITU TYPU KLINOPTILOLITU V AGROCHÉMII A POLNOHOSPODÁRSTVE

MÁRIA REHÁKOVÁ^a, SILVIA ČUVANOVÁ^a,
ZLATICA GAVALOVÁ^b a JÁN RIMÁR^b

^aKatedra anorganickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Moyzesova 11, 041 54 Košice, ^bOdbor výskumu CHEMZA, a.s. Strážske, Priemyselná 720, 072 22 Strážske, Slovenská republika
e-mail: rehakova@kosice.upjs.sk

Došlo 28.3.02, prepracované 1.9.02, prijaté 7.1.03.

Kľúčové slová: zeolit, klinoptilolit, agrochemikálie, hnojivá, krmivá

Obsah

1. Úvod
 2. Štruktúra a vlastnosti zeolitov
 3. Ložisko klinoptilolitu na východnom Slovensku
 4. Zeolity ako nosiče agrochemikálií a hnojív
 - 4.1. Hnojivá na báze zeolitov
 5. Zeolity ako prísada krmív
 6. Záver

1. Úvod

Prírodné a syntetické zeolity sú predmetom záujmu vedec-
kého výskumu v celosvetovom meradle vďaka ich chemickým
a fyzikálnym vlastnostiam. V súčasnosti majú široké využitie
v rôznych oblastiach priemyselnej technológie, poľnohospo-
dárskej výrobe, vodohospodárstve, ekológii, ale aj v iných
oblastiach, napr. medicíne, farmácii¹⁻⁹. V priemyselnej tech-
nológií jednou z najdôležitejších oblastí využitia syntetických
zeolitov je katalýza^{5,10-13}.

Prírodné zeolity typu klinoptilolitu vo svete patria medzi najrozšírenejšie a najviac využívané zeolitické minerály.

Rastúce nároky na ochranu životného prostredia a produkciu zdravotne nezávadných potravín si nevyhnutne vyžadujú zvyšovanie podielu výroby materiálov určených pre poľnohospodárske a zahradkárske účely na báze zdrojov prírodných surovín.

Zeolit typu klinoptilolitu ako materiál prírodný, netoxický, ekologicky výhodný a cenovo dostupný vďaka svojim iónovým a sorpčným vlastnostiam, ale aj rade ďalších vlastností je vhodným materiálom pre využitie v rôznych oblastiach poľnohospodárstva – jednak v rastlinnej a živočíšnej výrobe^{3,6-9,14}.

V rastlinnej poľnohospodárskej výrobe, ale aj v záhradkárstve, majú prírodné zeolity široké využitie ako aktívne nosiče agrochemikálií^{7,8,14–16} – pesticídov, herbicídov, hnojív^{17–24}, rastových stimulátorov, pri zvyšovaní úrodnosti a biologickej

aktivity pôdy, rekultiváciu a zvyšovanie produktívnosti kyslých a devastovaných pôd, zvyšovanie dusíkovej bilancie najmä v ľahkých a piesčitých pôdach^{8,14,25,26}. Rovnako sú využiteľné pri sušení a skladovaní obilia, ošetrovaní vína – čírení a čistení, výrobe sklenníkových a kôrorašelinových substrátov, pri príprave substrátov pre skladovanie ovocia a zeleniny i iných^{8,14}. Významné je aj ich využitie z ekologického hľadiska pri znížovaní obsahu škodlivín v pôde – sorpcii ďalších kovov a iných toxických látok^{7,8,27–29}.

V živočíšnej výrobe sú využiteľné^{7-8,14,29-31} ako minerálne doplnky kŕmnych zmesí pre dietetický a antibakteriálny účinok, pri úprave exkrementov hospodárskych zvierat, ako aj podstielok. Taktiež sú vhodné ako dezodoračné prostriedky pri odstraňovaní zápachu a vlhkosti v ustajňovacích priestoroch. Pri chove rýb sú využiteľné na odstraňovanie amoniaku v recirkulačných systémoch^{8,14}.

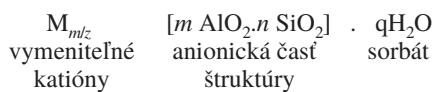
V niektorých krajinách majú zeolitické produkty viacstupňové využitie, najprv ako podstielky pod hospodárske zvieratá a potom následne ako prírodné hnojivá pri pestovaní poľnohospodárskych plodín^{7,8,29}.

2. Štruktúra a vlastnosti zeolitov

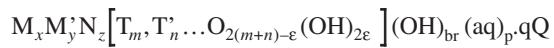
Zeolity sú jedným z typov inkluzívnych zlúčenín^{32,33}. Sú to mikrokryštalické hydratované hlinitokremičitané, ktoré sa vyznačujú pevnou trojrozmernou štruktúrou, obsahujúcou póry a dutiny molekulových rozmerov. Základnú kostru zeolitov tvorí sieť tetraédrov SiO_4 , v ktorej je časť atómov Si izomorfne nahradená Al. Tým vzniká záporný náboj, ktorý je kompenzovaný mobilným katiónom alkalických kovov alebo alkalickej zemí, ale tiež môže byť kompenzovaný organickými katiónmi alebo protónom^{2,7,11,34}.

V dutinách a kanáloch vytvorených vzájomným spájaním tetraédrov sa okrem kationov nachádzajú aj molekuly vody. Množstvo vody závisí od voľného objemu dutín, od teploty a od relatívnej vlhkosti okolitého prostredia. Dehydratáciou možno zeolit zbaviť vody i opäťovne rehydratovať alebo nahradíť inými sorbátmami³³.

V literatúre sú známe rôzne formy vzorcov vyjadrujúcich všeobecné zloženie zeolitov^{2,11,35}. Pôvodne z učebník známy vzorec pre zeolity



doplnil Meier³⁵ rozšíreným vzorcom, vyhovujúcim syntetickým a prírodným zeolitom so zohľadnením prímesí:



Uvedený vzorec zahrňuje okrem vymeniteľných kovových kationov M a M' aj nekovové ióny (väčšinou sa zahriatím uvoľňujú) a okrem Si a Al tiež iné prvky (Be, B, Ga, Ge, P) označené T a T'. Ako sorbát Q môže byť voda, ale aj iné

molekuly, e može mať nulovú alebo od nuly odlišnú (1, 2, 3 ...) hodnotu a potom nemusí vždy obsahovať mostíkovo viazané OH skupiny.

Pre zeolity sú charakteristické tri základné vlastnosti: sorpčné, iónovymenné a katalyticke.

Zeolity môžu do voľných priestorov resp. kanálov sorbovať rôznorodé látky, polarne i nepolárne anorganické a organické molekuly, ale aj biochemicky a farmaceuticky účinné látky, herbicídy, insekticídy, vonné látky a iné. Sorbované môžu byť nielen jednotlivé sorbáty, ale aj viaceré druhy sorbátorov, ktoré svojimi rozmermi vyhovujú rozmerom dutín zeolitu. Môže ísť aj o kombinované sorpcie, t.j. zeolit sorbuje určitý druh inkluzívnych zlúčenín, ktoré už majú vo svojich dutinách sorbované iné molekuly. Sorpciou rôznych hostujúcich zložiek do zeolitov dochádza k zmene fyzikálno-chemických vlastností pôvodných zeolitov. Sorbované molekuly môžu vplyvať na vymeniteľné katióny, môžu spôsobiť migráciu iónovo viazanych katiónov alebo môže dochádzať k oxidačno-redukčným reakciám v dutinách a kanáloch zeolitu⁷.

Ďalšou charakteristikou vlastnostou je možnosť vymieniť katión kovu v kryštálovej štruktúre a pripraviť tak modifikované zeolity pre špeciálne druhy použitia. Vysoká afinita prírodného klinoptilolitu k amónemu katiónu a aj ku katiónom toxických kovov^{14,27-29} (Pb, Cd, Cr, Hg, As a.i.) poskytuje široké možnosti jeho využitia pri odstraňovaní NH₄⁺ a toxicických katiónov kovov z odpadových vôd.

V praxi v celosvetovom meradle sa využívajú v širokej miere aj vlastnosti katalyticke¹⁰⁻¹¹.

3. Ložisko klinoptilolitu na východnom Slovensku

Prírodné zeolity ako samostatná skupina minerálov sú známe vyše 200 rokov⁹. Zeolity ako minerálne látky objavil v roku 1756 švédsky mineralóg Cronstedt. Za ďalších 200 rokov bolo objavených a popísaných viac ako 35 druhov zeolitov, avšak ich praktický význam zostával dlho nevyužitý. Až moderné identifikačné metódy prispeli k tomu, že v posledných 30 rokoch sa zaznamenalo vyše tisíc významnejších výskytov vyše 50 druhov zeolitov vo viac ako 40-tich krajinách^{34,36}.

Východoslovenské ložisko v lokalite Nižný Hrabovec bolo objavené v roku 1974. Hlavným horninotvorným minerálom vulkanosedimentárnej horniny je minerál klinoptilolit. Klinoptilolit vznikol v alkalickom prostredí premenou skloviného popola základnej hmoty ryodacitového tufu³⁷. Okrem klinoptilolitu v tomto prírodnom mineráli sú v menšej miere prítomné živce, cristobalit a prechodné formy medzi cristobalitom a opálom.

Z literatúry je známy nielen detailný mineralogický a chemický rozbor^{28,31,37,39} (tabuľka I a II) tohto prírodného zeolitickejho minerálu, ale aj štúdium jeho morfológických vlastností a chemickej analýzy v porovnaní s trinásťimi svetovými ložiskami z hľadiska ich identifikácie, genézy a využitia^{39,40}. Klinoptilolit z východoslovenského ložiska je typu K-Ca (draselnovo-vápenatý) s malým zastúpením Fe, Mg a Na iónov ako aj ďalších iónov v stopových množstvách^{27,31,39}. Jeho pórovitosť je 24–32 % a efektívny priemer pôrov je 0,4 nm (cit.¹⁴). Klinoptilolit patrí do zeolitickej skupiny heulanditu. Je izostrukturálny s heulanditom^{2,41,42}.

Tabuľka I
Mineralogický rozbor zeolitu z ložiska Nižný Hrabovec³¹

Minerál	Obsah [%]
Klinoptilolit	84
Cristobalit	8
Živec	3–4
Iilit	4
Kremeň	stopy
Minerály uhličitanov	stopy (<0,5 %)

Tabuľka II

Chemický rozbor (XFS – Röntgenovou fluorescenčnou spektrometriou) zeolitu z ložiska Nižný Hrabovec³¹; pre porovnanie je uvedený rozbor vzoriek klinoptilolitu zo zahraničných ložísk

Zlúčenina	Obsah [%]		
	vzorka 0801/2 ^a	standard 1 ^b	standard 2 ^c
SiO ₂	66,4	67,3	66,8
Al ₂ O ₃	12,2	11,2	11,3
K ₂ O	3,33	5,05	3,74
CaO	3,04	0,99	0,79
Fe ₂ O ₃	1,45	1,38	0,97
MgO	0,56	<0,30	0,33
Na ₂ O	0,29	1,01	3,60
MnO	0,02	0,01	0,03
TiO ₂	0,15	0,25	0,10
P ₂ O ₅	0,02	0,03	0,02
Straty žíhaním	12,2	12,0	13,3
Celkový obsah	99,7	99,3	100,9

^a Vzorka klinoptilolitu z povrchového lomu Nižný Hrabovec,

^b Klinoptilolit Jordan Valley, Oregon,

^c Klinoptilolit Death Valley Junction, California

ZEOCEM a.s. Bystré je najvýznamnejším výrobcom zeolitickej výrobkov na Slovensku¹⁴. Ťažbou a spracovaním prírodného zeolitu sa zaoberá od začiatku 80-tych rokov. Firma má vlastné kvalitné ložisko prírodného zeolitu v Nižnom Hrabcovi, spracovateľské a výrobné kapacity. Ročná výrobná kapacita predstavuje v mletých zeolitov 200 000 t a u zrnitých zeolitov 20 000 t pri jednosmennej prevádzke.

Prírodný zeolit, ktorý faží a spracováva firma ZEOCEM, a.s. Bystre, je využívaný na Slovensku, ale aj v mnohých krajinách Európy v rôznych oblastiach hospodárstva. Do krajín Európy (Švajčiarska, Nemecko, Rakúška, Talianska, Poľska a Českej republiky) sa využíva viac ako polovica celkovej produkcie.

4. Zeolity ako nosiče agrochemikálií a hnojív

Prírodné zeolity vďaka svojej štruktúre, fyzikálnym a chemickým vlastnostiam sú výhodnými nosičmi rôznych druhov hnojív, nazývané „slow releasing fertilizers“ – pomaly uvoľ-

ňujúce hnojivá, dnes už v širšom zmysle „slow releasing agrochemicals“ – pomaly uvoľňujúce agrochemikálie, napr. herbicídy, pesticídy, rastové stimulátory a iné^{7,15,16,43–46}.

Významné sú ekologické aspekty využívania týchto druhov agrochemikálií na báze zeolitov, pretože ich uvoľňovanie do pôdy sa uskutočňuje postupne, pomaly. V prípade prudkých dažďov nedochádza k ich náhlemu vyplaveniu, a tým aj znečisteniu spodných vôd, resp. okolitých tokov riek.

Od roku 1971 sa na Katedre anorganickej chémie Prírodovedeckej fakulty UPJŠ v Košiciach študujú inkluzívne zlúčeniny a materiály pripravené na báze inkluzívnych zlúčenín z hľadiska prípravy, štúdia ich vlastností a možnosti využitia v praxi. V posledných dvoch desaťročiach pozornosť bola sústredená aj na štúdium prírodného zeolitu typu klinoptilolitu z domácich zdrojov, z východoslovenského ložiska z lokality Nižný Hrabovec. Predovšetkým išlo o využitie v poľnohospodárstve a ekoľigii – prírodný zeolit typu klinoptilolitu bol študovaný z hľadiska sorpcie hnojív, agrochemikálií, ako napr. insekticídov, herbicídov, rastových stimulátorov a ī.^{15–19,42–47} Taktiež výsledkom štúdia boli návrhy pre využitie prírodných zeolitickej materiálov ako pevných dezinfekčných materiálov^{7,48–50} a nosičov farmaceutík pre veterinárnu farmáciu^{50–54}.

Využitie materiálov na báze prírodného klinoptilolitu sa študovalo i v spolupráci s praxou. Možnosti aplikácie prírodného klinoptilolitu sa študovali aj s priemyselným podnikom CHEMKO, a.s. Strázske^{17,18,27,46}, v súčasnosti s CHEMZA, a.s. Strázske.

Po viacročnom úsilí a po sérii nádobových a poľných pokusov vyvinuli pracovníci Oddelenia výskumu CHEMKO, a.s. Strázske, v súčasnosti Odboru výskumu a rozvoja CHEMZA, a.s. Strázske, typovú radu zeolitickej granulovaného hnojiva ZEOMIX NPK s podielom klinoptilolitu 20–40 %. Hnojivo (ZEOMIX NPK) je viaczložkové obsahujúce hlavné živiny N, P, K, ako aj niektoré ďalšie biogénne prvky a to síru, bôr a molybdén^{20–24}.

ZEOCEM, a.s., Bystré vyrába rôzne výrobky na báze prírodného zeolitu určené pre rôzne oblasti hospodárstva¹⁴. Samotný Nitrosorb – upravená mletá prírodná hornina, ktorej podstatnú časť tvorí minerál klinoptilolit – má využitie ako ekologický materiál pre poľnohospodárstvo, priemysel a ekoľigu. Má využitie ako pomocná pôdna látka, prísada – nosná zložka pri výrobe kompostov, pre biologické čistenie vôd, ošetrovanie vín, sušenie obilník. ZEOCEM vyrába radu materiálov na báze zeolitov určených napr. pre zimné uskladňovanie koreňovej zelininy (ZELE-ZEO), univerzálny sorbent patchov a vlhkosti (ZEO SORB), minerálnu zeoliticú podstielku (ZEOANIMAL) využiteľnú pri chove hydiny, v ustajňovacích priestoroch (kone, hovädzí dobytok, a pod.). Okrem iných predností zeolitickej minerálnej podstielky, jeho využívaním sa znížia straty dusíka v exkrementoch a exkrementy majú lepší hnojivý účinok.

4.1. Hnojivá na báze zeolitov

V celosvetovom meradle sa využívajú rôzne druhy hnojív na báze zeolitov. Ich využívanie má radu predností. Prírodné zeolity ako nosiče rôznych druhov hnojív (pomaly uvoľňujúce hnojivá) uvoľňujú živiny postupne, nielen v prvom roku vegetačného obdobia, ale aj v druhom roku, prípadne ďalšom. Významná je aj hydratačná a dehydratačná schopnosť

zeolitov, ktorú možno využiť pri ovplyvňovaní vodného režimu v pôde, najmä pri pestovaní zeleniny, poľnohospodárskych plodín i okrasných rastlín. Výsledky overovania prídatku zeolitu na akumuláciu dusičnanov v zelenine boli jednoznačné. Zelenina pestovaná na pôde so zeolitom obsahovala až o 50 % dusičnanov menej oproti kontrole.

Zeoliticke hnojivo má niekoľko výhod: ide o hnojivo pripravené na báze netoxickej, prírodného materiálu, je ľahko aplikovateľné na začiatku vegetačného obdobia, je výhodné z ekologickej hľadiska, pretože nedochádza k znehodnocovaniu pôdy, spodných a povrchových vôd.

Z množstva rôznych druhov hnojív na báze zeolitov, ktoré sa využívajú vo svete, uvedieme iba niektoré druhy produkované domácimi výrobcomi.

Na základe pozitívnych výsledkov, dosiahnutých v malo-parcelkových i prevádzkových pokusoch, bolo granulované zeoliticke hnojivo s názvom ZEOMIX NPK ocenené Modrou planétou na Medzinárodnom chemickom veľtrhu Incheba v roku 1997.

ZEOMIX NPK (s obsahom hlavných živín: 8,5 % dusíka, 6,3 % fosforu ako P_2O_5 , 6,3 % draslíka ako K_2O , 11 % síry, 0,1 % bôru, 0,02 % molybdénu, ďalšie stopové prvky: titán, železo, horčík, vápnik) má ako hnojivo druhej generácie škálu zaujímavých účinkov na kvantitu a kvalitu úrody plodín, na pôdne prostredie a na niektoré zložky životného prostredia^{20–24}.

Tvorba úrody

- postupné uvoľňovanie živín z hnojiva podmieňuje pozitívny smerom proces tvorby kvantity úrody a jej technologickej kvality, ako napr. nízky obsah bielkovín u sladovníckeho jačmeňa, vysokú cukernatosť u cukrovej repy, vysoký obsah lepku v potravinárskej pšenici a pod.
- hnojivo pôsobí ako rastový regulátor s účinkom rastlinného kondicionéra, rastliny v dobrej kondícii úspešnejšie odolávajú tlaku hubovitých patogénov v priebehu vegetačného obdobia
- hnojivo neumožňuje zvýšený príjem dusíka rastlinou, v dôsledku čoho rastlinná produkcia obsahuje hygienicky podľimitný obsah dusičnanov
- imobilizáciu ťažkých živín v pôde hnojivo umožňuje dopestoovať hygienicky nezávadnú produkciu aj na kontaminované pôde

Pôdne prostredie

- hnojivo pozitívne vplyva na komplex chemických vlastností pôdy
- do značnej miery eliminuje negatívny vplyv kyslých kontaminantov pôdy SO_2 a NO_x
- pozitívny účinok sa prejavuje aj na zlepšení fyzikálnych a štruktúrnych vlastností pôdy

Životné prostredie

- živiny v hnojive sú uzavreté v zeolite, takže nedochádza k ich vyplavovaniu a znečisťovaniu povrchových a spodných vôd

Z výsledkov poľných pokusov je možné stručne uviesť:

- pokusmi v Podielnickom obchodnom družstve (POD) Stropkov pri hnojení ozimnej pšenice v dávke 3,0 t.ha⁻¹ ZEOMIX NPK sa v priebehu troch rokov podarilo stabilizovať úrody na úrovni 4,0 t.ha⁻¹ s obsahom lepku 26 %.

- v Agrifop Stakčín bola hnojená ZEOMIXOM NPK ozimá repka v dávke 4,0 t.ha⁻¹. Hnojenie stabilizovalo úrodu semena repky v rozmedzí 3,0–3,5 t.ha⁻¹.
- v Podielnickom obchodnom družstve (POD) Večec bol pestovaný jarný jačmeň sladovníčky s hnojením v dávke 3,0 t.ha⁻¹ ZEOMIXU NPK, pritom sa stabilizovali najmä parametre sladovníckej kvality, predovšetkým obsah bielkovín do 11 %.
- v Podielnickom družstve (PD) Vranov boli hnojené ZEOMIXOM porasty cukrovej repy v dávke 4,0 t.ha⁻¹ pri významnom zvýšení cukornatosti buliev repy na 16 %.

Viaczložkové ekologické hnojivo v práškovej forme s názvom KLINOFERT-NPK (vyrába ZEOCEM, a.s., Bystré). Obsah dusíka je min. 6,0 %, fosforu (P_2O_5) min. 4,5 %, draslíka (K_2O) a síry (SO_4^{2-}) min. 10 %. Je vhodné pre hnojenie zeleniny.

5. Zeolity ako prísada krmív

Prídavok prírodného zeolitu vo veľmi nízkej dávke (cca 1–2 %) zvyšuje veľmi dôležité funkcie, ktoré nie sú zaznamenané inými prírodnými látkami.

V podmienkach SR bol dokázany výskyt mykotoxínov v krmivách rastlinného a živočíšneho pôvodu. Medzi najviac rozšírené mykotoxíny patria aflatoxíny B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ a ochratoxín A. Ich producentmi sú toxinogénne kmenne *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*. Mykotoxíny majú rozličné toxicke účinky a sú mimoriadne dôležité vo veľkochovoch ošípaných a hydiny. V podmienkach SR bola dokázaná 40–80 % kontaminácia obilnín druhmi *Fusarium graminearum* a *F. poae*. Ako účinný prípravok na degradáciu toxínov v krmive sa pri testovaní prejavil klinoptilolit z ložiska v Nižnom Hraboveci v koncentrácií 0,9–1,7 kg na 100 kg krmiva.

Ako efektívne kŕmne prídatky sa u monogastrických zvierat dobre uplatňujú soli organických kyselín, najmä mrvčan vápenaty³¹. Sú to baktericídne a acidifikujúce účinky kŕmnej zmesi a celková úprava pH zažívacieho traktu zvierat. V konečnom dôsledku sa zvyšuje rastová intenzita zvierat a konverzia krmiva. Za účelom ďalšieho posilnenia týchto pozitívnych účinkov bola 1/2 mrvčanu vápenatého nahradená zeolitom typu klinoptilolitu, ktorý tu vystupuje ako nosič kyseliny mrvčej. V procese trávenia zvierat sa mrvčan premieňa na kyselinu mrvčiu a až táto môže efektívne ovplyvniť proces trávenia. Prídavok v kŕmnej zmesi s 50 % mrvčanu, 8 % kyseliny mrvčej a 42 % klinoptilolitu sa ukazuje ako vhodný pre zvýšenie intenzity rastu a konverzie krmiva pre výkrmové ošípané a hydinu.

6. Záver

V moderných predstavách ekologického poľnohospodárstva má zeolit typu klinoptilolitu, ako materiál prírodný, inertný a netoxický, široké možnosti využitia. Štruktúra prírodného klinoptilolitu je ideálna pre sorpčné a iónovymenné procesy. Vďaka tejto štruktúre a vlastnostiam zeolit je využiteľný ako pomaly uvoľňujúci nosič rôznych druhov agrochemikálií vrátane hnojív, farmaceuticky a biochemicky účinných látok určených pre veterinárnu farmáciu, ako aj dezinfekčných lá-

tok. Prírodné zeolity sú využiteľné pri zlepšovaní pôdnych fyzikálnych vlastností a úprave kontaminovaných pôd. Prírodný zeolit je vhodný aj ako prísada krmív vo veľmi nízkych dávkach, čo zatiaľ nebolo zaznamenané pri štúdiu iných prírodných minerálov.

I napriek širokému uplatneniu zeolitov sa naďalej hľadajú možnosti ich ďalšej aplikácie.

Autori ďakujú Vedeckej grantovej agentúre Slovenskej republiky (grant I/8049/01) za finančnú podporu.

LITERATÚRA

1. Van Bekkum H., Flanigen E. M., Jansen J. C., ed.: *Introduction to Zeolite Science and Practice*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 2001.
2. Breck D. W.: *Zeolite Molecular Sieves: Structure, Chemistry and Use*. Wiley, New York 1974.
3. Pond W. G., Mumpton F. A., ed.: *Zeo-Agricultures: Use of Natural Zeolites in Agriculture and Aquaculture*. Westview Press, Boulder, Colorado 1984.
4. Chmielewska E., Jesenák K., Gáplovská K.: *Proc. 2 do Congreso Mexicano de Zeolitas Naturales, Puebla Mexico, 11–14 November 2001*, str. 157.
5. Herron N., v knihe: *Inclusion Compounds* (Atwood J. L., Davies J. E. D., MacNicol D. D., ed.), sv. 5, kap. 3. Oxford University Press, Oxford 1991.
6. Reháková M.: *Zborník 53. zjazdu chemických spoločností č. 2, Banská Bystrica, 3.–6. septembra 2001*, str. 89.
7. Reháková M.: *Habilitačná práca*. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice 1997.
8. Čuvanová S.: *Rigorózna práca*. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice 2001.
9. Kalló D., Sherry H. S., ed.: *Occurrence, Properties and Utilisation of Natural Zeolites*. Akadémiai, Budapest 1988.
10. Čejka J.: Chem. Listy 92, 13 (1998).
11. Čejka J., Žilková N.: Chem. Listy 94, 278 (2000).
12. Navrátilová M., Sporka K.: Chem. Listy 92, 998 (1998).
13. Navrátilová M., Sporka K.: Chem. Listy 94, 445 (2000).
14. ZEOCEM, a.s.: *Vieme ako ulahodiť prírode*, 2001, <http://www.zeocem.sk>; 16.2.2001.
15. Sopková A., Janoková E.: J. Therm. Anal. 53, 477 (1998).
16. Sopková A., Mezeš P.: J. Therm. Anal. 46, 471 (1996).
17. Šingliar M., Sopková A., Bubanec J., Fabián P., Kaľavský F.: Agrochémia 32, 91 (1992).
18. Sopková A., Bubanec J., Černaj P., Šingliar M., Mondík P., Budínska V., Fabián P.: Chem. Prum. 43/68, 145 (1993).
19. Sopková A., Mondík P., Černaj P.: *Zborník konferencie Pestovanie, zber a spracovanie liečivých rastlín, Vysoké Tatry, Jún 1993*, str. 78.
20. Rimár J.: Agrochémia 4, 14 (1998).
21. Rimár J., Gavaľová Z.: Repné Listy 1, 8 (2001).
22. Rimár J., Gavaľová Z.: Naše Pole 3, 13 (2001).
23. Rimár J., Gavaľová Z., Zeleňák J.: Agrochémia 3, 23 (2001).
24. Gavaľová Z., Rimár J., Zeleňák J.: *Zborník 53. zjazdu chemických spoločností č. 3, Banská Bystrica, 3.–6. september 2001*, str. 398.
25. Allen E. R., Ming D. W.: *Zeolites in Agronomic and*

- Horticultural Applications: A Review, 2001;* <http://www.amzorb.com>, 21.6.2001.
26. Mannion W. A.: *Zeolites in Horticulture, 2001;* <http://www.amzorb.com>, 21.6.2001.
 27. Sopková A., Bubanec J., Šingliar M., Kaňavský F., Fabián P.: Chem. Prum. 44/69, 102 (1994).
 28. Horváthová E.: Chem. Prum. 38, 351 (1988).
 29. Maha M. M. A.: *Dizertačná práca.* Cairo University, Cairo 1996.
 30. Animal Feeding; <http://www.atzzeoliti.it>, 25.7.1999.
 31. Zeleňák J., Gavařová Z.: *Využitie mravčanu vápenatého ako prísady do kŕmnych zmesí a konzervačných prípravkov.* Materiál pre záverečnú kontrolu úlohy RVT, príloha č. 5, 2001.
 32. Barrer R. M., v knihe: *Inclusion Compounds* (Atwood J. L., Davies J. E. D., MacNicol D. D., ed.), sv. 1, kap. 6. Academic Press, London 1984.
 33. Schöllhorn R., v knihe: *Inclusion Compounds* (Atwood J. L., Davies J. E. D., Mac Nicol D. D., ed.), sv. 1, kap. 7. Academic Press, London 1984.
 34. Ming D. W., Mumpton F. A., v knihe: *Minerals in Soil Environments* (Dixon J. B., Weed S. B., ed.). Soil Science Society of America, Madison 1989.
 35. Meier W. M.: *Zeolites and Zeolite-like Materials, Proc. 7th Int. Zeolite Conf.* Elsevier, Tokyo 1986.
 36. Chmielewska E., Šamajová E., Kozáč J.: Turk. J. Chem. 26, 281 (2002).
 37. Šamajová E., v knihe: *Occurrence, Properties and Utilisation of Natural Zeolites* (Kalló S., Sherry H. S., ed.). Akadémiai, Budapest 1988.
 38. Kraus J., Kužvant M.: *Ložiská nerúd.* Alfa, Praha 1987.
 39. Sopková A., Bubanec J., Mihalič A.: Rudy 10, 36 (1988).
 40. Sopková A., Bubanec J.: Chem. Prum. 38, 11(1988).
 41. Bauer J.: Ropa Uhlie 23, 202 (1981).
 42. Meier W. M., Olson D. H.: *Atlas of Zeolite Structure Types.* Butterworth, London 1987.
 43. Sopková A., Mondík P., Reháková M.: Ictac News 28/2, 112 (1995).
 44. Reháková M., Bubanec J.: *Zborník súhrnu prednášok zo seminára: 35 rokov výučby a výskumu v oblasti anorganickej chémie na PF UPJŠ. KACH PF UPJŠ Košice, Košice, 11. september 2000,* str. 37.
 45. Reháková M.: *Zborník III. odborného seminára s medzi-* národnou účasťou: *Partikulárne látky vo vede, priemysle a v životnom prostredí, Košice, 6.–7. decembra 2000,* str. 19.
 46. Sopková A., Bubanec J., Šingliar M., Černaj P., Fabián P.: *Ekologické hnojivo.* ČSPV, 6523-90, 1990.
 47. Sopková A., Černaj P., Reháková M., Bubanec J., Mondík P.: *Proc. of the Int. Conf.: Enviroment and Mineral Processing, Ostrava, 30. jún–1. júl 1994,* str. 227.
 48. Reháková M., Sopková A., Lokaj J.: *J. Inclusion Phenom. Mol. Recogn. Chem.* 14, 47 (1992).
 49. Reháková M., Sopková A., Casciola M., Bastl Z.: *Solid State Ionics* 66, 189 (1993).
 50. Sopková A., Mondík P., Reháková M.: *S.T.P. Pharma Sci.* 4, 366 (1994).
 51. Mondík P.: *Kandidátska dizertačná práca.* CHTF STU, Bratislava 1993.
 52. Sopková A., Mondík P.: *50. sjezd chemických společností, Zlín, 8.–11. září 1997.* Abstrakt príspevkov, str. 189.
 53. Mondík P., Sopková A., Viernstein H., Legéndre B.: *Proc. of the Eighth Int. Symp. on Cyclodextrins* (Szejtli J., Szente L., ed.), str. 197. Kluwer Academic Publishers, Budapest 1996.
 54. Mondík P., Sopková A., Viernstein H., Légendre B.: *J. Therm. Anal.* 51, 1023 (1998).

M. Reháková^a, S. Čuvanová^a, Z. Gavařová^b, and J. Rimář^b (^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of P. J. Šafárik, Košice, ^bSection of Research, CHEMZA, a.s. Strážske, Slovak Republic): **Application of Natural Zeolite of the Clinoptilolite Type in Agrochemistry and Agriculture**

Zeolites of the clinoptilolite type, as natural, inert and nontoxic materials, are widely applicable in the contemporary notion of ecological agriculture. Their structure is ideal for sorption and for ion exchange processes. Due to their structure and properties, the zeolites can be used as a slowly releasing carrier of agrochemicals, fertilizers, pharmaceutically and biochemically active compounds for veterinary pharmacy, including disinfectants. Natural zeolites can be also used for improving physical properties of soils and for treatment of contaminated soils. They are also suitable as additives to animal feed, where they enhance important body functions.

HYDROFOBIZÁCIA POVRCCHOVÝCH POLYMÉRNYCH VRSTIEV UV ŽIARENÍM

IVANA LÖRINCZOVÁ, VIERA JANČOVIČOVÁ
a MICHAL ČEPPAN

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: lorinczova@chelin.ctf.stuba.sk

Došlo 13.2.02, prepracované 10.11.02, prijaté 5.12.02.

Kľúčové slová: hydrofilné vrstvy, fotopolymerizácia, ink-jetové výtláčky

Obsah

1. Úvod
2. Metódy hydrofobizácie
3. Hydrofobizácia prostredníctvom fotopolymerizácie
4. Hydrofobizácia povrchových vrstiev médií pre ink-jetovú tlač
5. Fotochemická stabilizácia ink-jetových výtláčkov
6. Záver

1. Úvod

Hydrofilné polymérne vrstvy sú polárne materiály, ktoré ponúkajú excelentnú rezistenciu voči nepolárnym rozpúšťadlám a zásadám, oxidačným a redukčným činidlám¹. Ich problémom je však degradácia vo vlhkom prostredí.

Cieľom tejto prehľadnej práce je zhŕnutie najnovších poznatkov týkajúcich sa programovej hydrofobizácie hydrofilných vrstiev prostredníctvom fotopolymerizácie a ich využitie na stabilizáciu ink-jetových výtláčkov voči vlhkosti prostredníctvom UV-vytvrdzovateľných polymérnych vrstiev nanesených na papier.

2. Metódy hydrofobizácie

Modifikácia hydrofilných vrstiev na vrstvy hydrofóbne sa v praxi využíva na rôzne špecifické účely, napr. pri ukotvovaní farby na papier, na ochranu kamenných sôch a monumentov, ochranu predmetov voči korózii a v mikroelektronike. Preplňanie týchto vlastností je realizovateľné rôznymi metódami, napr. fotochemickou modifikáciou vrstvy pôsobením UV žiarenia, chemickou polymerizáciou, tvorbou nerozpustných komplexov prídatkom špeciálneho činidla alebo využitím fyzikálnych princípov schnutia a následných chemických reakcií prebiehajúcich v sledovanej vrstve.

3. Hydrofobizácia prostredníctvom fotopolymerizácie

UV-vytvrdzovateľné systémy všeobecne vyhovujú vzrasťajúcim environmentálnym záujmom, ktoré limitujú používanie toxickejých rozpúšťadlových systémov, prchavých látok a iných aditív². Tekutá formulácia môže byť takmer okamžite transformovaná na tuhý polymérny materiál jednoduchou expozíciou UV svetlom pri bežnej teplote vzduchu bez emisie prchavých organických zlúčení a s nízkou spotrebou energie^{3–5}.

Bezrozprúšadlové UV-vytvrdzovateľné živice obsahujú zmes fotoiniciátora, funkčného monomeru a monomeru s nízkym bodom vyparovania, ktorý plní úlohu reaktívneho riedidla pri úprave viskozity systému⁶.

Súčasným trendom je nahradzanie toxickejch monomerov alebo redukcia ich obsahu a snaha o rozvoj vodou riediteľných UV-vytvrdzovateľných systémov, pretože voda je jedinečným a žiadaným rozpúšťadlom⁷ vďaka svojej netoxickosti, nízkej cene a zároveň schopnosti regulovať viskozitu kompatibilných systémov.

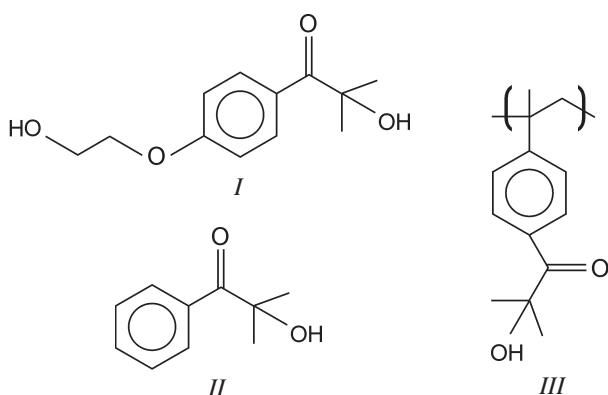
Nevýhodou pripravených hydrofilných vrstiev je ich nižšia chemická a mechanická odolnosť a tiež zvýšenie času potrebného na spracovanie vrstvy kvôli zavedeniu fázy sušenia náteru – odstránenie vody z disperzie potrebnej na dosiahnutie koalescencie častic. V on-line vytvrdzovacích aplikáciach je limitujúcim faktorom pre rýchlosť spracovania doba schnutia, ktorá môže byť výrazne urýchlená použitím infračerveného žiarenia. Ďalším z problémov sprievodným pre vodu riediteľné nátery, ktorý vyplýva z ich hydrofilného charakteru, je degradácia vplyvom vlhkosti⁸.

Modifikáciou tenkých hydrofilných vrstiev prostredníctvom expozície UV-žiareniom, ktoré iniciauje proces fotopolymerizácie, a tým eliminuje spomínané nevýhody, možno zabezpečiť programované prepínanie vlastností ožiarenej vrstvy. Získaná vrstva vyzkúša kombináciu flexibilných vlastností polymérov s vysokou molekulovou hmotnosťou a vysokej pevnosti polymérnej siete.

Základnými požiadavkami na fotoiniciátory^{9–13} používané v UV-vytvrdzovateľných systémoch pre nátery papiera sú^{14–19}:

- vysoká absorpcia v oblasti použitého žiarenia,
- vysoký kvantový výtažok pre vznik radikálov,
- vodorozpustnosť alebo schopnosť tvorby vodných disperzií,
- nežltnutie,
- bezzápachovosť,
- nízka prchavosť,
- netoxickosť,
- nízka migrácia,
- cenová efektivita.

Vodorozpustné iniciaitory, ktoré sa využívajú pri micelárnej fotopolymerizácii, fotochemickom očkovani, chemických syntézach, na prípravu povrchových náterov a prijímacích vrstiev zobrazovacích médií, splňajú vo väčšine prípadov požiadavku netoxickosti a majú nízku tendenciu migrovať k po-



vrchu, čo prispieva k zlepšeniu vlastností vytvrdených kompozícii. Medzi vodorozpustné iniciátory patria deriváty acetofenónu, antrachinónu, benzilu, benzoínu a benzofenónu, ktoré majú kvôli vodorozpustnosti zavedenú vhodnú funkčnú skupinu ($-\text{OH}$; $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; $-\text{COOH}$; $-\text{SO}_3\text{H}$; $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$, kde M je alkalický kov; $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{X}^-$, kde X je Cl alebo Br) (cit. ²⁰).

Aj keď v súčasnosti existuje veľké množstvo iniciátorov, problémom zostáva ich dobrá vodorozpustnosť. Vo väčšine prípadov sa pohybuje pod 1 %. Príkladom kommerčne využívanych iniciátorov pre vodné disperzie sú fenyl(1-hydroxyalkyl)ketóny Irgacure 2959 (*I*) (cit. ²¹) a Darocur 1173 (*II*) (cit. ²²) (Ciba Specialty Chemicals) a Esacure KIP150 (*III*) (cit. ²³) (Sartomer).

Fenyl(1-hydroxyalkyl)ketóny sú vysoko reaktívne foto-iniciátory, ktoré poskytujú vyššiu termickú stabilitu ako benzil ketály a súčasne sú prezentované najlepšou farebnou charakteristikou, teda majú najnižší stupeň žltnutia v porovnaní s ostatnými komerčnými fotoiniciátormi. Po ožiareni (schéma 1) je formovaný benzoylový radikál (*IV*), ktorý iniciuje proces polymerizácie, ale aj 1-hydroxyalkyllový radikál (*V*) sa čiastočne podieľa na procese iniciácie. Konkurenčnými reakciami iniciácie sú rekombináčne reakcie, ktoré poskytujú formovanie benzilu, benzoínu a pinakolu, zatiaľ čo disproporcionáciou vzniká benzaldehyd a acetón ²⁴.

Vodou riediteľná UV-vytvrzovateľná polymérna vrstva môže obsahovať jeden alebo viac polymérov, ktoré majú hydrofilný charakter. Príkladmi vhodných vo vode rozpustných spojív sú bežný aj modifikovaný poly(vinylalkohol), poly(vinylpyrrolidón), poly(etylénoxid), kyselina polyakrylová, poly(akrylamid) a jeho kopolyméry, metylcelulóza, deriváty celulózy a želatína ^{25–28}. Medzi vo vode dispergovateľné živice patria polyakryláty, polimetakryláty, polyuretány ²⁹ a poly(vinylacetáty). Rôzne polymérne spojivá majú odlišnú schopnosť absorbovať vodu, ktorá závisí od ich štruktúry, hydrofility funkčných skupín a molekulovej hmotnosti ³⁰. Príklady komerčných vodorozpustných živíc, ktoré sa používajú aj ako

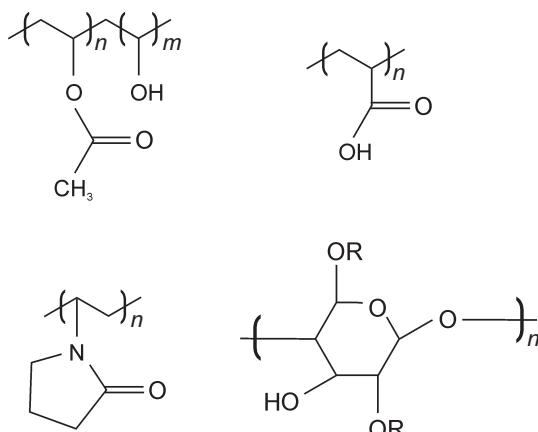
báza prijímacích vrstiev pre ink-jetovú tlač, sú uvedené na obr. 1.

4. Hydrofobizácia povrchových vrstiev médií pre ink-jetovú tlač

Nízka odolnosť ink-jetových výtlačkov voči vlhkosti je už dlhodobým problémom ich exteriérových aplikácií, preto sa hľadajú možnosti na jej zvýšenie ^{31,32}. V súčasnosti sa znižovanie kvality ink-jetových výtlačkov atmosferickými vplyvmi eliminuje napríklad iónovou či neiónovou interakciou farby a substrátu, laminovaním, použitím UV-vytvrzovateľných ink-jetových farieb a prostredníctvom rôznych transparentných náterov papiera založených na princípoch platných pre hydrofobizáciu hydrofilných vrstiev ³³.

Rezistencia ink-jetových farieb s rozpustenými farbivami voči vode sa v praxi bežne dosahuje prídavkom katiónovej zložky napríklad na báze silikátov ^{34,35} do pôrovitého polymérneho náteru, ktorý s aniónovou farbou vytvára nerazpustný komplex ³⁶, alebo využitím mikroporózneho náteru ³⁷ s kapilármi orientovanými kolmo na povrch náteru, umožňujúcimi kapilárny tok, ktoré sa účinkom vody obsiahnutej v ink-jetovej farbe po jej transporte kapilárou na papier uzavrú. Stabilitu výtlačkov možno zvýšiť tiež použitím špeciálnej ink-jetovej farby, ktorá pracuje na princípe spontánnej dehydratácie zmesi farby po jej nanesení na substrát za vzniku komplexu tvoreného ink-jetovou farbou a polymérnom soľou na báze amónia a zirkónia ³⁸. Pigmenty v pigmentových ink-jetových farbách sú fixované v obrovskom vnútornom priestore pôrovitých náterov po odstránení disperzného média, teda vody, odparením ³⁹.

Požadovanými vlastnosťami kontinuálnej prijímacej vrstvy



Obr. 1. Komerčné vodorozpustné živice používané ako prijímacie vrstvy pre ink-jetovú tlač

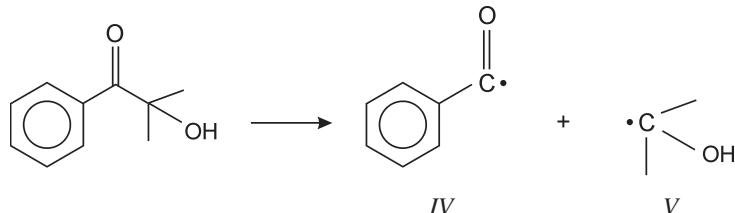


Schéma 1. Reakcia fenyl(1-hydroxyalkyl)ketónového iniciátora v roztoku po expozícii UV žiareniom

vy ink-jetového média sú vysoká afinita k ink-jetovej farbe daná hydrofilou vrstvou, dostatočná mechanická pevnosť náteru pre spracovanie ink-jetovou tlačou⁴⁰, bezfarebnosť a netoxickosť. Po spracovaní by mal optimálny náter vyhovovať nasledujúcim požiadavkám³⁷:

- rýchle schnutie atramentu,
- vysoká farebná optická hustota a brilantnosť zobrazenia,
- vysoká ostrosť tláčových bodov (vysoké rozlíšenie),
- mechanická rezistencia náteru,
- vysoká stálosť výtláčku (rezistencia voči vode, svetlu a UV žiareniu),
- dobrá charakteristika starnutia,
- univerzálnosť.

5. Stabilizácia ink-jetových výtláčkov UV žiareniom

Princípom stabilizácie ink-jetových výtláčkov je hydrofiličnosť vodorozpustnej ink-jetovej farby v nelepivej a mechanicky odolnej hydrofilnej prijímacej vrstve papiera počas prostredníctvom krátkodobej expozície UV-žiareniom. Expozíciou sa ink-jetový výtláčok stáva odolný voči vlhkosti, čo umožňuje jeho exteriérové aplikácie.

Dizajn náterov ink-jetových médií požaduje detailný výber polymérnych spojív prijímacej vrstvy, pretože interakcia farba-médium je hlavnou hnacou silou molekulovej difúzie farby, ktorá je základným princípom ukotvenia atramentu tradičných kontinuálnych vrstiev náteru a substrátu^{30,41}.

Zmenu vlastností polymérneho filmu vytvoreného UV-

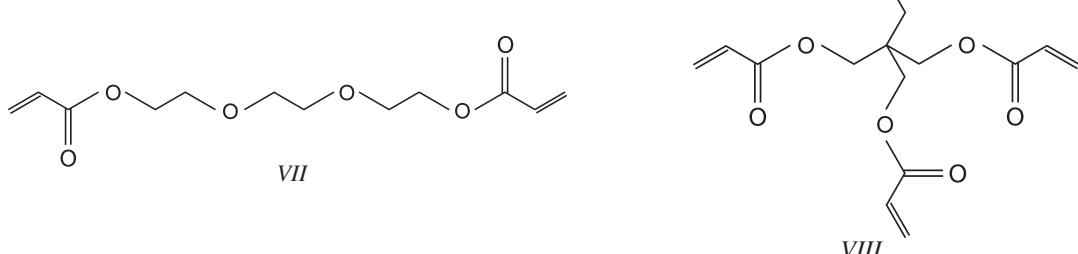
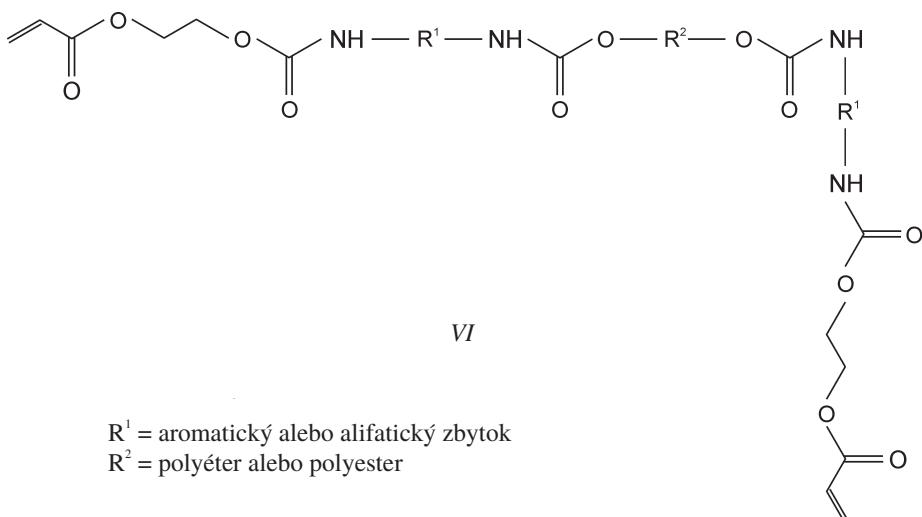
-vytvrdzovaním vodnej disperzie nanesenej na papieri sledovali už rôzni autori, ale zatiaľ ešte nebola vyuvinutá UV-vytvrditeľná hydrofilná vrstva, ktorá by spĺňala vlastnosti optimálnej prijímacej vrstvy pre ink-jetovú tlač.

Vodná disperzia na báze difunkčného uretán-akrylátového oligomeru (VI) (cit.^{4,42}) alebo systémy obsahujúcej vodorozpustné viacfunkčné akryláty⁴³, napr. trietylenglykoldiakrylát (VII), trimetylolpropántriakrylát (VIII) za prítomnosti fenyl(1-hydroxyalkyl)ketónového iniciátora, by na základe rozsiahlej rešerše zo súčasného stavu problematiky mali vyhovovať podmienkam požadovaným.

Hlavná aplikácia tejto „zelenej technológie“ sa očakáva v polygrafickom a náterovom priemysle, vo všeobecnosti ako náter pre póravite materiály, ako je papier, kde môže byť doba fázy sušenia markantne skrátená. Tiež umožňuje vytvárať nátery hrubé len niekoľko µm s expozičiou kratšou ako 1 sekunda, čo je dôležitou požiadavkou pri spracovávaní ink-jetových výtláčkov. Pri použití pre exteriérové aplikácie tieto nátery vyžadujú prípadov svetelných stabilizátorov, hlavne UV absorbériov a lapačov voľných radikálov HALS (hindered amine light stabilizers) (cit.^{31,44,45}), na zlepšenie odolnosti voči počasiu a zaručenie efektívnej ochrany organického substrátu voči slnečnému žiareniu.

6. Záver

Z environmentálneho hľadiska, hydrofilné vrstvy limitujú použitie toxickejch prchavých zlúčenín. Avšak ich nevýhodou vyplývajúcou z ich hydrofilnej povahy je vysoká citlivosť na



vodu. Riadenou hydrofobizáciou hydrofilných vrstiev je možné získať mechanické, chemické a fyzikálne vlastnosti porovnateľné s vlastnosťami rozpušťadlových systémov.

Vodorozpustnosť ink-jetových farieb obmedzuje exteriérové použitie ink-jetových výtláčkov, pretože pôsobením vlhkosti výrazne klesá kvalita zobrazenia. Vyvinutím hydrofilnej UV-vytvrdzovateľnej prijímacej vrstvy papiera by bolo možné stabilizovať ink-jetové výtlacky voči vlhkosti fotopolymézácii prijímacej vrstvy, čo by mohlo predstavovať progresívnu metódu využiteľnú v praxi.

Dakujeme grantu VEGA 1/9146/02 za podporu tejto práce.

LITERATÚRA

1. Sartomer (Pennsylvania): *Appl. Bulletin: Hydrophilic vs. Hydrophobic Monomers*, 1997; <http://www.sartomer.com>, marec 2002.
2. Yukiyasu K., Urban W. M.: *Prog. Org. Coat.* 35, 247 (1999).
3. Visconti M., Cattaneo M.: *Prog. Org. Coat.* 40, 243 (2000).
4. Masson F., Decker C., Jaworek T., Schwalm R.: *Prog. Org. Coat.* 39, 115 (2000).
5. Sartomer (Pennsylvania): *Weather Resistant Oligomers*, 1997; <http://www.sartomer.com>, marec 2002.
6. Roffey C. G.: *Photopolymerisation of Surface Coating*. Wiley, New York 1982.
7. Nicholson J. W.: *J. Oil Colour Chem. Assoc.* 1, 1 (1987).
8. Van der Wel G. K., Adan O. C. G.: *Prog. Org. Coat.* 37, 1 (1999).
9. Heine H. G., Rosenkranz H. J., Rudolph H.: *Angew. Chem., Internet. Ed. Engl.* 11, 974 (1972).
10. Pryce A.: *J. Oil Colour Chem. Assoc.* 59, 166 (1976).
11. Berner G., Kirchmayer R., Rist G.: *J. Oil Colour Chem. Assoc.* 61, 105 (1978).
12. Manfred M., Henne A., J.: *Radiat. Curing* 10, 16 (1983).
13. Hageman H. J.: *Progr. Org. Coat.* 13, 123 (1985).
14. Yoshiyuki K., Kayuzuki M., Toshio S., Mitsuhiro M., Hiromi M. (Dainippon Toryo Kk.): US 5,013,769 (C08F122/22).
15. Borzel P., Haring E. (BASF Farben & Fasern): DE 3304524 (B29D11/00).
16. Murray K. P., Bishop T. E. (Desoto Inc.): WO 90 13579 (C08F18/02).
17. Phan X. T.: *Radiat. Curing* 13, 11 (1986).
18. Kirchmayer R., Berner G., Huesler R., Rist G.: *Farbe Lack* 88, 910 (1982).
19. Segurola J., Allen S. N., Edge M., Mc Mahon A.: *Prog. Org. Coat.* 37, 23 (1999).
20. Green W. A., Timms A. W., v knihe: *Radiation Curing in Polymer Science and Technology* (Fouassier J. P., Rabek J. F., ed.), zv. II, kap. 7. Elsevier, London 1993.
21. Ciba Specialty Chemicals (Švajčiarsko): *Irgacure 2959 (Data Sheets)*, 2000; <http://www.cabasc.com>
22. Ciba Specialty Chemicals (Švajčiarsko): *Darocur 1173 (Data Sheets)*, 1997; <http://www.cabasc.com>, marec 2002.
23. Sartomer (Pennsylvania): *Product bulletin: Photoinitiators*, 1996; <http://www.sartomer.com>, marec 2002.
24. Segurola J., Allen S. N., Edge M., Mc Mahon A., Wilson S.: *Polym. Degrad. Stab.* 64, 39 (1999).
25. Kajiani K., Maruyama H., Shiraishi M. (Kuraray Co.): US 4,617,239 (B41M5/00J).
26. Sato T., Fujiwara N., Jikihara A. (Kuraray Co.): US 5,710,211 (C08F8/12).
27. Viola M. S., Bedell S. F. (Polaroid Corp.): US 4,547,405 (B41M5/00J).
28. Onishi H., Iida J., Owatari A. (Seiko Epson Corp.): US 5,662,997 (B41M5/00).
29. Gensho T., Yamada T., Kinoshita H., Takahashi T. (Nicca Chemical Co.): EP 1068959 (B41M5/00).
30. Yuan S., Sargent S., Rundus J., Jones N., Nguyen K.: *13th International Conference on Digital Printing Technologies, No Impact Printing: The Development of Receiving Coating for Inkjet Imaging Applications, Seattle, November 2–7, 1997*; Proceedings, str. 413. IS&T, Springfield 1997.
31. Schirrmann P., Dexter M.: *Handbook of Coating Additives*, str. 225. Marcel Decker, New York 1987.
32. Valet A.: *Prog. Org. Coat.* 35, 223 (1999).
33. Karovičová I., Jančovičová V., Čiernik R., Čeppan M.: *53. zjazd chemických spoločností, Banská Bystrica, 3.–6. september 2001*, zborník str. 90. FPV Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica 2001.
34. Welsh W. A. Chapman D. M., v knihe: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, zv. A23: *Silica*, kap. 5. Wiley-VCH, Weinheim 1993; www.wiley-vch.de/vch/software/ullmann, marec 2002.
35. Chapman D. M., Pryor J. N. (Grace W R & Co.): PCT WO 0002814 (C01B33/141).
36. Gold M., Goetzen K., Niemöller A. (Sihl GmbH): US 5,853,540 (B41M5/00).
37. Walchli C. P.: *Proceedings of 47th Annual Conference, Rochester, New York, May 15–20, 1994*, str. 253. IS&T, Springfield 1994.
38. Bares S. J. (Hewlett Packard Co.): EP0526025 (C09B69/00).
39. Niemöller A., Becker A.: *13th International Conference on Digital Printing Technologies, No Impact Printing: Interactions of Ink Jet Inks with Ink Jet Coatings, Seattle, Washington, November 2–7, 1997*. Proceedings, str. 430. IS&T, Springfield 1997.
40. Panák J., Dvonka V., Karpinský L., Kordoš P., Mikula M., Jakuciewicz S.: *Polygrafické minimum*, str. 223. Typoset, Bratislava 2000.
41. Khoulchae K., Graczyk T.: *J. Imaging Sci. Technol.* 45, 16 (2001).
42. Sartomer (Pennsylvania): *Urethane Acrylate Oligomers*, 1997; <http://www.sartomer.com>, marec 2002.
43. Hirose M., Zhou J., Kadowaki F.: *Colloids Surf.*, A 153, 481 (1999).
44. Berner G., Rembold M.: *Farbe Lack* 89, 840 (1983).
45. Jurgetz A., Rothbaecherr H., Bliefert C.: *Farbe Lack* 91, 921 (1985).

I. Lörinczová, V. Jančovičová, and M. Čeppan (*Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Hydrophobization of Surface Polymer Layers by UV Radiation**

In this review, the progress recently made in hydrophobization of hydrophilic layers is outlined, with special emphasis on hydrophobization by photopolymerization and on modification of receiving layers of ink-jet media with the aim of improving water resistance of prints.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

UV SPEKTOFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ SMĚSÍ FENOLU A CHLORFENOLŮ VE VODÁCH S POUŽITÍM PROJEKCE DO LATENTNÍCH STRUKTUR A KALMANOVA FILTRU

ROMANA KOSTRHOUNOVÁ-ŠTĚPÁNKOVÁ^a,
LUDĚK JANČÁŘ^b a LUMÍR SOMMER^c

^aRECETOX, Fakulta přírodovědecká, Masarykova univerzita, Kamenice 126/3, 625 00 Brno, ^bKatedra chemie, Fakulta pedagogická, Masarykova univerzita, Poříčí 7, 603 00 Brno, ^cÚstav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické, Purkyňova 118, 612 00 Brno

e-mail: kostrhounova@recetox.muni.cz, sommer@fch.vutbr.cz

Došlo 12.4.03, přepracováno 20.1.03, přijato 20.3.03.

Klíčová slova: spektrofotometrie, multivariatní kalibrace, projekce do latentních struktur (PLS), Kalmanův filtr, fenol, chlorfenoly

Úvod

Fenol a chlorfenoly jsou významnými polutanty životního prostředí a jsou hojně využívány jako prostředky pro konzervaci dřeva, pesticidy, herbicidy a fungicidy, případně mohou vznikat při jejich metabolizaci. Jejich všeobecné použití produkují výraznou reziduální vodu ve vodách, půdě i potravinách. Výskyt chlorfenolů ve vodách do značné míry souvisí s i s procesem chlorování vody. S ohledem na rizika spojená s jejich přítomností v životním prostředí jsou vybrané chlorfenoly zařazeny do seznamu prioritních polutantů Americké agentury pro ochranu životního prostředí (US EPA) a Evropské Unie¹. Pro jejich účinnou separaci a stanovení ve směsích přichází v úvahu různé časově náročné varianty plynové chromatografie (GC) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) po případném předchozím zakoncentrování kapalinovou extrakcí či extrakcí na pevné sorbenty (SPE) (cit.^{2–5}) a také kapilární zónová elektroforéza^{6–8}.

Fenol a chlorfenoly podobně jako jiné aromatické polutanty vykazují v alkalickém prostředí výraznou absorpci v UV oblasti, která je vhodná pro jejich rychlé spektrofotometrické stanovení^{9,10}. S rostoucím počtem atomů chloru v molekule se absorpcní maximum ve spektru posouvá k delším vlnovým délkám do oblasti 280–320 nm a vzrůstá hodnota molárního absorpcního koeficientu. Pro rychlou charakteristiku směsí fenolů ve vodách přichází v úvahu spektrofotometrická analýza s multivariatní kalibrací v přeurečených systémech, zejména vícenásobná lineární regrese (MLR), regrese hlavních komponent měřené veličiny vůči reálným koncentracím analytů (PCR) a regrese latentních proměnných měřené veličiny

vůči latentním proměnným hodnot koncentrací analytů s úplnou projekcí do latentních struktur (PLS) (cit.^{11–21}). Pro daný soubor spektrofotometrických dat však nelze v některých případech předvídat, který z uvedených postupů povede za daných podmínek k optimální predikci koncentrací určovaných analytů^{22,23}. Chyba predikce hledaných koncentrací analytů při použití multivariatní kalibrace je závislá na charakteru a stupni překrytí absorpcních spekter jednotlivých komponent ve směsi, na výběru a počtu vlnových délek použitých pro měření, na počtu kalibračních roztoků a zejména na tvaru statistického plánu kalibračního souboru. Pro interpretaci velmi blízkých spekter jednotlivých komponent je výhodné použití Kalmanova filtru^{24–31} a také derivace absorpcních spekter, která umožňuje větší rozlišení signálů jednotlivých absorbuječích komponent.

V posledních letech byla multivariatní kalibrace aplikována pro směsi fenolů a chlorfenolů v různých osnovách s použitím vícenásobné lineární regrese metodou nejmenších čtverců, PCR a přeurečením PLS, a také po derivaci absorpcních spekter a v kombinaci s umělými neuronovými sítěmi (ANN) (cit.^{32–35}). V práci³⁶ je uvedeno porovnání výsledků většího počtu metod multikomponentního spektrofotometrického stanovení po předchozí prekoncentraci chlorfenolů pomocí SPE s použitím varianty injekční průtokové analýzy (FIA) a multitidetekčního systému.

V naší práci jsou testovány dvě modelové směsi fenolů, z nichž první (A) respektuje výraznější změny v absorpcních spektrech chlorfenolů, druhá (B) je obvyklá po chlorování vod s obsahem fenolu:

- směs A: směs fenolu, 2-chlorfenolu (2-CP), 2,6-dichlorfenolu (2,6-DCP) a 2,3,6-trichlorfenolu (2,3,6-TCP),
- směs B: směs fenolu, 2-chlorfenolu (2-CP), 3-chlorfenolu (3-CP) a 4-chlorfenolu (4-CP)

v koncentračním rozsahu 10–100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v prostředí 1 mol. l^{-1} NaOH a 1 mmol. l^{-1} EDTA, s použitím PLS pro různý počet vlnových délek a různé statistické plány kalibračních roztoků při vyhodnocení absorpcních křivek a jejich derivací. Výsledky jsou porovnány s výsledky získanými při použití Kalmanova filtru. Optimální podmínky pro predikci koncentrací fenolu a chlorfenolů byly aplikovány pro jejich stanovení v pitné a povrchové vodě.

Experimentální část

Chemikálie

Zásobní vodné roztoky fenolu a chlorfenolů o koncentraci 5 mmol. l^{-1} byly připraveny z pevných preparátů o obsahu fenolu 99% (Loba Feinchemie) a 2-chlorfenolu 99%, 3-chlorfenolu 98%, 4-chlorfenolu 98%, 2,6-dichlorfenolu 98% a 2,3,6-trichlorfenolu 99% (vše Riedel-de Haen).

Nízkomolekulární huminová kyselina MAR 244 (Výzkumný ústav anorganické chemie, Ústí nad Labem) byl preparát připravený z oxihumolitu. 2 g preparátu byly převedeny na ammoniovou sůl po 24 h přechovávání v exsikátoru nad konc.

NH_3 . Ve vodě rozpustná amonná sůl pak byla doplněna na objem 1 l.

Dále byly použity NaOH p. a. (Onex, Rožnov p. Radhošťem), dvojsodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny – EDTA p.a. (Lachema, Brno) a destilovaná voda ze skleněné aparatury.

Vzorky vody

Pitná voda (PI) byla odebírána z vodovodní sítě města Brna po pětiminutovém vypouštění.

Povrchová voda (PV) pocházela z vodního toku Lhotka v obci Drnovice a byla odebírána ze středu proudu 10 cm pod vodní hladinou do skleněných lahví o objemu 1 litr.

Odběr huminové vody (HV) byl prováděn z potůčku vytékajícího z rašelinště u Velkého Dářka. Uprostřed proudu 10 cm pod hladinou byla ponorená hadice čerpadla a voda byla čerpána do barelu o objemu 50 litrů.

Umelá huminová voda (HK) byla připravena do 25 ml odměrné baňky z přídavků preparátu MAR 244 (2 g.l^{-1}) a destilované vody. Vzorky vod obsahovaly standardní přídavky fenolu a chlorfenolů v koncentracích odpovídajících koncentračnímu rozsahu používaných kalibračních sad.

Instrumentace a metodika registrace spekter

Měření absorpčních spekter směsi A (fenol, 2-CP, 2,6-DCP a 2,3,6-TCP) bylo prováděno na spektrofotometru PU 8700 Series UV/VIS firmy Philips s šírkou spektrální štěrbiny 2 nm. Měření absorpčních spekter systému B (směs fenolu, 2-CP, 3-CP a 4-CP) byla z důvodu snímání derivace signálu prováděna na přístroji UV 500 firmy Unicam s nastavitelnou šírkou spektrální štěrbiny při šířce štěrbiny 1 nm.

Měření hodnot absorbance a derivace absorbance u všech jednotlivých roztoků kalibračních sad, testovacích sad i modelových vzorků vod bylo prováděno vždy při 24 vlnových délkách v rozmezí 274–320 nm s krokem 2 nm (PLS), resp. při 48 vlnových délkách v rozmezí 271–318 nm s krokem 1 nm (Kalmanův filtr) v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm. Pro vyhodnocení dat byly vždy použity střední hodnoty ze tří paralelních hodnot absorbance.

Pracovní postupy

Destilovaná voda

Do odměrné baňky byly odměřeny zředěné vodné roztoky standardů fenolu a chlorfenolů do výsledné koncentrace v rozmezí $10\text{--}100 \mu\text{mol.l}^{-1}$, resp. $10\text{--}50 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Následně byl přidán roztok NaOH do výsledné koncentrace 1 mol.l^{-1} a EDTA do výsledné koncentrace 1 mmol.l^{-1} a objem roztoku byl doplněn na 25 ml destilovanou vodou.

Pitná (PI), povrchová (PV) a huminová voda (HV)

Do odměrné baňky bylo odměřeno 15 ml vzorku vody (PI, PV, HV) a zředěné vodné roztoky standardů fenolu a chlorfenolů do výsledné koncentrace v rozmezí $10\text{--}50 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Následně byl přidán roztok NaOH do výsledné koncentrace 1 mol.l^{-1} a EDTA do výsledné koncentrace 1 mmol.l^{-1} a objem roztoku byl doplněn na 25 ml destilovanou vodou.

Umelá huminová voda (HK)

Do odměrné baňky byl odměřen zředěný zásobní vodný roztok níkomolekulární huminové kyseliny MAR 244 do výsledné koncentrace 10 mg.l^{-1} . Dále byly přidány zředěné vodné roztoky standardů fenolu a chlorfenolů do výsledné koncentrace v rozmezí $10\text{--}50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, posléze roztoky NaOH a EDTA jako v případě pitné vody a povrchových vod a destilovaná voda do výsledného objemu 25 ml.

Všechny výše uvedeným způsobem připravené roztoky kalibračních sad, testovacích sad a modelových vzorků byly před měřením ponechány vždy 2 hodiny v temnu pro ustavení rovnováhy.

Vyhodnocení dat metodou projekce do latentních struktur (PLS) a Kalmanova filtru

Pro vyhodnocení dat metodou PLS byl použit program PLS-G v jazyce Fortran na bázi algoritmu^{37–39}; jeho autory jsou L. Jančář a W. Wegscheider.

Výpočet metodou PLS probíhá ve dvou základních krocích: kalibrace a predikce. V průběhu kalibrace je vytvořen matematický vztah mezi maticí absorbančních dat A_{ij} ($i = 1, \dots, n$, $j = 1 \dots, p$, kde p je počet vlnových délek a n je počet roztoků kalibrační sady) a maticí koncentrací C_{ik} ($i = 1, \dots, n$, $k = 1, \dots, m$, kde m je počet stanovených komponent a n je počet roztoků kalibrační sady). To je realizováno stanovením počtu hlavních (abstraktních) komponent a současnou regresí a rotací transformovaných matic A_{ij} a C_{ik} . Počet abstraktních (latentních) komponent je v průběhu výpočtu určen metodou minimální chyby modelu⁴⁰.

V průběhu predikce jsou koncentrace jednotlivých komponent v neznámém vzorku (testovací sadě) určeny z naměřených hodnot absorbancí vzorku při použití vztahů nalezených při kroku kalibrace.

Míru správnosti výsledků získaných metodou PLS určuje shoda nalezených koncentrací komponent s jejich skutečnými hodnotami vyjádřená jednak relativními chybami stanovení jednotlivých komponent CRPE (component relative prediction error) (1), jednak relativní chybou stanovení jednotlivého vzorku SRPE (sample relative prediction error) (2) a střední chybou stanovení pro všechny komponenty a vzorky MRPE (mean relative prediction error) (3), hodnoty jsou vyjádřeny v %.

$$CRPE_k = \sqrt{\sum_{l=1}^t (c_{lk} - \hat{c}_{lk})^2} / \sqrt{\sum_{l=1}^t c_{lk}^2} \cdot 100 \quad (1)$$

$$SRPE_l = \sqrt{\sum_{k=1}^m (c_{lk} - \hat{c}_{lk})^2} / \sqrt{\sum_{k=1}^m c_{lk}^2} \cdot 100 \quad (2)$$

$$MRPE = \left[\sum_{l=1}^t \sqrt{\sum_{k=1}^m (c_{lk} - \hat{c}_{lk})^2} / \sqrt{\sum_{k=1}^m c_{lk}^2} \right] \cdot t^{-1} \cdot 100 \quad (3)$$

kde $l = 1, \dots, t$ (t je počet testovaných roztoků), $k = 1, \dots, m$

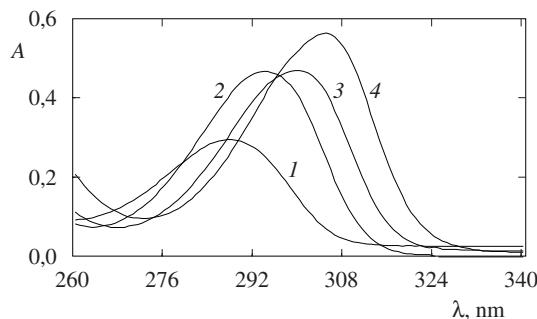
(m je počet komponent (složek) ve směsi), c_{ik} a \hat{c}_{ik} jsou dané a vypočtené hodnoty koncentrací jednotlivých komponent.

Chybu predikce koncentrací komponent ovlivňuje vedle dostatečného počtu vlnových délek především počet kalibračních roztoků a charakter statistického plánu kalibračního souboru^{41–44}.

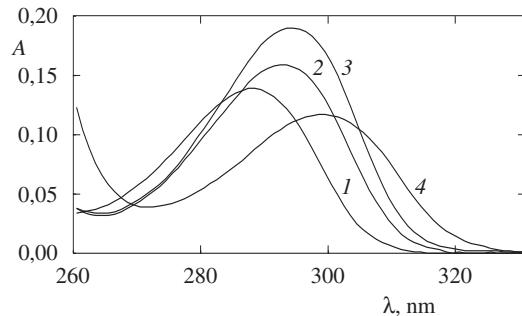
Nalezené hodnoty CRPE a MRPE umožňují posoudit předpokládané chyby vypočtených neznámých koncentrací komponent v analyzovaných vzorcích při respektování stejných podmínek kalibrace a testování pro kalibrační a testovací soubory.

Pro vyhodnocení dat metodou Kalmanova filtru byl použit program KF v jazyce Turbo Pascal na bázi algoritmu^{24,27}, jeho autorem je L. Jančák.

Algoritmus Kalmanova filtru je zcela odlišný od algoritmu PLS. Na rozdíl od ostatních metod multivariatní kalibrace je odvozen na základě teorie pravděpodobnosti. Při výpočtu se tedy parametry modelu (a tím i hledané koncentrace komponent) neodhadují podle statistických zákonů (kritérium shody minimální sumy čtverců odchylek mezi vypočtenými a naměřenými daty), ale jsou určovány Bayesovým odhadem na základě podmíněné pravděpodobnosti (odhad vypočtených dat pro j -tou vlnovou délku na základě hodnot předpovězených pro 1, ..., j -tou vlnovou délku). Kritériem shody modelu a dat je střední kvadratická chyba odhadovaných parametrů³¹:



Obr. 1. Absorpční spektra fenolu + 2-CP + 2,6-DCP + 2,3,6-TCP; spektra jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 mol.l⁻¹) a EDTA (1 mmol.l⁻¹), koncentrace fenolů 100 µmol.l⁻¹; 1 – fenol, 2 – 2-CP, 3 – 2,6-DCP, 4 – 2,3,6-TCP



Obr. 2. Absorpční spektra fenolu + 2-CP + 3-CP + 4-CP; spektra jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 mol.l⁻¹) a EDTA (1 mmol.l⁻¹), koncentrace fenolů 50 µmol.l⁻¹; 1 – fenol, 2 – 2-CP, 3 – 3-CP, 4 – 4-CP

$$s^2 = [(x_k - \hat{x}_d)^2] \quad (4)$$

kde x_k je předpovězená a \hat{x}_d daná hodnota funkce x (vektor hodnot absorbancí neznámého vzorku) pro $k = 1, \dots, p$ a pro $d = 1, \dots, p$ (p je počet vlnových délek). Minimalizuje se tedy chyba určovaných parametrů modelu krok po kroku pro každou vlnovou délku. Model pro Kalmanův filtr se skládá ze dvou částí: z modelu systémové dynamiky (změna hodnot absorbancí s časem – časové závislosti) a modelu měření (additivita absorbancí jednotlivých komponent na základě platnosti Bouguerova-Lambertova-Beerova zákona). V případech, kdy systém nemá žádnou dynamiku, a určované koncentrace komponent zůstávají tedy po celou dobu měření konstantní, se k výpočtu funkce x využívá pouze model měření. Na rozdíl od PLS nemusíme u Kalmanova filtru volit vhodnou kalibrační sadu a vybírat vhodné vlnové délky, musíme ale znát spektra čistých látek a varianci šumu měření.

Výsledky a diskuse

I. Optimalizace podmínek stanovení směsi fenolu a chlorfenolů v destilované vodě

Disociace fenolů na fenolátový anion při pH > 10 má za následek výrazný bathochromní posun absorbčního maxima a vzrůst hodnoty molárního absorbčního koeficientu. Podobně se bathochromní posun projevuje také s rostoucím počtem atomů chloru v molekule.

Absorpční spektra fenolu a studovaných chlorfenolů v koncentracích 100 µmol.l⁻¹ (systém A), resp. 50 µmol.l⁻¹ (systém B) v 1 mol.l⁻¹ NaOH a v 1 mmol.l⁻¹ EDTA jsou uvedeny na obr. 1, resp. 2. Hodnoty molárních absorbčních koeficientů fenolu a chlorfenolů a příslušných vlnových délek λ_{\max} jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
Hodnoty λ_{\max} (nm) a ϵ (l.mol⁻¹.cm⁻¹) studovaných fenolů

Analyt	λ_{\max}	ϵ
Fenol	288,0	2640
2-Chlorfenol	294,0	3865
3-Chlorfenol	292,0	3350
4-Chlorfenol	298,5	2300
2,6-Dichlorfenol	300,0	4820
2,3,6-Trichlorfenol	305,0	4705

Analýza modelové směsi A (fenol, 2-CP, 2,6-DCP a 2,3,6-TCP)

Pro optimalizaci podmínek pro stanovení fenolu a chlorfenolů ve vodách byla vybrána směs A, neboť absorbční maxima λ_{\max} jednotlivých komponent jsou na rozdíl od směsi B více separována (viz obr. 1). Jednotliví zástupci chlorfenolů pro směs A byli vybráni tak, aby poskytovali vždy nejvyšší odezvu v dané skupině chlorfenolů.

Optimalizace podmínek byla zaměřena na 3 základní body:

- 1) tvar (podoba) kalibrační sady (KS)
- 2) poloha centrálního bodu (CB) kalibrační sady
- 3) koncentrační rozsah kalibrační sady

Pro testování v bodech 1) až 3) byly použity čtyři testovací roztoky s koncentracemi složek ve třech čtvrtinách ($77,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, resp. $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a v jedné čtvrtině ($32,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, resp. $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) celkového rozsahu koncentrací kalibrační sady fenolu a chlorfenolů. Dále byly připraveny dva roztoky s náhodně zvolenými koncentracemi komponent, které simulovaly neznámé modelové vzorky (I-MD, resp. II-MD).

Ad 1) Byly testovány tři základní kalibrační sady (kalibrační statistické plány):

- úplný faktorový plán (complete factorial design – CFD) (5)
 - částečný faktorový plán (fractional factorial design – FFD) (6)
 - Box-Behnkenův statistický plán (box-behnken plan – BBP)
- a jejich vliv na výsledné relativní chyby predikce (*CRPE*, *MRPE*) pro soubor čtyř testovacích roztoků (testovacích sad) a dva modelové vzorky.

Celkový počet kalibračních roztoků u jednotlivých kalibračních sad pro čtyři komponenty ve vzorku, dvě hladiny koncentrací komponent a centrální bod je možné určit podle vztahů (5)–(6) (cit.⁴⁴):

$$n = L^m + CB \quad (17 \text{ roztoků}) \quad (5)$$

$$n = L^{m-1} + CB \quad (9 \text{ roztoků}) \quad (6)$$

kde n – počet roztoků, m – počet komponent, L – počet hladin koncentrací, CB – centrální bod.

Kódovaná struktura kalibračních sad (kalibračních souborů) pro dvě mezní (horní a dolní) koncentrační hladiny a střední hladinu koncentrací jednotlivých statistických plánů, včetně složení testovací sady (TS), je uvedena v tabulce II.

Relativní chyby predikce *CRPE* a *MRPE* pro všechny analyzované složky ve směsi A při použití různého statistického plánu, a tedy různého počtu roztoků kalibračního souboru, jsou pro čtyři testovací roztoky uvedeny v tabulce III. Výsledky výpočtu pro modelové vzorky I-MD a II-MD jsou také uvedeny v tabulce IV.

Pro výběr tvaru kalibrační sady, polohy centrálního bodu i rozsahu koncentrací je rozhodující míra shody vypočítaných koncentrací složek, charakterizovaná relativními chybami predikce *MRPE* a *CRPE*, s jejich skutečnými hodnotami. Jak je vidět z tabulky III a tabulky IV, kalibrační sada CFD se 17 kalibračními roztoky poskytuje ve směsi A nejmenší chybu predikce.

Ad 2) Při výše uvedených statistických plánech kalibračních roztoků byly testovány dvě hladiny (polohy) koncentrací centrálního bodu (CB):

- „aritmetický“, posilující oblast koncentrací uprostřed kalibrační sady – jeho koncentrace je aritmetickým průměrem mezních hladin koncentračního rozsahu kalibračního sady $10\text{--}100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ($55 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
- „geometrický“, posilující oblast nižších koncentrací komponent – jeho koncentrace je druhou odmocninou podílu mezních hladin koncentračního rozsahu kalibrační sady ($31,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Výsledky výpočtů pro testovací sadu i modelové vzorky I-MD a II-MD jsou uvedeny v tabulce III a IV.

Z tabulek plyne, že nižších relativních chyb predikce (správ-

Tabulka II

Statistické plány kalibračních a testovacích roztoků; symboly: + horní hladina koncentrace ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah, resp. $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – nižší rozsah koncentrací KS), – spodní hladina koncentrace ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší i nižší rozsah koncentrací KS), 0 centrální bod (aritmetický, $55 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah, resp. $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – nižší rozsah koncentrací KS; geometrický, $31,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah koncentrací KS), $+0,5 \frac{3}{4}$ koncentrační škály ($77,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah, resp. $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – nižší rozsah koncentrací KS), $-0,5 \frac{1}{4}$ koncentrační škály ($32,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah, resp. $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – nižší rozsah koncentrací KS)

Roztok	Komponenta ^a				Roztok	Komponenta ^a			
	1	2	3	4		1	2	3	4
(a)									
1	+	+	+	+	1	+	+	+	+
2	+	+	+	–	2	+	+	–	–
3	+	+	–	+	3	+	–	+	–
4	+	+	–	–	4	+	–	–	+
5	+	–	+	+	5	–	+	+	–
6	+	–	+	–	6	–	+	–	+
7	+	–	–	+	7	–	–	+	+
8	+	–	–	–	8	–	–	–	–
9	–	+	+	+	9	0	0	0	0
10	–	+	+	–	(b)				
11	–	+	–	+	1	0	+	+	0
12	–	+	–	–	2	+	0	+	+
13	–	–	+	+	3	–	0	+	–
14	–	–	+	–	4	0	–	+	0
15	–	–	–	+	5	+	+	0	+
16	–	–	–	–	6	–	+	0	–
17	0	0	0	0	7	+	–	0	+
(c)									
1	+0,5	-0,5	-0,5	+0,5	10	+	0	–	+
2	-0,5	+0,5	+0,5	-0,5	11	–	0	–	–
3	-0,5	-0,5	+0,5	-0,5	12	0	–	–	0
4	+0,5	+0,5	-0,5	+0,5	13	0	0	0	0
(d)									

^a Kalibrační sada (KS): CFD (a), FFD (b), BBP (c); testovací sada (TS): (d)

nějších výsledků) je jednoznačně dosaženo pro soubory s aritmetickým centrálním bodem.

Ad 3) Rozsah koncentrací kalibrační sady byl testován pro již optimální podobu kalibračního setu (CFD) nalezenou v bode 1) a optimální centrální bod (aritmetický CB) nalezený v bode 2).

Byly testovány dva rozsahy koncentrací kalibrační sady:

- vyšší rozsah koncentrací ($10\text{--}100 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
- nižší rozsah koncentrací ($10\text{--}50 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Hodnoty *MRPE* a *CRPE* získané pro oblast vyššího i nižšího rozsahu koncentrací pro testovací sadu a modelové vzorky I-MD a II-MD jsou uvedeny v tabulkách III a IV.

Jak je vidět z tabulek III a IV, jsou výsledky (relativní chyby predikce) pro kalibrační sady pro vyšší i nižší rozsah koncentrací kalibrační sady srovnatelné.

Tabulka III

Srovnání relativních chyb predikce testovací sady pro různé kalibrační statistické plány ve směsi A, měřeno pro 24 vlnových délek v rozsahu 274–320 nm

Kalibrační plán	Centrální bod									
	aritmetický					geometrický				
	CRPE [%]			MRPE [%]		CRPE [%]			MRPE [%]	
	fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP		fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP	
CFD ^a	4,8	5,6	5,2	4,6	5,2	11,1	11,9	12,9	11,0	11,6
FFD ^a	7,1	8,9	8,4	8,5	8,4	14,2	16,4	16,9	14,6	15,4
BBP ^a	7,4	7,8	7,9	7,1	7,7	11,7	12,9	12,9	12,6	12,7
CFD ^b	5,4	4,2	5,4	5,0	5,1	—	—	—	—	—

^a Hodnoty pro rozsah koncentrací fenolu a chlorfenolů 10–100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$: 77,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 32,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^b hodnoty pro rozsah koncentrací fenolu a chlorfenolů 10–50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$: 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, složení testovacích roztoků – viz tabulka II

Tabulka IV

Srovnání relativních chyb predikce u modelových vzorků I-MD a II-MD pro různé kalibrační statistické plány ve směsi A, měřeno pro 24 vlnových délek v rozsahu 274–320 nm

Kalibrační plán	Centrální bod									
	aritmetický					geometrický				
	CRPE [%]			SRPE [%]		CRPE [%]			SRPE [%]	
	fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP		fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP	
CFD ^a	6,8	9,4	6,8	5,9	7,2	5,9	7,9	8,8	9,0	8,0
FFD ^a	7,4	8,2	8,2	6,4	7,6	14,0	19,0	17,1	16,1	16,5
BBP ^a	9,8	12,0	10,3	10,1	10,5	14,0	14,5	13,9	14,6	14,2
CFD ^b	7,2	9,2	9,1	6,4	7,9	—	—	—	—	—
CFD ^c	5,0	6,8	7,0	5,8	6,2	7,2	7,2	7,9	8,2	7,7
FFD ^c	9,2	8,8	8,9	6,1	8,3	11,6	13,2	13,4	10,7	12,2
BBP ^c	8,8	10,2	11,3	10,5	10,2	14,0	15,8	15,9	14,2	15,0
CFD ^d	6,2	9,4	6,2	5,0	6,5	—	—	—	—	—

^a I-MD01, ^b II-MD01, ^c I-MD02 – pro koncentrace fenolu a chlorfenolů v rozmezí 13–90 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^d II-MD02 – pro koncentrace fenolu a chlorfenolů v rozmezí 12–44 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Jako optimální pro další stanovení byl na základě předchozích výsledků vybrán centrální faktorový plán, aritmetický centrální bod a nižší rozsah koncentrací komponent, který lépe modeluje reálné obsahy chlorfenolů ve vodách.

Analýza modelové směsi B (fenol, 2-CP, 3-CP a 4-CP)

Toto seskupení fenolů se často vyskytuje v reálných vzorcích vod. Měření bylo opět provedeno pro prostředí 1 mol. l^{-1} NaOH a 1 mmol. l^{-1} EDTA. Pro stanovení fenolu a chlorfenolů v systému B byly vybrány optimální podmínky nalezené pro směs A, tj. kalibrační soubor obsahoval celkem 17 roztoků (statistický plán CFD), byl zvolen nižší rozsah koncentrací kalibračního setu s koncentračními mezními hodnotami 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a aritmetickým centrálním bodem (30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Testovací sada obsahovala čtyři roztoky obdobného uspořádání jako v předchozím případě směsi A a dva náhodně zvolené neznámé modelové vzorky (III-MD).

Výsledky stanovení v destilované vodě pro testovací sadu a modelové vzorky III-MD jsou uvedeny v tabulce V.

Hodnoty CRPE a MRPE pro jednotlivé složky směsi a chyb koncentrací v testovacích roztocích jsou proti směsi A relativně vysoké, což je způsobeno vysokým stupněm překrytí absorpčních spekter jednotlivých analytů ve směsi B.

II. Stanovení fenolů v pitné a povrchové vodě

Vzorky vody byly uměle kontaminovány přídavky fenolu a chlorfenolů v koncentracích, které odpovídaly optimalizovanému statistickému plánu kalibračního souboru a testovací sadě uvedených v předchozí části.

Stanovení bylo provedeno opět v prostředí 1 mol. l^{-1} NaOH v přítomnosti 1 mmol. l^{-1} EDTA za optimálních podmínek měření nalezených v kapitole I (úplný faktorový plán s aritmetickým centrálním bodem a nižším rozsahem koncentrací fenolu a chlorfenolů).

Tabulka V

Relativní chyby predikce testovací sady a u modelových vzorků III-MD ve směsi B, měřeno pro 24 vlnových délek v rozsahu 274–320 nm

Kalibrační plán	CRPE [%]				MRPE, (SRPE) [%]
	fenol	2-CP	3-CP	4-CP	
CFD ^a	14,4	12,7	19,9	14,8	15,8
CFD ^b	13,9	9,6	15,8	12,6	(13,2)
CFD ^c	20,0	16,2	28,1	17,2	(20,0)

^a Destilovaná voda: 20 a 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^b vzorek III-MD01: v rozmezí 16–46 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^c vzorek III-MD02: v rozmezí 12–44 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Tabulka VI

Relativní chyby predikce pro vzorky pitné, povrchové a huminové vody ve směsi A, pro úplný faktorový plán (CFD) s aritmetickým centrálním bodem pro rozsah koncentrací fenolu a chlorfenolů 10–50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; měřeno pro 24 vlnových délek v rozsahu 274–320 nm

Typ vody	CRPE [%]				MRPE, (SRPE) [%]
	fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP	
Pitná ^a	7,1	7,1	9,8	8,5	8,2
Povrchová ^a	6,7	6,9	8,0	8,9	7,8
Huminová ^a	9,8	9,7	8,5	9,2	9,2
Pitná (PI) ^b	1. vzorek 6,6	8,9	8,4	13,5	(9,3)
	2. vzorek 14,4	10,0	12,2	13,0	(12,4)
Povrchová (PV) ^b	1.vzorek 10,6	12,0	7,2	12,5	(10,5)
	2. vzorek 6,6	8,9	13,2	13,8	(10,6)
Huminová (HV) ^b	1. vzorek 11,8	13,4	11,0	13,0	(12,3)
	2. vzorek 13,0	13,9	12,5	12,1	(12,8)

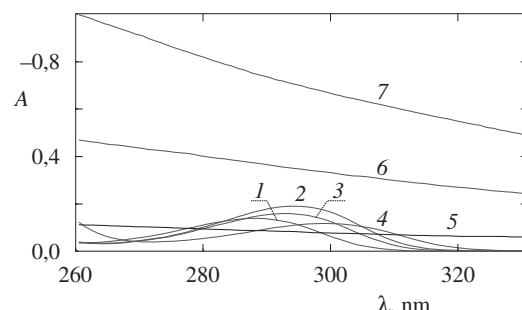
^a Testovací sada: 20 a 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^b 1. vzorek III-MD01: v rozmezí 16–46 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 2. vzorek III-MD02: v rozmezí 12–44 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Tabulka VII

Relativní chyby predikce pro vzorky povrchové, huminové a umělé huminové vody pro hodnoty absorbance a derivace absorbance ve směsi B, úplný faktorový plán (CFD) s aritmetickým centrálním bodem pro rozsah koncentrací fenolu a chlorfenolů 10–50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Typ vody	Absorbance				1. Derivace					
	CRPE [%]				CRPE [%]					
	fenol	2-CP	3-CP	4-CP		fenol	2-CP	3-CP	4-CP	
Povrchová ^a	19,4	22,7	24,1	19,4	21,7	15,6	18,0	18,5	15,0	16,4
Huminová ^a	18,8	22,2	22,4	18,7	20,7	16,4	17,9	19,3	15,4	16,9
MAR 244 ^a	17,5	21,3	21,0	16,4	19,4	15,0	18,2	17,7	14,8	16,2
Povrchová (PV) ^b	20,4	22,9	24,0	19,0	(21,6)	16,2	19,1	18,6	13,3	(16,8)
	2. vzorek 18,7	21,8	22,9	19,1	(20,6)	15,9	19,3	18,1	12,0	(16,3)
Huminová (HV) ^b	18,9	22,5	22,6	18,3	(20,5)	17,1	18,0	20,3	16,9	(18,0)
	2. vzorek 18,0	23,0	22,8	18,4	(20,6)	16,7	18,1	19,3	15,5	(17,4)
MAR 244 (HK) ^b	16,0	22,7	20,6	15,5	(18,7)	15,5	19,0	17,8	14,1	(16,5)
	2. vzorek 15,8	19,8	23,0	15,9	(18,7)	14,5	17,9	18,8	15,6	(16,6)

^a Testovací sada roztoků, ^b modelové vzorky – viz tabulka VI



Obr. 3. Absorpční spektra fenolu + 2-CP + 3-CP + 4-CP, povrchové vody (PV), huminové kyseliny (10 mg.l⁻¹) (HK) a huminové vody (HV); spektra jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 mol.l⁻¹) a EDTA (1 mmol.l⁻¹), koncentrace fenolů 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; 1 – fenol, 2 – 2-CP, 3 – 3-CP, 4 – 4-CP, 5 – PV, 6 – HK, 7 – HV

Tabulka VIII

Relativní chyby predikce povrchové vody a umělé huminové vody ve směsi B metodou Kalmanova filtru, měřeno pro 48 vlnových délek v rozsahu 271–318 nm po 1 nm, 1 mol.l⁻¹ NaOH, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, koncentrace komponent v testovací sadě a v modelových vzorcích ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)

Typ vody	SKCH [%]				SSKCH [%]	
	fenol	2-CP	3-CP	4-CP		
Huminová ^a	3,0	8,4	8,8	5,3	6,3	
MAR 244 ^a	10,4	10,5	12,9	5,4	9,8	
Huminová (HV) ^b	1. vzorek 2. vzorek	0,9 -5,4	-10,8 0,5	11,6 5,9	-3,6 -1,8	6,7 3,4
MAR 244 (HK) ^b	1. vzorek 2. vzorek	-6,9 -14,4	-14,2 -5,8	-7,1 15,0	7,8 4,0	9,0 9,8

^a Testovací sada, ^b modelové vzorky – viz tabulka VI

Pro směs A byly výsledky porovnány pro pitnou (PI), povrchovou (PV) a huminovou vodu (HV), pro směs B pro povrchovou vodu (PV), huminovou vodu (HV) a vodu s obsahem preparátu huminové kyseliny MAR 244 (HK).

V přítomnosti huminových kyselin ve vodách je absorbančce v oblasti 260–320 nm výrazně zvýšená a překrývá absorpcní spektra fenolů (viz obr. 3). Proto bylo stejně množství huminové vody nebo huminové kyseliny neobsahující fenoly přidáno i do všech kalibračních a testovacích roztoků.

Pro modelovou směs A (fenol, 2-CP, 2,6-DCP a 2,3,6-TCP) jsou relativní chyby predikce CRPE a MRPE pro všechny složky, čtyři testovací roztoky a pro modelové vzorky pitné, povrchové a huminové vody porovnány v tabulce VI.

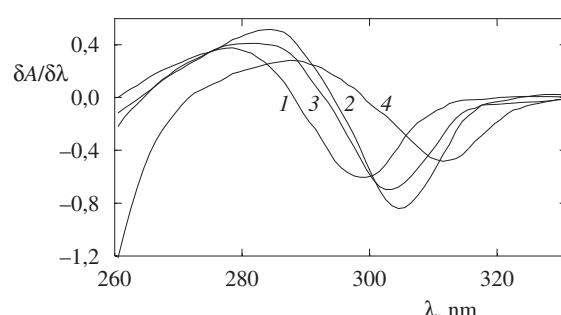
Pro modelovou směs B (fenol, 2-CP, 3-CP a 4-CP) jsou relativní chyby predikce CRPE a MRPE pro všechny složky, čtyři testovací roztoky a pro modelové vzorky povrchové a huminové vody a vody s obsahem preparátu huminové kyseliny MAR 244 porovnány v tabulce VII.

Jak ukazují výsledky v tabulce VII, způsobuje blízký charakter absorpcních spekter pro modelovou směs B podstatně zvýšené chyby predikce proti směsi A. Tyto chyby je možné snížit při vyhodnocení první derivace absorpcních křivek studovaných fenolů (obr. 4), které zpřesňují polohu absorpcního maxima ve srovnání s nederivovaným signálem. Tuto skutečnost ilustrují výsledky pro první derivaci absorbance v tabulce VII. Použití vyšších derivací však opět zvyšovalo chyby predikce v důsledku rostoucího vlivu pozadí a šumu na hodnoty signálů.

Vzhledem k tomu, že spektra komponent ve směsi B se značně překrývají, bylo provedeno srovnání výsledků získaných metodou PLS s výsledky získanými metodou Kalmanova filtru, která je založena na zcela odlišném principu a algoritmu a již v minulosti vedla k uspokojivým výsledkům při značném překryvu spekter^{45–47}.

Srovnání bylo provedeno ve směsi B (fenol, 2-CP, 3-CP a 4-CP) pro huminovou vodu (HV) a umělou huminovou vodu s obsahem preparátu huminové kyseliny MAR 244 (HK). Spektra fenolu a jednotlivých chlorfenolů v testovací sadě a modelových vzorcích byla pro metodu Kalmanova filtru měřena pro 48 vlnových délek v rozsahu 271–318 nm. Výsledky výpočtu pro testovací sadu a modelové vzorky jsou uvedeny v tabulce VIII.

Jak je vidět z tabulek VII a VIII, výsledky získané pomocí



Obr. 4. 1. derivace spekter fenolu + 2-CP + 3-CP + 4-CP; 1. derivace spekter jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 mol.l⁻¹) a EDTA (1 mmol.l⁻¹), koncentrace fenolu 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; 1 – fenol, 2 – 2-CP, 3 – 3-CP, 4 – 4-CP

Kalmanova filtru poskytuje mnohem menší relativní chyby predikce, a jsou tedy správnější než po použití PLS.

Závěr

V této práci byly optimalizovány podmínky pro stanovení fenolu a chlorfenolů ve vodách. Jako optimální se ukázal úplný faktorový plán (CFD) kalibrační sady, centrální bod v oblasti aritmetického průměru mezních hladin koncentrací kalibrační sady a nižší rozsah koncentrací kalibrační sady zvolený na základě reálných koncentrací chlorfenolů ve vodách. Výhodným se také ukázalo využití derivace absorbancí, zejména ve směsi B (fenol, 2-chlorfenol, 3-chlorfenol, 4-chlorfenol) s podstatně větším překryvem absorpcních spekter komponent.

Hodnoty relativních chyb predikce koncentrací fenolu a chlorfenolů v jednotlivých vzorcích vod dosahovaly v závislosti na systému a druhu vody hodnot 4,2–28,1 % (PLS), resp. 0,5–15,0 % (KF) pro obsah fenolu 0,9–9,4 mg.l⁻¹, monochlorfenolů 1,25–12,8 mg.l⁻¹, 2,6-dichlorfenolu 1,63–16,3 mg.l⁻¹ a 2,3,6-trichlorfenolu 2,0–19,7 mg.l⁻¹ ve směsích.

Výsledky ukazují, že ve směsích, kde se komponenty vzájemně chemicky neovlivňují (viz směs B), ale přitom se značně překrývají jejich absorpcní spektra, je vhodnější použít Kalmanova filtru, jehož algoritmus si poradí s rozlišením překrývajících se spekter komponent mnohem lépe než al-

goritmus PLS při daleko větším počtu kalibračních roztoků.

Přítomnost huminových látek ve vodě, které jsou makroabsorbujícími komponentami ve vzorku, podstatně zvyšuje chybu predikce pro použité fenoly. Ve vodách v přítomnosti neznámého obsahu huminových látek by exaktní řešení problému s použitím PLS vyžadovalo pokládat huminové látky za další neznámou komponentu a použít multivariatní kalibraci v systému s pěti komponentami, jehož řešení ve zvýšeném mříž ovlivňuje chybu při stanovení koncentrací jednotlivých komponent pro omezený počet kalibračních roztoků a zvyšuje dobu měření a analýzy při použití úplného statistického plánu kalibračních roztoků.

Obvyklé obsahy solí v pitné a povrchové vodě do tvrdosti $4,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ neovlivňují výsledky stanovení fenolu a použitých chlorfenolů v přítomnosti 1 mol.l^{-1} NaOH a $\geq 0,001 \text{ mol.l}^{-1}$ EDTA.

LITERATURA

1. Puig D., Barceló D.: Trends Anal. Chem. 15, 362 (1996).
2. Tesařová E., Pacáková V.: *Nové směry v analytické chemii II* (Zýka J., ed.), str. 90. SNTL, Praha 1984.
3. Andrés M. P. S., León-González M. E., Peréz-Arritas L. V., Polo-Díez L.M.: J. High Resolut. Chromatogr. 23, 367 (2000).
4. Lacorte S., Fraisse D., Barceló D.: J. Chromatogr., A 857, 97 (1996).
5. Frébortová J., Tatarkovičová V.: Analyst (Amsterdam) 119, 1519 (1994).
6. Belenkii B. G., Belov Y. V., Kasalainen G. E.: Zh. Anal. Khim. 51, 817 (1996).
7. Zemann A., Volgger D.: Anal. Chem. 69, 3243 (1997).
8. Li G., Locke D. C.: J. Chromatogr., A 734, 357 (1996).
9. Schmauch L. J., Grubb H. M.: Anal. Chem. 26, 308 (1954).
10. Afghan B. K., Bellivean P. E., Larose R. H., Ryan J. F.: Anal. Chim. Acta 7, 355 (1974).
11. Martens H., Naes T.: *Multivariate Calibration*. Wiley, Chichester 1989.
12. Geladi P., Kowalski B. R.: Anal. Chim. Acta 185, 1 (1986).
13. Van Loosbroek A., Debels H. J., Coemgrecht G.: Anal. Lett. 17, 779 (1984).
14. Kowalski B. R., Seasholtz H. B.: J. Chemom. 5, 129 (1991).
15. Martin F., Otto M.: Fresenius' J. Anal. Chem. 352, 451 (1995).
16. Höskuldsson A.: J. Chemom. 2, 211 (1988).
17. Danzer K.: Fresenius' J. Anal. Chem. 351, 3 (1995).
18. Sjöström M., Wold S., Lindberg W., Persson J. A., Martens H.: Anal. Chim. Acta 150, 61 (1983).
19. Xie Y. L., Kalivas J. H.: Anal. Chim. Acta 348, 19 (1997).
20. Otto M., Wegscheider W.: Anal. Chem. 57, 63 (1985).
21. Otto M., Wegscheider W.: Anal. Chem. 61, 1847 (1989).
22. Lang P. M., Kalivas J. H.: J. Chemom. 7, 153 (1993).
23. Thomas E. V., Haaland D. M.: Anal. Chem. 62, 1091 (1990).
24. Brown S. D.: Anal. Chim. Acta 181, 1 (1986).
25. Rutan S. C., Brown S. D.: Anal. Chim. Acta 167, 23 (1985).
26. Monfre S. L., Brown S. D.: Anal. Chim. Acta 200, 397 (1987).
27. Rutan S. C., Brown S. D.: Anal. Chim. Acta 160, 99 (1984).
28. Gerow D. D., Rutan S. C.: Anal. Chim. Acta 184, 53 (1986).
29. Gerow D. D., Rutan S. C.: Anal. Chem. 60, 847 (1988).
30. Poullisse H. N. J.: Anal. Chim. Acta 112, 361 (1979).
31. Yuzuru H., Toshio S., Rieko M., Mitsuru U.: Anal. Chim. Acta 202, 187 (1987).
32. Cladera A., Gómez E., Estela J. M., Cerda V.: Anal. Chim. Acta 267, 95 (1992).
33. Estevas da Silva J. C. G., Laquipai M. C. P. O.: Anal. Lett. 31, 2549 (1998).
34. Navarro-Villoslada F., Peréz-Arribas L. V., León-González M. E., Polo-Díez L. M.: Anal. Chim. Acta 381, 93 (1999).
35. Navarro-Villoslada F., León-González M. E., Peréz-Arribas L. V., Santos-Delgado M. J., Polo-Díez L. M.: Microchem. J. 44, 339 (1991).
36. Navarro-Villoslada F., Peréz-Arribas L. V., León-González M. E., Polo-Díez L. M.: Anal. Chim. Acta 308, 238 (1995).
37. Wold H., v knize: *Perspectives in Probability and Statistics* (Gani J., ed.). Academic Press, London 1975.
38. Lindberg W., Persson J. A., Wold S.: Anal. Chem. 55, 643 (1983).
39. Wegscheider W., Jančář L.: Fresenius' J. Anal. Chem. 334, 697 (1989).
40. Wold S.: Technometrics 20, 397 (1978).
41. Vitouchová M., Jančář L., Sommer L.: Fresenius' J. Anal. Chem. 343, 274 (1992).
42. Jančář L., Preisler J., Sommer L.: Collect. Czech. Chem. Commun. 58, 1509 (1993).
43. Jančář L., Wegscheider W.: Anal. Chim. Acta 248, 459 (1991).
44. Bandemer H., Näther W.: *Theorie und Anwendung der Optimalen Versuchsplanung. II. Handbuch zur Anwendung*. Akademie Verlag, Berlin 1980.
45. Jančář L.: Chem. Listy 87 (Suppl.), 205 (1993).
46. Jančář L.: *Chemometrics III, Brno, 11.–15. července 1993. Abstracts str. 59.*
47. Jančář L., Urban P.: předneseno na 47. sjezdu chemických společností, Praha, 1.–4. července 1991.

R. Kostrhounová-Štěpánková^a, L. Jančář^b, and L. Sommer^c (^aRECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, ^bDepartment of Chemistry, Faculty of Education, Masaryk University, Brno, ^cInstitute of Environmental Chemistry and Technology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno): **UV Spectrophotometric Determination of Phenol and Chlorophenols Mixtures in Water using Partial Least-Squares and Kalman Filtering**

The UV spectrophotometric determination of phenol and chlorophenols in mixtures was performed by using multivariate calibration with partial least-squares in drinking and surface waters. Absorbance and their first derivatives were evaluated for mixtures of phenol, 2-chloro-, 2,6-dichloro- and 2,3,6-trichlorophenol or phenol, 2-, 3- and 4-chlorophenol with satisfactory prediction of errors of results in the $10\text{--}100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ range for drinking and surface waters in the presence of 1.0 mol.l^{-1} NaOH and $\geq 1.0 \text{ mmol.l}^{-1}$ EDTA using a calibration set with 17 standard solutions (full statistic design) and 24 wavelengths. Humic acids interfere and their influence must be eliminated by previous addition into calibration solutions. Kalman filtering gives more accurate results for samples containing monochlorophenols and phenol with very similar absorption spectra.

OSOBNÍ ZPRÁVY

70 let dr. Aloise Pískaly

Kolega dr. Alois Pískala, doyen oddělení chemie nukleových kyselin Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, oslavil nedávno sedmdesáté narozeniny. Sluší se proto představit ho zejména našim mladším kolegům a seznámit je s jeho celoživotním dílem.

RNDr. Alois Pískala, CSc. se narodil v roce 1933 v Hlučíně u Opavy. Po absolvování všeobecně vzdělávací školy nejprve dva roky pracoval jako laborant v tovární chemické laboratoři. Odtud odešel na průmyslovou školu chemickou do Kolína, aby si doplnil odborné vzdělání. Při tom ale nezůstalo, protože ihned po maturitě v roce 1954 začíná studovat chemii na Karlově univerzitě v Praze. Tehdy nebyla chemie součástí Přírodovědecké fakulty, ale Matematicko-fyzikální fakulty UK a absolventům byl udělován hrdý titul „promovaný chemik“. To jsme ale už přeskočili do roku 1959 k promoci, které pochopitelně předcházelo studium v oboru organické chemie, státní závěrečná zkouška z „pěti chemií“ a diplomová práce. Vedoucím katedry organické chemie byl tehdejší docent, pozdější profesor RNDr. Alois Vystrčil, DrSc. Kolega Pískala prováděl svou diplomovou práci v chemii derivátů thiapyronu u docenta Václava Horáka (později profesora na univerzitě v Georgetownu). Jsme oba ze stejněho ročníku, společně jsme procházeli zápočty, zkouškami, vojenskou přípravou, semináři, základními i pokročilými laboratorními cvičeními. Se svými diplomovými pracemi jsme se dokonce oba společně účastnili vysokoškolské studentské vědecké soutěže – nejprve jsme oba zvítězili v chemickém předkole v Pardubicích, abychom se nakonec o první místo rozdělili i v celostátním všeobecném kole v Brně.

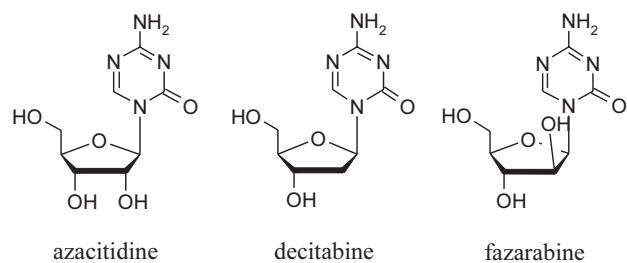
Heterocykly se zjevně staly dr. Pískalovi osudem, protože na Ústavu organické chemie a biochemie, kam byl ihned po absolvování vysoké školy přijat na vědeckou aspiranturu, dostal od školitele, Dr. Ing. Jiřího Guta, DrSc. jako zadání téma „5-azaanaloga pyrimidinových bází“. Toto téma, které logicky navazovalo na již prováděný úspěšný výzkum biologicky účinných 6-azapyrimidinových bází a nukleosidů, zejména 6-azauridinu, pojmenovalo odbornou dráhu dr. Pískaly na celý život. Již v jeho kandidátské dizertační práci, obhájené v roce 1963, jsou obsaženy základy jeho pozdějších významných objevů. V roce 1965 za ně spolu s MUDr. Jiřím Veselým, DrSc. a profesorem Františkem Šormem získal Cenu Československé akademie věd. Nukleosid 5-azacytidin byl dokonce registrován u patentového úřadu jako „objev“ (to se ještě nevědělo, že se vyskytuje jako vzácné přírodní nukleosidové antibiotikum).

Dr. Pískala provedl základní výzkum celé velké skupiny heterocyklických sloučenin, 1,3,5-triazinových analogů pyrimidinových bází a nukleosidů, především nukleosidů 5-azacytosinu, 6-substituovaných (amino, alkoxy, oxo) 5-azacytosinu a nukleosidů kyseliny kyanurové. Byly to původní typy látek se zcela neočekávanými vlastnostmi. Proto bylo ke jejich syntézám zapotřebí vypracovat původní postupy. V tomto ohledu a ve zdokonalování metod byl dr. Pískala nedostižný jako experimentátor, schopný měnit reakční podmínky tak



dlohu, až byl s postupem spokojen. Taková vlastnost je zvláště cenná pro vypracovávání patentových podkladů – a také bylo co patentovat. Z nejvýznamnějších látek, které vyšly z rukou dr. Pískaly, uvedu tři: 5-azacytidin [1-β-D-ribofuranosyl]-5-azacytosin, NSC 102816, generický název azacytidine, léková forma Mylosar (Upjohn Co.)], 2'-deoxy-5-azacytidin (NSC 127716, decitabine) a 1-(β-D-arabinofuranosyl)-5-azacytosin (NSC 281272, fazarabine). I když léková forma byla registrována jen u jediné z nich, naznačují generické názvy, že se jedná o látky biologicky významné. Skutečně: všechny tři jsou klinicky používaná cytostatika, každé z nich působí poněkud jiným mechanismem a každé je cílené na jinou formu neoplazie. Zatímco ribosid (azacytidine) je určen pro léčení akutní myeloidní leukémie dospělých, používá se 2'-deoxyribosid (decitabine) k léčení myelodysplastického syndromu (funkční porucha hemopoetických kmenových buněk, „preleukémie“). Arabinosid (fazarabine), který je stabilnější *in vivo*, se stále ještě klinicky studuje.

Objevy dr. Pískaly byly však učiněny v nepříliš vhodné době. Patentová politika tehdejší Československé akademie věd nepřispívala k praktickému využití objevů učiněných na jejích ústavech, do licenčních jednání ústavy nemohly zasahovat. Práce dr. Pískaly a jeho kolegů MUDr. Jiřího Veselého, DrSc. a RNDr. Aloise Čiháka, DrSc., byly sice v roce 1980 oceněny Státní cenou, Akademie ani ústav však z těchto



Nejvýznamnější 5-azacytosinové nukleosidy

objevů valný hmotný prospěch neměly. Ani tehdejší media tyto významné objevy nezaznamenala. Stojí však za zmínku, že decitabin, kterým se dnes léčí pacienti v USA a Kanadě, a který se klinikám dostává prostřednictvím našeho exportního podniku, stále pochází z vlastních rukou dr. Pískaly.

Dr. Pískala strávil celý svůj odborný život na jediném pracovišti – v Ústavu organické chemie a biochemie. Humboldtovo stipendium (první v ÚOCHB) využil v roce 1969 k ročnímu studijnímu pobytu na univerzitě v Heidelbergu.

Když jsem se ho ptal, kolik má publikací, řekl že neměl důvod to počítat. Asi sto ...? Myslím, že v jeho případě je scientometrie zcela nerelevantní. Jeho odborné úspěchy lze totiž měřit jinak než byrokratickými parametry počtu publikací a impaktovými faktory časopisů. Mé zvědavosti však nedalo, abych si nevyhledal příslušné údaje v databázích. Protože nás WOS zpracovává údaje až od roku 1980, čímž by vznikl přibližně patnáctiletý handicap, obrátil jsem se na bázi PubMed. To je sice specializovaná báze biologicko-medicinská, ale zasahuje dál do minulosti. Příliš jsem neuspěl, nebyly tam samozřejmě žádné Pískalovy chemické práce, ale pouze několik prací biochemických, na kterých tehdy ještě jako spoluautor participoval. Situace se ale rázem změnila, když jsem se obrátil dotazem na jednotlivé látky: jen počet odkazů na fazarabine byl v této databázi 100, na decitabine 1132, na azacitidine 1840. Všechny tyto práce byly možné jen díky Pískalovým objevům, žádná ho však necituje, jejich autory to

zřejmě ani nenapadne. Takový je bohužel osud většiny primárních prací nás organických chemiků – autorů biologicky účinných sloučenin.

Téma je stále živé: 5-azacytidin i jeho deoxyribosid se dnes používají v molekulárně biologickém výzkumu také jako mimořádně účinné inhibitory methylací DNA, které specificky inhibují DNA methyltransferasu, blokují methylaci cytosinu v oligonukleotidech a ovlivňují genovou expresi a differenciaci buněk. Účinky těchto látek přiměly četné „následovníky“ v různých zahraničních laboratořích, aby připravovali obdobné další sloučeniny 5-azacytosinu; významné biologické účinky mají také např. 2',3'-dideoxyribonukleosid, [1,3-dihydroxy-2-propoxy]methylderivát nebo cyklopentylderivát.

Dr. Pískala patří k nejzasloužilejším pracovníkům Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Nehrnul se do funkcí, měl k svému potěšení svou chemii, svou laboratoř ... Nikdy nenašel čas sepsat „velký doktorát“. Přestože mu před několika lety nemoc znemožnila nadále pracovat vlastníma rukama, zůstává laboratoř i nadále jeho koníčkem. Publikuje dosud nezveřejněné výsledky svých dřívějších studií, další práce vznikají ve spolupráci s onkology v Bratislavě.

Přejeme dr. Pískalovi co nejvíce tělesného zdraví, duševní svěžestí a ještě mnoho let úspěšné práce.

Za spolupracovníky
Antonín Holý

**Ústav ekologie krajiny AV ČR v Českých Budějovicích
Katedra ekologie a hydrobiologie BF JU v Českých Budějovicích
Česká společnost chemická**

pořádají

ve dnech 8.–12. září 2003

letní škola

ENVIRONMENTÁLNÍHO MODELOVÁNÍ

Persistent Environmental Toxicants (PET) – Structure Analyses and Fate Evaluation

Letní škola bude uspořádána v rámci programu ERASMUS v Akademickém a univerzitním centru (AUC) Nové Hrady formou úvodních přednášek a navazujících cvičení na počítači. Přednášet budou přední odborníci z Katedry chemie, Univerzita v Jyväskylä, Finsko (Prof. Jaakko Paasivirta, Dr. Seija Sinkkonen, Mirja Lahtiperä). Účastníci kursu budou seznámeni s celou problematikou získávání dat a jejich užití pro modelování obsahu PET látek ve složkách ekosystému. Kapacita letní školy je dána kapacitou počítačové učebny. Přednost budou mít studenti doktorandského studia. Organizátoři si vyhrazují právo konečného výběru účastníků. Bližší informace podá garant kursu Doc. Ing. Jan Tříška, CSc. (triska@uek.cas.cz).

HPLC/MS ANALYSIS OF SULPHONATED AZODYES AND THEIR DEGRADATION PRODUCTS IN AQUEOUS SOLUTIONS TREATED WITH A NOVEL ELECTROCHEMICAL METHOD

**DANA ANSORGOVÁ^a, MICHAL HOLČAPEK^a,
PAVEL JANDERA^a, ANASTASIOS SAKALIS^b,
and ANASTASIOS VOULGAROPOULOS^b**

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, ^bLaboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, University Campus, 54124 Thessaloniki, Greece

Azodyes are used as the main category of dyestuffs in textile industry¹. These compounds are extremely difficult to be decomposed in the wastewater, since they are very resistant to biodegradation, mainly due to stereo-chemical interferences. Regardless of the incomplete biodegradation, the biological treatment is still the most widely applied method^{2–4}. The electrochemical treatment is a relatively new trend in the azodyes wastewater management giving very promising results^{5–7}. Concerning the quality of the treated wastewater, only indirect parameters are usually checked, which provide only general characterization of the treated wastewater and give no information about composition and concentration of final degradation products, even though many of them exhibit high toxic and carcinogenic potential.

The general description of a novel electrochemical method for textile wastewater and results of the separation and identification of the final degradation products are presented. Ion-pairing liquid chromatography coupled with PDA and mass spectrometric detector was used for the evaluation of the aromaticity of the final wastewater as well as for the identification of some degradation products.

Aqueous solutions of sulphonated azodyes containing a suitable concentration of electrolyte were treated in a laboratory scale electrolytic cell with a novel electrochemical method for textile wastewater treatment. Carbon fleece was used as a cathode and platinated titanium (Pt/Ti) was used as an anode. Ion-pairing reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC)^{8–10} coupled with ultraviolet (UV), photodiode array (PDA) and mass spectrometric (MS) detectors was applied for the analysis of studied dyes, their impurities and degradation products. The interpretation of electrospray ionization (ESI) mass spectra^{11,12} enabled the confirmation of the structures of initial dyes and their impurities. The coupling of ion pairing HPLC with electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) was applied for the identification of degradation products after electrochemical treatment of sulphonated azodyes. The suggested structures of degradation products could drive to the development of general mechanisms for degradation pathways of polysulfonated azodyes.

The authors thank to the Grant Agency of Czech Republic for the support of this work under project No. 203/01/0238, to the Ministry of Education of Czech Republic for research project No. 253100002 and to the University of Pardubice for internal grant No. 320030.

REFERENCES

1. Venkataraman K.: *The Analytical Chemistry of Synthetic Dyes*. Wiley, New York 1997.
2. Mohan S. V., Rao N. C., Prasad K. K., Karthikeyan J.: Waste Manage. 22, 575 (2002).
3. Young L., Jian Y.: Water Res. 31, 1187 (1997).
4. Razo-Flores E., Luijten M., Donlon B., Lettinga G. Field J.: Water Sci. Technol. 36, 65 (1997).
5. Oogtveren U. B., Koparal S.: J. Environ. Sci. Health, Part A 29, 1 (1994).
6. Lorimer J. P., Manson T. J., Plates M., Phull S. S.: Ultrason. Sonochem. 7, 237 (2000).
7. Vlyssides A. G., Loizidou M., Karlis P. K., Zorbas A. A., Pappaioannou D.: J. Hazard. Mater., B 70, 41 (1999).
8. Perez-Urquiza M., Prat M. D., Beltran J. L.: J. Chromatogr., A 871, 227 (2000).
9. Alonso M. C., Castillo M., Barceló D.: Anal. Chem. 71, 2586 (1999).
10. Storm T., Reemtsma T., Jekel M.: J. Chromatogr., A 854, 175 (1999).
11. Holčapek M., Jandera P., Přikryl J.: Dyes Pigm. 43, 127 (1999).
12. Holčapek M., Jandera P., Zderadička P.: J. Chromatogr., A 926, 175 (2001).

MODULACE AKTIVIT CYTOCHROMU P450 BENZIMIDAZOLOVÝMI ANTIHELMINTIKY

**VENDULA BALIHAROVÁ, JAKUB VELÍK,
JIŘÍ LAMKA, RADKA BALARINOVÁ,
LUDMILA TAHOTNÁ a LENKA SKÁLOVÁ**

Farmaceutická fakulta, Karlova univerzita, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Benzimidazolová antihelmintika jsou celosvětově používána ve veterinární a humání medicíně. Řada z nich byla popsána jako induktory aktivit cytochromu P450 u potkanů a člověka. S ohledem na velmi dobře známé mezidruhové rozdíly v zastoupení a aktivitách P450 isoform by měly být indukční účinky těchto léčiv otestovány přímo na cílových *species*. Proto jsme izolovali hepatocyty z jater těchto zvířat a primární kultury hepatocytů byly použity jako modelový systém pro testování modulace aktivit P450. Po 48h inkubace hepatocytů s testovanými léčivy byly měřeny aktivity P4501A a 3A (EROD a BROWD) a byl zjištěn obsah proteinu pomocí imunoblotingu.

Významným představitelem benzimidazolových antihelmintik je albendazol. Dominantní skupinou uživatelů tohoto léčiva jsou přežívávci. V prezentované studii jsme proto použili muflony a výsledky porovnali s potkanem, který představuje běžně používané modelové zvíře pro testování veterinárních léčiv. Albendazol vyvolal statisticky významnou indukci aktivit cytochromu P4501A i 3A u potkanů. Na druhé straně, pouze slabé, farmakoterapeuticky nevýznamné zvýšení aktivit P4501A i 3A bylo zjištěno u muflona. Dalšími ze skupiny benzimidazolových antihelmintik jsou fenbendazol, flubendazol a mebendazol. Vzhledem k jejich častému využití k terapii helmintů u prasat jsme vybrali toto *species* i pro naše

experimenty. Zatímco fenbendazol vyvolal statisticky významnou indukci P4501A aktivit, žádné ovlivnění těchto aktivit nebylo pozorováno po inkubaci s flubendazolem a mebendazolem.

S ohledem na naše výsledky lze předpokládat, že albendazol, flubendazol a mebendazol představují bezpečnou terapii helmintů u muflona, resp. prasete. V případě použití fenbendazolu pro terapii helmintů u prasete by měly být vzaty v úvahu farmakologické a toxikologické následky indukce P4501A (riziko farmakoterapeutických interakcí a zdravotní závadnosti masa).

Tento projekt byl realizován za podpory Grantové agentury České republiky, grant č. 524/03/1361 a Fondu rozvoje vysokých škol, grant č. 2992/2003.

BEHAVIOR OF 1,2,3-TRICHLOROPROPANE IN THE ACTIVE SITE OF WILD TYPE AND MUTANT HALOALKANE DEHALOGENASE DhaA, A MOLECULAR DYNAMICS STUDY

PAVEL BANÁŠ^a, MICHAL OTYEPKA^a, and JIŘÍ DAMBORSKÝ^b

^aDepartment of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc, ^bNational Center for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno

1,2,3-Trichloropropane (TCP) is a toxic synthetic chlorinated hydrocarbon known to occur naturally. TCP is resistant to biological and chemical degradation and is often found as a water pollutant. Thermodynamics calculation shows that aerobic mineralization of TCP could provide sufficient energy to sustain microbial growth. The haloalkane dehalogenase (DhaA) from *Rhodococcus* sp. m15-3 hydrolyzes carbon-halogen bonds in a wide range of haloalkanes, including TCP, to the corresponding (halo)alcohol, releasing halide ions. Recently a way how to improve DhaA enzyme to utilize TCP as substrate has been proposed by Bosma et al.¹

The goal of the work was to explain why is the mutated enzyme more effective than wild type DhaA by means of molecular modeling. The molecular dynamics method was used as a powerful tool of molecular modeling. Six 1 ns-long simulations were produced; three of them with the DhaA wild-type in complex with 1,2,3-trichloropropane (TCP) in tree different binding modes TCP(bm1), TCP(bm2), and TCP(bm3) and three of them with C176Y+Y273F double mutant of DhaA (M2-DhaA according to Bosma T. et al.¹). The product stereospecificity of dehalogenation by wild-type DhaA is 70–80 % of (*R*)-enantiomer (e.g. dehalogenation from bm2 mode) and 20–30 % of (*S*)-enantiomer (e.g. dehalogenation from bm3 mode).

Both simulations of wt-DhaA/TCP(bm1) and M2-DhaA/TCP(bm1) show that the dehalogenation from Cb is not possible, due to a sterical hindrance of TCP in the active site. Moreover, TCP changes its binding mode in both simulations from TCP(bm1) to TCP(bm2) mode. The other simulations (wt-DhaA/TCP(bm2), wt-DhaA/TCP(bm3), M2-DhaA/TCP(bm2), M2-DhaA/TCP(bm3)) show the TCP adopts a near

attack conformation (NAC, conformation appropriate for SN2 attack) more frequently during the whole simulation. The near attack conformation is more populated in simulation of M2-DhaA (see Table I).

Table I
Population of NAC for studied systems

System	TCP(bm2) [%]	TCP(bm3) [%]
wt-DhaA	20.7	6.5
M2-DhaA	28.9	11.7

The population of NAC in wt-DhaA is in agreement with experimental data about stereospecificity of product.

REFERENCES

1. Bosma T., Damborsky J., Stucki G., Janssen D. B.: Appl. Environ. Microbiol. 68, 3582 (2002).

OVLIVNĚNÍ GLYKACE BÍLKOVIN ANTIOXIDANTY IN VITRO. VLIV KYSELINY MOČOVÉ NA GLYKOXIDACI AMINOTRANSFERAS

**L. BOUŠOVÁ^a, J. DRŠATA^a, J. SOBOTKOVÁ^a,
M. BERÁNEK^b a V. PALICKA^b**

^aFarmaceutická fakulta, Karlova univerzita a Výzkumné centrum LN00B12,5, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,
^bÚstav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Glykace je významným faktorem podlejícím se na procesu stárnutí a rozvoji chronických onemocnění, jako je diabetes, atherosklerosa a Alzheimerova choroba. Je to sled neenzymových reakcí probíhajících mezi redukujícími monosacharidy (v organismu nejčastěji glukózou) a volnými aminoskupinami bílkovinného řetězce (nejčastěji lysinu). Během tohoto procesu vznikají volné radikály, intermediární a koncové produkty glykace (AGEs) a produkty autooxidace glykujícího cukru (=proces glykoxidace). K perspektivním terapeutickým zásahům patří omezení účinku volných radikálů působením antioxidantů přírodního (převážně rostlinné antioxidanty) nebo endogenního původu. Endogenním antioxidantem je i kysele močová, která se v organismu vyskytuje v poměrně vysoké koncentraci a podílí se na zhášení volných radikálů v plazmě. Jako model glykoxidace byly v této práci použity systémy „AST + D-fruktosa“ a „ALT + D-fruktosa“, jejichž vlastnosti byly popsány v dříve publikovaných pracích^{1,2}. Aminotransferasy jsou vhodnými modelovými bílkovinami, protože ve své molekule obsahují několik lysinových zbytků, z nichž jeden je součástí aktivního místa enzymu. Sledovali jsme vliv 1,2 mM kyseliny močové na aktivitu obou enzymů a vznik fluorescenčních pozdních produktů glykoxidace během inkubace při 37 °C v kontrolních pokusech a v přítomnosti 50 mM a 500 mM D-fruktosy. Kyselina močová vykazovala

vala negativní přímý vliv na aktivitu ALT (snížení aktivity o 20 % po 6 dnech inkubace), přímý vliv na AST jsme nezaznamenali. U obou enzymů se uplatnil pozitivní nepřímý vliv kyseliny močové jako omezení glykoxidačního účinku cukru (při 50 mM fruktose byla aktivita AST v přítomnosti kyseliny močové po 10 dnech inkubace o 26 % vyšší a aktivita ALT po 6 dnech inkubace o 22 % vyšší). Tento pozitivní efekt převážil i u ALT nad negativními přímými účinky kyseliny močové. Nepřímý vliv kyseliny močové byl závislý na koncentraci cukru v inkubační směsi a výrazněji se projevil v přítomnosti 50 mM fruktosy. U obou enzymů jsme prokázali vznik fluoreskujících koncových produktů (AGEs). V přítomnosti kyseliny močové byla tvorba AGEs nižší.

Práce byla podpořena grantem GA UK 95/2002 a Výzkumným záměrem MSM 111600002.

LITERATURA

1. Beránek M. et al.: Mol. Cell. Biochem. 218, 35 (2001).
2. Dršata J. et al.: Enzyme Inhib. Med. Chem. 17, 31 (2002).

PEA SEEDLING AMINOALDEHYDE DEHYDROGENASE: PRIMARY STRUCTURE AND ACTIVE SITE RESIDUES

FRANTIŠEK BRAUNER^a, MAREK ŠEBELA^{a,*}, JACQUES SNÉGAROFF^b, PAVEL PEČ^a, and JEAN-CLAUDE MEUNIER^b

^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^bJoint research unit of Chimie Biologique, Institut National de la Recherche Agronomique-Institut National Agronomique Paris-Grignon, F-78850 Thiverval-Grignon, France

The first primary structure of a plant aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH, EC 1.2.1.19) is reported. The enzyme of pea (*Pisum sativum*) seedlings subjected to our study oxidises ω -aminoaldehydes to the corresponding ω -amino acids. Although pea does not accumulate betaine aldehyde as a compatible osmolyte, the *N*-terminal sequence of a purified pea AMADH resembles those of plant betaine aldehyde dehydrogenases (BADHs). On the basis of an anticipated pea AMADH homology to these enzymes, degenerated oligonucleotide primers were designed and used for PCR amplification. Two cDNA fragments were obtained in initial 5' RACE experiments. Subsequent 5' and 3' RACE performed with specific non-degenerated primers provided two putative cDNAs of the plant BADH family. Both encoded protein sequences (AMADH1 and AMADH2) are highly homologous to those of plant BADHs. They show 81 % identity and 92 % in mutual alignment. As a deduced product of the first cDNA, AMADH1 matches completely the *N*-terminal sequence of pea AMADH analysed previously by Edman degradation. AMADH 2 represents a putative AMADH or BADH that has not yet been isolated and characterised. We also tried to identify essential amino acid residues of a purified pea AMADH by both determination of its dissociation constants and evaluation of inhibition effects of specific modification reagents. From our

results is clear that there are Cys ($pK = 8.0$) and Glu/Asp residues at the active site participating in the catalysis. This is in accordance with the presence of the conserved Glu and Cys active site regions of plant BADHs in both AMADH1 and AMADH2.

ANALÝZA KOMPLEXU PROTEINU p53 S DNA POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

VÁCLAV BRÁZDA

*Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Královopolská 135, 612 65 Brno
e-mail: vaclav@sci.muni.cz*

Vazbou nádorového supresoru proteinu p53 na DNA jsou zprostředkovány zásadní funkce tohoto proteinu, který se podílí na ochraně buňky před vznikem nádorového bujení. Významná je zejména vazba proteinu p53 na responzibilní sekvence v promotorech některých genů důležitých pro apoptózu a regulaci buněčného cyklu. Responzibilní sekvence je tvořena obvykle dvacetí páry bází se sekvencí (PuPuPuC(A/T)(T/A)PyPyPy)2x. Pro analýzu komplexů proteinu p53 s DNA jsme použili purifikovaný protein p53 a deleční mutanty proteinu p53. Oligonukleotidy obsahující responzibilní sekvence pro protein p53 byly naznačeny fluoresceinem. Po navázání proteinu p53 na DNA byly komplexy separovány pomocí kapilární elektroforézy. Detekce založená na fluorescenci excitované argonovým laserem nám umožnila analýzu nanogramových množství komplexů. Naše měření ukázala, že mezi afinitou proteinu p53 k jednotlivým responzibilním sekvenčím jsou značné rozdíly a nejlépe se protein p53 váže k promotorové sekvenci z genu proteinu p21. Jak jsme ukázali, tato gelová kapilární elektroforéza (CGE) umožňuje analýzu komplexů p53 s oligonukleotidy, ale také s dlouhými molekulami DNA. Použití kapilární elektroforézy pro studium vazby p53 s DNA značně snižuje nároky na množství vzorku oproti klasické deskové elektroforéze a umožňuje velmi rychlou kvantitativní analýzu vhodnou pro rutinní analýzy a automatizaci.

GA ČR 301/00/D001 GA AV B5004203.

VLIV SUBSTITUENTU CHINOXALINU NA ROZPOZNÁNÍ JEDNOTLIVÝCH KATIONŮ

HANA BŘEZNOVÁ^a, R. VOLF^a, VLADIMÍR KRÁL^a, J. L. SESSLER^b, A. C. TRY^b a T. V. ŠIŠKANOVÁ^a

^aKatedra analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bUniversity of Texas, Department of Organic Chemistry and Biochemistry, Austin, TX 78712 USA

Schopnost derivátů 5-nitrochinoxalinu vázat různé anionty (F^- , Cl^- and $H_2PO_4^-$ jako tetrabutylamoniové soli) byla již popsána a diskutována¹. Dále v předchozí práci bylo zjištěno, že deriváty 5-nitrochinaxalinu 2,3-disubstituované

2-pyrrolem a 2-thiofenem interagují s kationty². Vliv jednotlivých substituentů na tuto interakci je studován v této práci. Jednotlivé deriváty chinoxalinu byly proměřovány v monomerní formě v PVC membránových elektrodách s různými plastifikátory a porovnávány s polymerní formou receptorů v „coated-wire“ elektrodách. Polymerace probíhala podle již známého postupu³.

Pro momomerní formu receptoru v PVC membránových elektrodách bylo pozorováno, že:

- 1) elektroda s nesubstituovaným chinoxalinem a s nitrofenyloktyléterovým plastifikátorem vykazovala selektivitu pro kationt Ag⁺ a Cs⁺ na rozdíl od elektrody s dioktylfalátovým plastifikátorem,
- 2) selektivita pro kationty Ag⁺ a Cs⁺ byla po navázání nitroskupiny na chinoxalin ztracena. Odezva membránových elektrod s nitrochinoxalinem na jednomocné kationty se zlepšovala s lipofilitou kationtu pro oba plastifikátory,
- 3) navázání dalších substituentů (2-pyrol A a 2-thienyl B) na 5-nitrochinoxalin vedlo ke zvýšení selektivity v případě A vůči Pb²⁺, Ag⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ a v případě B vůči Pb²⁺ a Ag⁺ kationtům, přičemž selektivita byla ovlivněna polarlitou plastifikátoru.

Pro polymerní formu v „coated-wire“ elektrodách bylo zjištěno, že:

- 1) nitroskupina 5-nitrochinaxalinu byla redukována na aminoskupinu z důvodu polymerizace. U elektrody polymerizované s 5-aminochinoxalinu nebyla pozorována žádná odezva,
- 2) elektrody s poly(2,3 deriváty 5-aminochinoxalinu) ukažovaly selektivitu podobnou membránovým elektrodám.

Závěrem lze říci, že samotný chinoxalin má afinitu k jednomocným kationtům. Navázáním elektrofilní nitroskupiny se tato afinita ztrácí. 2,3-Deriváty 5-nitrochinoxalinu jsou citlivé na kationty, což je dáno právě substituenty. K tomuto závěru přispívá i podobné chování polymerních elektrod.

Práce byla podporována MŠMT ČR (MSM 223400008).

LITERATURA

1. Black C. B., Andrioletti B., Try A. C., Ruiperez C., Sessler J. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 121, 10438 (1999).
2. Březnová H., Volf R., Král V., Sessler J. L., Try A. C., Shishkanova T. V.: *Anal. Bioanal. Chem.*, v tisku.
3. Hrdlicka J., Volf R., Plaček L., Shishkanova T. V., Král V., Try A. C., Sessler J. L.: *Electroanalysis 8th International Conference, Bonn, 11–15 June 2000.*

NOVÁ TECHNOLOGIE VÝROBY IONTOVĚ SELEKTIVNÍCH ELEKTROD – TŘÍVRSTEVNÉ ELEKTRODY

**GABRIELA BRONCOVÁ, HANA BŘEZNOVÁ,
PAVEL MATĚJKÁ, RADKO VOLF
a VLADIMÍR KRÁL**

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6

Iontově selektivní elektrody (ISE) v dnešní době představují jednoduchý analytický nástroj používaný v celé řadě oborů zejména v klinické medicíně, v procesní kontrole a v analýzách životního prostředí. ISE jsou používány především pro svou jednoduchost a zpravidla nepříliš velkou cenu. Praktické využití nacházejí ISE zejména při potenciometrických měření pH a při stanoveních koncentrace iontů v nejrůznějších matricích. Jeden z nových typů ISE jsou „coated-wire“ elektrody, jež jsou určeny pro zjišťování iontů organických kyselin. Výběrem vhodného polymeru deponovaného na podkladovém materiálu elektrody lze měnit vlastnosti elektrod, především jejich selektivitu. U těchto elektrod je kladen důraz právě na selektivitu a citlivost, která je bohužel ovlivněna podkladovým materiálem. Podkladové materiály jsou kovy, které mají funkci nejen nosiče, ale především také katalyzátoru při vlastní tvorbě filmu. Jako nejlepší nosný materiál se jeví Pt a Au. Tyto kovy avšak mají podstatný vliv při potenciometrických měření, což je známo z literatury¹ a také naše dosavadní výsledky tomu nasvědčují.

Cílem našeho výzkumu bylo navrhnut a vyzkoušet nové technologie výroby elektrod a to vícevrstevních elektrod na bázi elektricky vodivých polymerů. K návrhu této technologie nás vedla myšlenka odstínění vlivu podkladového materiálu, v našem případě především platiny, z důvodu rušení tohoto podkladového materiálu při testování polymerních filmů metodou potenciometrickou. Nejprve bylo třeba najít vhodné podmínky pro přípravu vícevrstevních elektrod, které byly odlišné od přípravy jednovrstevních elektrod. Výhodou vícevrstevních elektrod by měla být jejich vyšší citlivost a selektivita.

V experimentech byla odzkoušena jako první vrstva polythiofen, který měl odstínit vliv podkladové platiny a také přispět svými katalytickými účinky při polymeraci další vrstvy. Druhá a třetí vrstva byly tvořeny nespecificky interagujícími polymery polyanilinem a polypyrrolem či selektivním polymerem neutrální červeně. Jejich pořadí bylo měněno. Polymer neutrální červeně specificky interaguje s citrátovými ionty². Přítomnost jednotlivých vrstev byla ověřena Ramanskou spektroskopí a elektronovým mikroskopem.

Nově vytvořená technologie přípravy elektrod by měla být dále použita pro nové citlivé polymerní vrstvy s využitím samostatně jako ISE či v senzorových polích elektronických jazyků a nosů.

LITERATURA

1. Lucas C. A., Markovič N. M., Ross P. N.: *J. Am. Phys. Soc.* 55, 7964 (1997).
2. Broncová G., Volf R., Shishkanova T. V., Matějká P., Král V.: *Euroanalysis-12, Dortmund, 8–13 September 2002, Book of Abstracts P2-016*, str. 446.

**IN VITRO CLONING AND EXPRESSION
OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* GENE
FOR Apx II PROTEIN**

**R. BURDYCHOVÁ^a, M. RYCHTERA^a,
L. BABÁK^a, and M. BARTOŠ^b**

^aFaculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, ^bGenex CZ, s.r.o., Podstránská 74, 627 00 Brno

Actinobacillus pleuropneumoniae is a Gram-negative bacterium which is the etiological agent of porcine pleuropneumonia, an acute or chronic respiratory infection affecting pigs of all ages. Epidemiological data suggest, however, that virulence of this bacterium is strongly correlated with the presence of Apx toxins. Discoveries on the immunogenicity of *A. pleuropneumoniae* Apx toxins in infected pigs have stimulated studies trying to achieve protection from *A. pleuropneumoniae* by use of these toxins. Results of the studies using various combinations of exotoxins and membrane proteins have shown the vaccine containing Apx I, Apx II, and Apx III toxins to provide most efficient protection from infection with all *A. pleuropneumoniae* serotypes.

In this study, the recombinant *A. pleuropneumoniae* Apx II protein was produced for this purpose. The gene coding Apx II toxin was amplified from the *A. pleuropneumoniae* serotype 4 DNA using polymerase chain reaction (PCR).

The resulting fragment (2871 bp) was cloned in the pCRT7/NT TOPO cloning vector (Invitrogen, The Netherlands) under the control of strong, inducible T7 promoter and introduced into chemically competent *E. coli* cells. The presence of insert was confirmed by PCR screening and sequencing after the propagation of recombinant DNA in *E. coli* cells.

The pCRT7/NT TOPO cloning vector (Invitrogen, The Netherlands) was constructed to allow foreign peptides be expressed in *E. coli* as fusion proteins. The gene coding *A. pleuropneumoniae* Apx II toxin was extended with a segment to encode a polyhistidine tag linked to its C-terminal sequence allowing a one-step affinity purification of the complex.

Small-scale expression studies of 10 of the clones were used to select the best Apx II producing culture. The largest amount producing clone was used for large-scale production in bioreaktor. Expression of Apx II coding sequence in *E. coli* resulted in the formation of insoluble inclusion bodies. The Apx II production reached a level of 4.5 mg.l⁻¹ over an expression period of 3 h.

The inclusion bodies were solubilized and mixed with Ni-NTA resin (QIAGEN, USA). Purification passed according to a standard purification protocol and imidazole elution was successfully used.

The ease of this expression system, the powerful single step purification and low costs makes it possible to produce Apx II in large amounts to further study the role of Apx II in physiological processes.

**NUCLEAR MYOSIN I AND ACTIN
ARE REQUIRED FOR TRANSCRIPTION
OF RIBOSOMAL GENES**

**HANA DINGOVÁ, VLADA V. PHILIMONENKO,
and PAVEL HOZÁK**

Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4

We investigated the role of recently described nuclear myosin I (NMI) and actin in transcription. Transcription of rDNA is carried out by RNA polymerase I (Pol I) and takes place in a special nuclear structure – the nucleolus. Ultrastructurally, actin and NMI distribution in nucleolar components is dependent on Pol I transcription, and NMI co-localizes with nascent rRNA in the dense fibrillar component. Pol I purification and immunoprecipitation experiments demonstrate that actin is a part of Pol I holoenzyme. Rate of Pol I transcription *in vitro* is dramatically reduced by antibodies directed against NMI or actin. On the contrary, addition of purified NMI stimulates transcription. The involvement of actin and NMI in the Pol I transcription was confirmed *in vivo* using intranuclear microinjection. Nascent transcripts were identified after BrUTP incorporation in permeabilized cells, or by a “hypotonic shift” that allows entry of small hydrophilic molecules into living cells. Intranuclear microinjections of anti-actin and anti-NMI antibodies inhibit nucleolar transcription: the reduction of the signal was about 35 % upon microinjection of anti-actin antibodies, and about 20 % following microinjection of anti-NMI antibodies (compared to control cells micro-injected with fluorescent dextran or unrelated antibodies). Our results clearly demonstrate that nuclear myosin I and actin are involved in transcription by RNA polymerase I.

**PŘÍPRAVA FLUOROVANÝCH DERIVÁTŮ
BIOLOGICKY VÝZNAMNÝCH IMIDAZOLŮ**

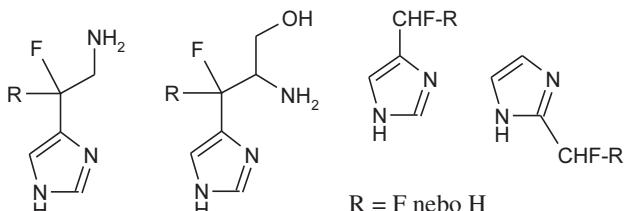
BOHUMIL DOLENSKÝ^a a KENNETH L. KIRK^b

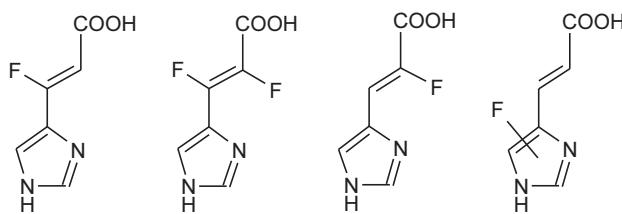
^aÚstav analytické chemie, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^bNational Institutes of Health, NIDDK, LBC, Bethesda, MD 20892, USA

e-mail: blbek@seznam.cz

Přírodní látky, v jejichž struktuře je atom vodíku nahrazen atmom fluoru, nacházejí použití v nejedné oblasti výzkumu procesů probíhajících v živých organismech. Využívá se především skutečnosti, že záměnou vodíku za fluor nevzniká velká změna velikosti molekuly, ale dramaticky je však změněna polarita, hydrofilita a stabilita látky. Skutečnost, že fluo-





rované organické látky nejsou v živých organismech obsaženy, je rovněž využitelná pro sledování různých dějů. Problémem však zůstává příprava těchto fluorovaných látok. Téměř vždy jsou fluorované deriváty přírodních látok připravovány více-stupňovou syntézou.

Úspěšné i neúspěšné přístupy k přípravě fluorovaných derivátů histaminu, histidinolu, histidinu, methylimidazolů a urokanové kyseliny budou prezentovány.

LITERATURA

1. Fan J., Dolensky B., Kim I. H., Kirk K. L.: *J. Fluorine Chem.* **115**, 137 (2002).
2. Dolensky B., Takeuchi Y., Cohen L. A., Kirk K. L.: *J. Fluorine Chem.* **107**, 147 (2001).
3. Dolensky B., Kirk K. L.: *J. Org. Chem.* **66**, 4687 (2001).
4. Dolensky B., Kirk K. L.: *J. Org. Chem.* **67**, 3468 (2002).
5. Dolensky B., Kirk K. L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **67**, 1335 (2002).

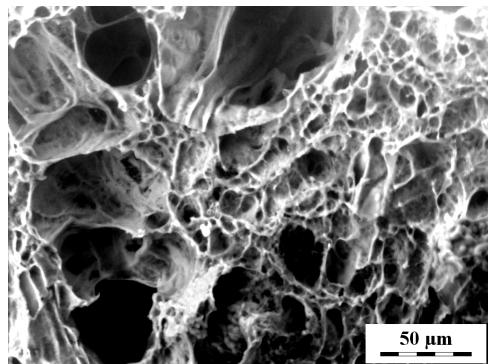
MAKROPORÉZNÍ GELY S ŘÍZENOU POROZITOU PRO REGENERACI NERVOVÉ TKÁNĚ

HANA DRNOVSKÁ^{a,b} a FRANTIŠEK RYPÁČEK^a

^aÚstav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky a ^bCentrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6

Současné pokroky v buněčné a molekulární biologii otevírají nové možnosti terapeutického využití kmenových buněk při náhradách a regeneraci tkání. Důležitou roli v těchto nových postupech plní polymerní biomateriály sloužící jako podpůrná struktura implantovaných buněk a plnící funkci mezibuněčné hmoty vyvíjející se tkáně. Zaměřili jsme se na vývoj biomateriálu pro regeneraci nervové tkáně, potenciálně využitelného např. při reparaci míšních lézí. Cílem je vyvinout velmi měkký polymerní gel s velkým vnitřním objemem vzájemně propojených pórů, které by svými rozměry, tvarem i prostorovou orientací umožňovaly osídlení biomateriálu kmenovými buňkami. Zároveň by měl být zaručen přívod živin a růstových faktorů za současně podpory komunikace a operace neuronů a gliových buněk.

Sítované hydrogely byly připraveny radikálovou polymerací (2-hydroxyethyl)-methakrylátu (HEMA) a ethylen-dimethakrylátu (EDMA). Makroporézní struktura gelu byla vytvořena (a) metodou vymývání tuhého organického porogenu, (b) fázovou separací polymeru v přítomnosti systému rozpouštědlo-srážedlo a (c) kombinací vymývání tuhého porogenu



Obr. 1. Hydrogel na bázi polyHEMA s přídavkem 80 % srážedla (obsah porogenu $0,287 \text{ g.cm}^{-3}$)

a systému rozpouštědlo-srážedlo. Obsah vody v gelech byl stanoven měřením rovnovážného stupně botnání. Porozita a morfologie vodou nabotnálcích gelů byla studována nízkovakuovou rastrovací elektronovou mikroskopíí (Aquamet, Tescan, ČR). Na příkladu hydrogelů na bázi polyHEMA jsou demonstrovány strategie přípravy gelů s řízenou velikostí (10–70 mm) i architekturou pórů. Jsou diskutovány možnosti a syntetické postupy pro modifikaci povrchových vlastností biomateriálu a zavedení specifických peptidových struktur podporujících adhezi a proliferaci buněk.

Výzkum je prováděn s finanční podporou programu výzkumných center MŠMT LN00A065.

REGULACE BIOSYNTÉZY VALINU U *Corynebacterium glutamicum*

VERONIKA ELIŠÁKOVÁ, JIŘÍ HOLÁTKO a MIROSLAV PÁTEK

Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Bakterie *Corynebacterium glutamicum* je významným průmyslovým producentem aminokyselin. S využitím metod genového inženýrství jsou konstruovány nové produkční kmeny s vyšší hladinou požadovaného produktu. Jedním z těchto produktů je aminokyselina valin, která je pro člověka i zvířata esenciální.

V buňkách *C. glutamicum* je valin syntetizován spolu s isoleucinem paralelní biosyntetickou dráhou, která se dále větví na dráhy syntézy leucinu a pantotenátu. Enzymy katalyzující tvorbu valinu a isoleucinu jsou kódovány geny ilvBN (synthasa acetohydroxykyselin), ilvC (reduktoisomerasa acetohydroxykyselin), ilvD (dehydratasa dihydroxykyselin) a ilvE (transaminasa). Regulace této biosyntetické dráhy byla studována jak na úrovni transkripcí, tak na úrovni enzymové aktivity.

Klíčovým enzymem biosyntetické dráhy valinu a isoleucinu je synthasa acetohydroxykyselin (AHAS). Regulační

podjednotka tohoto enzymu váže konečné produkty dané dráhy (valin, leucin, isoleucin) a řídí tak regulaci aktivity enzymu zpětnou vazbou. S využitím metody místně specifické mutagenese byly do potenciálního vazebného místa pro valin (resp. leucin a isoleucin) zavedeny záměny jedné až tří aminokyselin. Pro měření aktivity mutantních enzymů byl zkonstruován kmen *C. glutamicum* ΔilvN, který byl transformován plazmidem nesoucím mutované geny. Získání byly dva mutanti (M8 a M13), kteří vykazují úplnou rezistenci k inhibici 10 mM valinem, leucinem i isoleucinem. Tyto výsledky naznačují, že vazebné místo pro všechny tři aminokyseliny je totožné.

Pro cílenou konstrukci nového produkčního kmene je nezbytná znalost transkripčních signálů genů dané dráhy. Z tohoto důvodu byly s využitím promoter-probe vektoru pET2 a reportérového genu cat analyzovány promotory P-ilvB, P-ilvN, P-ilvD a P-ilvE. Metodou primer-extension byly přesně stanoveny příslušné transkripční počátky u P-ilvN, P-ilvD a P-ilvE. Znalost transkripčního profilu genů účastnících se biosyntézy valinu je tak kompletní. Při použití různě dlouhých fragmentů DNA nesoucích tyto promotory a různých kultivačních podmínek (nadbytek valinu nebo naopak hladovění na valin) byla studována regulace jejich exprese valinem. V případě P-ilvB, který je řízen transkripční atenuací, bylo zjištěno, že oblast nedokonalé přímé repetic, lokализované před vlastním promotorem, výrazně zvyšuje jeho aktivitu. Při hladovění na valin docházelo k derepresi promotoru a jeho aktivita měřená prostřednictvím aktivity reportérového enzymu (chloramfenikolacetyltransferasy) se zvýšila oproti buňkám rostoucím s přebytkem valinu až 50×. V souladu s tímto zjištěním způsobila delece atenuátoru 40-ti násobné zvýšení promotorové aktivity. P-ilvN byl lokalizován 340 bp před iniciačním kodonem, uvnitř genu ilvB. Analýza tohoto promotoru prokázala, že oblast lokalizovaná mezi vlastním promotorem a translačním startem genu ilvN způsobuje výrazné snížení aktivity tohoto promotoru. Měřením aktivit P-ilvD a P-ilvE bylo zjištěno, že P-ilvD je slabý, zatímco naopak P-ilvE poměrně silný promotor.

Na základě výsledků analýzy regulace dráhy biosyntézy valinu byla zahájena konstrukce produkčního kmene *C. glutamicum*, jejíž podstatou jsou přímé zásahy (delece, inzerce a výměny) do chromozomu této bakterie. Cílem těchto modifikací je posítit tok intermediátů směrem k syntéze valinu (delece atenuátoru P-ilvB, zavedení mutace M13 způsobující rezistenci AHAS ke zpětnovazebné inhibici) a zároveň zablokovat nebo oslabit kompetující dráhy vedoucí k tvorbě isoleucinu a pantotenátu (delece v genech ilvA a panB). Modifikované úseky DNA byly integrovány do chromozomu pomocí plazmidu pK18mobsacB. Letální gen sacB byl využit pro selekci žádany konstruktů po druhé rekombinaci, jejíž důsledkem bylo vyštěpení veškerých vektorových sekvencí. Výsledkem modifikací je kmen *C. glutamicum* ΔilvAΔpanB ilvNM13ΔAttP-ilvB, který je testován na produkci valinu. Dalšími kroky jsou inzerce silných promotorů před geny ilvD a ilvE. Hlavní výhodou takto zkonstruovaného kmene je absence plazmidu a tedy i genu pro rezistenci k antibiotiku, používanému jako marker.

VLIV HUMINOVÝCH KYSELIN NA BIODEGRAADAČNÍ A ENZYMOVOU AKTIVITU MIKROBNÍCH POPULACÍ VŮCI FENOLICKÝM AROMÁTŮM

**ARIANA FIALOVÁ, MARTINA SIGLOVÁ,
ALENA ČEJKOVÁ, JAN MASÁK
a VLADIMÍR JIRKŮ**

ÚKCHB, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Ariana.Fialova@vscht.cz

Odstraňování aromatických polutantů biologickou, šetrnou a efektivní cestou, je podmíněno konkrétními podmínkami v kontaminované lokalitě a biodegraadačním potenciálem použité mikrobní populace. Ve snaze zvýšit toleranci mikroorganismů vůči fenolátům a biodegraadační rychlost, je testován vliv přídavku huminových kyselin (HAs), komplexních polyhydroxyfenolových výluhů humusu. Bližší charakterizace s tímto vlivem přímo souvisejících biodegraadačních a enzymových mechanismů je proto nezbytným předpokladem úspěšného nasazení HAs a mikroorganismů při bioremediačním procesu.

Nepatogenní půdní kvasinka a bakterie, schopné利用ovat fenol a některé jeho deriváty jako jediné zdroje uhlíku a energie, jsou v této studii použity jako modelové organismy. Kvasinka *Candida maltosa*, izolovaná z půdy dlouhodobě kontaminované ropnými uhlovodíky, prokázala schopnost degradovat resorcinol, katechol, fenol, hydrochinon a dinitrofenol. Sbírková bakterie *Rhodococcus erythropolis* s vysokou adaptací schopnosti byla schopná利用ovat resorcinol, katechol, fenol, hydrochinon, 4-hydroxybenzoát a *p*-kresol. Pro oba mikroorganismy byly vybrány optimální kultivační podmínky (typ média, pH, teplota), byly stanoveny limitní koncentrace zdrojů uhlíku a energie a některé enzymové aktivity v přítomnosti a nepřítomnosti HAs různého typu. Kvasinka byla více tolerantní vůči vyšším koncentracím daných aromatických než bakterie, což potvrdily i hodnoty aktivity prvního enzymu v degradační dráze fenolu, fenol hydroxylasy (E.C. 1.14.13.7), který byl stanovován v průběhu kultivace v hrubém bezbuněčném extraktu po dezintegraci biomasy.

Vliv HAs, majících vysokou afinitu k hydrofobním látkám, spočívá v jejich schopnosti tvořit povrchově aktívne pseudomicely. HAs se v průběhu kultivace kvasinkové i bakteriální populace v přítomnosti fenolu jako jediného zdroje uhlíku a energie naadsorbovaly na povrch buněk, což se nestalo, pokud byla jako zdroj uhlíku a energie použita glukóza. Většina testovaných HAs nebyla kvůli své vysoké molekulové hmotnosti (nemožnost transportu do buněk) mikroorganismy využívána jako zdroje uhlíku a energie, přesto některé z nich byly schopné indukovat intracelulární fenol hydroxylasu i v nepřítomnosti fenolu. Indukce a hodnoty aktivity klíčového enzymu fenol hydroxylasy závisí na použitém substrátu a jeho koncentraci, přičemž oscilace v jeho aktivitě lze zmenšit právě přídavkem HAs do média. Růstové rychlosti a celkový nárůst biomasy na vyšších koncentracích fenolu ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$) se zvýšil po přídavku HA5, PAB 79, S4 a S5 v koncentracích 0,05 až $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ na rozdíl od některých jiných HAs, jejichž přídavek neměl žádný pozitivní vliv na degra-

daci. Vliv HAs na růst a degradaci fenolických látek se liší pro různé typy a koncentrace HAs, ale i pro různé koncentrace a typy zdroje uhlíku a energie.

Dosažené výsledky byly potvrzeny různými uspořádáním měření (batch-kultivace v baňkách, mikrokultivační zařízení BioscreenC a stanovení enzymové aktivity) a ukazují na nutnost provádět obdobné testy vždy pro konkrétní situaci (mikroorganismus, kultivační podmínky, typy huminových kyselin a jejich koncentrace), před použitím v dekontaminačním procesu.

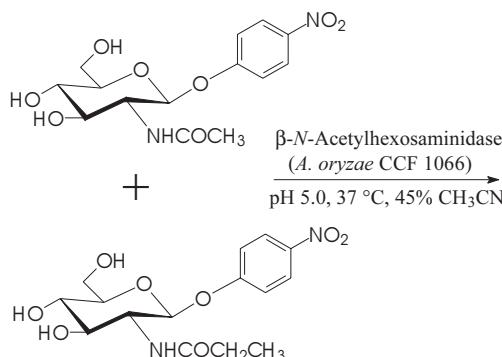
NEW TRANSGLYCOSYLATION REACTIONS CATALYSED BY β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES

**P. FIALOVÁ, LENKA WEIGNEROVÁ,
A. PIŠVEJCOVÁ, and VLADIMÍR KŘEN**

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

There have been several hints in the literature suggesting that glycosidases exhibit a broad substrate specificity, which enables them to cleave and even to transfer modified glycosidic moieties yielding oligosaccharides^{1–3}. In our project we have investigated the affinity of β -N-acetylhexosaminidases from various sources to substrates bearing different acyls at the 2-C amino group instead of the common acetyl.

Four 4-nitrophenyl 2-acylamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosides (acyl = formyl, glycolyl, propionyl and trifluoroacetyl) and 4-nitrophenyl 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranoside were synthesised from D-glucosamine hydrochloride. They were subjected to a screening comprising 36 β -N-acetylhexosaminidases of mostly fungal origin concerning their hydrolysis rate and transglycosylation potential with the above substrates. As a result, β -N-acetylhexosaminidases from *A. oryzae* CCF 1066, *A. terreus* CCF 2539, *P. oxalicum* CCF 2315 and *P. pitii* CCF 2277 were selected for the catalysis of semi-preparative transglycosylations, which gave yield to several products. It is the first documented case of transglycosylations of modified substrates catalysed by β -N-acetylhexosaminidases. This rather novel concept widely extends the synthetic capability of glycosidases.



Support by the grant 203/01/1018 and 204/02/P096 from the Grant Agency of the Czech Republic and Institutional Research Concept No. AV0Z5020903 is acknowledged.

REFERENCES

1. MacManus D. A. et al: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1999, 295.
2. Mariam G. et al: Carbohydr. Res. 47, 188 (1976).
3. Hušáková L. et al: Carbohydr. Res. 331, 143 (2001).

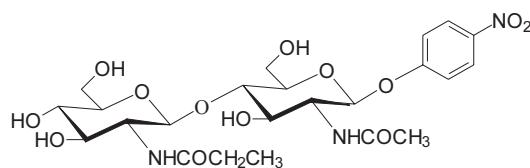
KVANTITATIVNÍ MOLEKULÁRNÍ MONITOROVÁNÍ NEMOCNÝCH CLL LÉČENÝCH MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKOU ANTI-CD20 A PURINOVÝMI ANALOGY

**K. FORSTEROVÁ, K. PULKRÁBKOVÁ
a A. SLAVÍČKOVÁ**

1. interní klinika VFN, U Nemocnice 2, 120 00 Praha 2
e-mail: maaxa@hotmail.com

Monoklonální protilátka anti-CD20, rituximab (MabThera, Roche), se v poslední době začíná uplatňovat i v léčbě chronických lymfatických leukémíí (CLL) nejen jako monoterapie poslední volby, ale i v kombinované léčbě nově diagnostikovaných pacientů. Kombinace chemoterapie s monoklonální protilátkou může zlepšit výsledky léčby a navodit i molekulárně biologickou remisi, tj. vymízení molekulárně biologického markeru maligního onemocnění z orgánu, kde byl předtím detegován – obvykle z periferní krve a kostní dřeně. V současnosti však zůstává otázkou, zda tato dobrá odpověď povede k prodloužení období bez známek onemocnění. Z některých pracovišť vzešel názor, že o lepší prognóze může svědčit rychlost odpovědi na léčbu. Proto lze předpokládat, že kvantifikující molekulární monitorování účinku léčby a reziduálního onemocnění je pro klinická využití přínosnější. Markerem nejčastěji využívaným pro monitorování B-lymfoproliferativních onemocnění pomocí PCR je klonální přestavba oblasti CDR3 genu pro těžký imunoglobulinový řetězec (IgH). Na pracovišti byla již dříve ověřena klinická relevance kvantifikujícího monitorování nemocných NHL s využitím komparativní IgH/ras PCR.

Tato práce ověřuje uplatnitelnost metodiky také při monitorování nemocných CLL. Byl sledován vývoj choroby v kostní dřeni u 14 pacientů, z nichž 13 bylo léčeno kombinací R-FluCy



(rituximab, fludarabin a cyklofosfamid) nebo monoterapií téžito terapeutiky a 1 pacient léčený kombinací R-COP (rituximab, cyklofosfamid, vinkristin, prednison). 7 z těchto 14 sledovaných nemocných navíc kromě léčby podstoupilo autologní transplantaci krvetvorných buněk. Bylo zatím monitorováno 18 období onemocnění a vždy zjištěn souhlas s klinickým stavem pacientů. PCR remise dosáhlo 11 pacientů léčených kombinací R-FluCy, event. R-COP. Nejdéle zatím pozorované období molekulární remise trvalo 21 měsíců. Molekulární regrese, tedy kvantitativní pokles markeru, byla pozorována u 4 pacientů léčených kombinací R-FluCy a molekulární progrese, tj. znovuobjevení nebo kvantitativní nárůst markeru, byla pozorována v 1 případě, a to u nemocného léčeného rituximabem v monoterapii.

S ohledem na dobrou korelací dosavadních laboratorních a klinických šetření je možno předpokládat, že obdobné sledování u dostatečně velkého souboru pacientů by mělo vést k závěrům o uplatnitelnosti metodiky při terapeutických roz hodováních.

Tato práce je podporována grantem č. 203580, 15/01 GA UK.

SYNTÉZA NOVÝCH DERIVÁTŮ SILYBINU S MODIFIKOVANÝMI BIOLOGICKÝMI A FYZIKÁLNÍMI VLASTNOSTMI

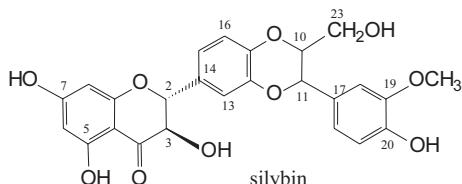
**R. GAŽÁK^a, DANA WALTEROVÁ^b,
PETR SEDMERA^a a VLADIMÍR KŘEN^a**

^aLaboratoř biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha, ^bÚstav lékařské chemie a biochemie, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
e-mail: gazak@biomed.cas.cz

Flavanolignan silybin, izolovaný ze semen ostrostestřice maříanského, je aktivní složkou řady hepatoprotektivních a cytoprotektivních přípravků. Silybin vykazuje silné antioxidační a antiradikálové účinky. Přírodní silybin je ekvimolární směsí dvou velmi obtížně separovatelných diastereoisomerů (2R, 3R, 10S, 11S a 2R, 3R, 10R, 11R). Jeho biologická dostupnost je omezena nízkou rozpustností ve vodě.

V rámci této práce se řeší dva základní přístupy pro zlepšení biologické dostupnosti silybinu: selektivní oxidace primární hydroxylové skupiny silybinu na skupinu karboxylovou, spočívající ve zvýšení rozpustnosti ve vodě a konjugace silybinu s dalším antioxidantem (např. kyselinou gallovou) vedoucí ke zvýšení antioxidačních a antiradikálových účinků.

Selektivní methylace jednotlivých hydroxylových skupin silybinu (resp. jeho 2,3-dehydro derivátu) a následné biologické testování těchto látek by mělo objasnit roli konkrétních funkčních skupin v molekulárních mechanismech antioxidačních účinků silybinu.



Vzhledem k polyfunkčnímu charakteru molekuly silybinu je nezbytné pro většinu transformací vycházet ze selektivně chráněných derivátů. Z tohoto důvodu je součástí projektu také vývoj metod selektivního chránění v molekule silybinu (popř. 2,3-dehydrosilybinu).

Cílem práce je příprava derivátů silybinu s modifikovanými vlastnostmi, především pak derivátů s lepší biodostupností a zvýšeným a/nebo cíleným antioxidačním účinkem.

Práce byla podporována granty č. 303/02/1097 GA ČR, č. FD-K/096 MPO ČR a č. AV0Z5020903.

MAPOVÁNÍ KONTAKTNÍCH MÍST MEZI RECEPTORY III. SKUPINY GPCR A G-PROTEINY

**M. HAVLÍČKOVÁ, JAROSLAV BLAHOŠ,
L. PREZEAU a J.-P. PIN**

Oddělení molekulární farmakologie, UEM, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: michavl@seznam.cz

Receptory spřažené s G-proteiny (GPCR) hrají klíčovou roli v mnoha fyziologických i patologických procesech a proto jsou jejich struktura a funkce předmětem intenzivního výzkumu. Řada experimentů prokázala, že GPCR se mohou vyskytovat jako konstitutivní nebo indukované homo- či heterodimery. Dimerizace podstatně ovlivňuje vlastnosti nově vzniklých receptorů např. jejich farmakologické vlastnosti, interakci s G-proteiny, desensitizaci, internalizaci a buněčný transport.

Pro určení strukturního a funkčního uspořádání komplexu dimerní receptor-G-protein je nezbytné zjistit, jestli G-proteiny interagují s oběma podjednotkami receptoru, nebo zda je pouze jedna z podjednotek dimera zodpovědná za aktivaci asociovaného G-proteinu. Jako model jsme použili GABABR (receptor pro γ -aminomáselnou kyselinu), který je tvořen dvěma různými podjednotkami GABABR1 a GABABR2. Mutace provedené v intracelulárních kličkách obou podjednotek prokázaly, že podjednotka GABABR2, konkrétně její druhá intracelulární klička, je nezbytná pro aktivaci G-proteinů. Testování chimerních podjednotek receptoru obsahujících mutace intracelulárních domén naznačilo, že jediná podjednotka homodimerních receptorů obsahuje všechny determinanty nezbytné k aktivaci G-proteinů. Dále jsme se soustředili na určení oblastí, které jsou zodpovědné za specifickou interakci mezi receptorem a α -podjednotkou G-proteinu. V tomto případě byly použity mGluRs (metabotropní glutamatové receptory), které patří do III. skupiny GPCR stejně jako GABABR, ale funkční mGlu receptor je tvořen dvěma identickými podjednotkami. Využili jsme rozdílných schopností mGluR2 a mGluR8 aktivovat chimerní Gq α 5 a Gq α 8 proteiny a zjistili jsme, že sekvence druhé intracelulární kličky těchto receptorů specificky interaguje s C-koncem Ga-podjednotky (posledních 5 aminokyselin). Tato interakce je zodpovědná za selektivní rozpoznaní Go/z-proteinů mGlu receptory II. a III. třídy a určuje, který typ G-proteinů bude aktivován.

Získané výsledky naznačují, že C-konec Ga-podjednotky interaguje místem na receptoru, které je tvorenou druhou a pravděpodobně třetí intracelulární kličkou, stejně jako je tomu u I. skupiny GPCR. Je tedy možné, že u těchto dvou skupin dochází k aktivaci G-proteinů stejným způsobem.

Tento projekt byl podporován GA ČR (301/00/0654), IGA MZČR (NF 6704-3/01).

MUTATIONS IN CKI1 BLOCK FEMALE GAMETOPHYTE DEVELOPMENT IN *Arabidopsis thaliana*

**JAN HEJÁTKO^{a,c}, MARKÉTA PERNISOVÁ^b,
PETRA TÄNZLER^c, KLAUS PALME^c,
and BŘETISLAV BRZOBOHATÝ^{a,b}**

^aInstitute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno, ^bDepartment of Functional Genomics and Proteomics, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^cMax-Delbrück Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft, Carl-von-Linne Weg 10, D-508 29, Köln, Germany
e-mail: hejatko@sci.muni.cz

Homologues of bacterial two-component signal transduction elements are emerging key players in signaling of plant hormones like ethylene and cytokinin. In *Arabidopsis thaliana* the family of sensor histidine kinases consists of at least 11 genes. CKI1 is a member of this large gene family. CKI1 was first identified by activation tagging resulting in cytokinin independent growth and differentiation of *Arabidopsis calli*. It has been suggested that CKI1 may play a role in cytokinin perception, however, its biological function remains elusive. We identified an En-1 insertion knockout mutant in CKI1. In progeny of the CKI1/cki1::En-1 plants segregated the cki1::En-1 (cki1-i) allele in a non-Mendelian manner suggesting a loss of function in a gamete carrying the cki1-i. The mutant displayed a semi-sterile silique phenotype. Reciprocal backcrosses revealed that female gametophyte development is fully blocked by the mutation. Detailed analysis of the mutant female gametophyte disclosed a defect in a later phase of embryo sac development, leading to central vacuole decomposition and subsequent progressive degradation of the female gametophyte constituents. By screening for semi-sterile siliques phenotype in the segregating CKI1/cki1-i population we identified a wild type revertant line bearing a silent mutation in the CKI1 gene as a result of an En-1 excision. Independent En-1 excision events resulted in two additional, stable loss of function mutations in the CKI1 gene (cki1-s1 and cki1-s2). Analysis of all mutant alleles suggests that the mutant phenotype clearly links to the En-1 insertion in CKI1 and indicates an essential role of CKI1 in regulation of female gametophyte development. To analyze the expression of CKI1 we constructed two different fusions of a putative CKI1 promoter region with a uidA gene. Histological analysis of GUS activity in stable transformants harboring these fusions, and *in situ* mRNA hybridization analysis of the CKI1 gene expression pattern suggest a novel complex role for CKI1 throughout

entire female gametophyte development and in early seed development.

Supported by grants LN00A081, MSM143100008, Z5004920. J. H. was supported by DAAD.

STANOVENÍ HLADINY APOPTÓZY INDUKOVANÉ POMOCÍ JEDNOTLIVÝCH C-KONCOVÝCH ISOFOREM PROTEINU p73 V BUNĚČNÝCH LINIÍCH EXPRIMUJÍCÍCH RŮZNÉ KONFORMAČNÍ ISOMERY PROTEINU p53

**R. HRSTKA, P. MÜLLER, P. ČEŠKOVÁ
a B. VOJTĚŠEK**

Základna experimentální onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

Protein p53 může být indukován a stabilizován poškozením DNA, hypoxií, defekty mitotického vřeténka, popřípadě aktivací onkogenů nebo virů. Aktivovaný protein p53 může vyvolat apoptózu, zástavu buněčného cyklu a v některých případech i senescenci.

Funkce proteinu p53, zejména při navození apoptózy, je významně ovlivněna expresí různých isoform jeho homologu, proteinu p73. Předpokládá se, že každá z isoform proteinu p73 kombinující různý N-koncový a C-koncový sestřih vyzkouší rozdílné transaktivaci a protein–protein interakční schopnosti, a tak společně s proteinem p53 vytváří regulační síť, která může velice jemně reagovat na aktuální stav buňky.

Buněčné linie H1299, MCF-7, T47D, BT474 a BT574 byly transfekovány expresními plazmidy s vloženými sekvenčemi jednotlivých delečních forem proteinu p73 (alfa, beta, gamma, delta) a proteinu p53. Transaktivaci schopnost různých isoform proteinu p73 a jejich schopnost indukovat apoptózu byla porovnávána ve vztahu k různým typům mutací proteinu p53. Úroveň apoptózy byla měřena u buněčných linií exprimujících jednak wild-type p53 a jednak různé mutanty p53 lišící se DNA vazebnou kapacitou a typem konformace DNA vazebné domény.

Naše výsledky jednoznačně potvrzují vliv vlastního buněčného prostředí, typu tkáně, statutu proteinu p53 a isoform proteinu p73 na proces programované smrti buněk, přičemž existence spolupráce mezi p73 a p53 je pravděpodobně nezbytná. Pokud by se podařilo v dané nádorové linii specificky aktivovat některou z isoform vyvolávajících apoptózu, popřípadě inaktivovat mutovanou formu p53, bylo by možné uvažovat i o speciální cílené terapii.

Tato práce byla podporována grantovým projektem IGA MZ ČR číslo 6404-3.

ÚLOHA ALTERNATIVNÍHO SESTŘIHU PŘI DIMERIZACI METABOTROPNÍCH GLUTAMÁTOVÝCH RECEPTORŮ

**BOHDANA HRUŠKOVÁ, ALICE ZIKOVÁ
a JAROSLAV BLAHOŠ**

Oddělení molekulární farmakologie, Ústav experimentální medicíny, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4

Receptory sprážené s G-proteiny (GPCRs) jsou největší skupinou buněčných receptorů reagujících na obrovskou škálu ligandů včetně mnohých léčiv. Proto je odhalení principů a mechanismů přenosu signálu (rozpoznaní ligandu, aktivace receptoru, přenos signálu do buňky) důležité pro porozumění fyziologickým procesům na molekulární úrovni a tím pro vývoj nových léčiv.

Metabotropní GABAB receptor patří do třetí rodiny GPCRs. Funguje jako heterodimer složený z podjednotek GB1 a GB2. Podjednotka GB1 je zodpovědná za vazbu ligandu (*N*-konec) a aktivaci receptoru a podjednotka GB2 aktivuje G-proteiny. Pro funkčnost receptoru je ovšem důležitá interakce mezi oběma podjednotkami. Této vlastnosti jsme využili pro studium úlohy *C*-koncové části metabotropního glutamátového receptoru (mGluR1) při dimerizaci. Tento receptor je homodimerní, patří také do třetí rodiny GPCRs a s GABAB receptorem sdílí sekvenční homologii. mGluR1 existuje v několika variantách vznikajících alternativním sestřihem mRNA. Jednotlivé varianty mají různě dlouhé *C*-konce. mGluR1a varianta (dlouhá) je lokalizována v dendritech a těle neuronu a mGluR1b (krátká) je lokalizována v axonu a těle. Některé studie popisují vliv alternací *C*-konce na funkční vlastnosti receptoru a také dimerizaci mGluR1 alternativních variant.

Abychom tuto problematiku mohli studovat, vytvořili jsme GABAB/mGlu1 receptorové mutanty, jejichž *N*-konec a transmembránové domény pochází z GB1 či GB2 podjednotky GABAB receptoru a *C*-koncové části odpovídají mGluR1a nebo mGluR1b. Sledovali jsme, jaký vliv má *C*-konec na dimerizaci receptoru, transport na buněčný povrch a na funkci dimerních receptorů. Naše výsledky naznačují, že samotný *C*-terminus mGlu1 receptoru neovlivňuje dimerizaci mGlu receptorů, alespoň v experimentech s transfekovanými HEK293 (human embryonic kidney) buňkami.

Sponzorováno GA ČR 301/00/0654, IGA MZ NF 6704-3/01.

PŘÍPRAVA REKOMBINANTNÍHO LIDSKÉHO ERYTROPOETINU V SAVČÍCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH A TRANSGENNÍCH ZVÍŘATECH

**J. KALANINOVÁ^a, L. ČERMÁKOVÁ^a,
M. MAREŠOVÁ^a, M. POPLŠTEJN^b,
D. KOŽELOUHOVÁ^a, T. MIKUS^{a,b}
a P. MALÝ^a**

^aOddělení savčího vývoje, ÚMG, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, ^bBiopharm VÚBVL, a.s.

Lidský erytropoetin (hEPO) je cytokín glykoproteinové povahy stimulující přeměnu pluripotentních zárodečných buňek v kostní dřeni na proerytroblasty, jejich další růst a dozrávání, syntézu hemoglobinu a uvolňování do krevního oběhu ve formě zralých erytrocytů.

Komplementární DNA (cDNA) lidského erythropoetinu získanou izolací z fágové cDNA knihovny jsme subklonování vpravili do plazmidových DNA vektorů. K překonání obtíží s izolací terapeutických proteinů z mléka transgenních zvířat ověřujeme metodu produkce histidinovou kotvou (6xHis) značených proteinů. Upravená sekvence pro 6xHis-EPO s modifikací na *N*-i *C*-konci molekuly byla vpravena do expresního vektoru pro produkci rekombinantního hEPO v savčích buňkách. Takto připravené savčí expresní vektory byly transfekovány elektroporací do COS-7 buněk. Z těchto savčích kultur byla provedena izolace produktů Ni-NTA technologií – technikou IMAC a test proliferacní aktivity.

Pro cílenou transgenní expresi 6xHis-modifikovaného hEPO v mléčné žláze králička jsme zkonstruovali „rekombinantní transgenní vektor“, nesoucí cDNA pro hEPO s 6xHis kotvou na *C*-konci, který se v současné době injektuje do králičích embryí.

Grant MPO ČR, reg. č. FB-C2/24, 1999–2001, grant MPO ČR, reg. č. FD-K/052, 2001–2003.

ACTIVATION OF LIPASE FROM *Geotrichum candidum* AND ITS ENANTIOSELECTIVITY TOWARDS XENOBIOTIC SUBSTRATES

**ZDENĚK KEJÍK^a, MARIE ZAREVÚCKA^b,
and KATEŘINA DEMNEROVÁ^a**

*^aInstitute of Chemical Technology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, ^bInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6
e-mail: zarevucka@uochb.cas.cz*

Convenient procedures were developed for stimulation of lipase activity with specificity towards natural polyunsaturated fatty acids. Four strains of *Geotrichum candidum* were tested during this study. Lipase activity was determined and proved in the used strains, and for majority of tested media. Olive oil was employed as activator for the determination of the lipase activity. Calculated differences in lipase activity

values were used as basis for optimizing of fermentation conditions. Majority of activated lipases represented extracellular lipases, which penetrated through cellular membrane into the medium containing activator. The activity of intracellular lipases was determined as well. To evaluate different media, that one containing peptone as nitrogen source was proved to be the best one of the tested series of media. The most remarkable growth of the cell biomass was also observed using this medium. The highest specific activity of all activated lipases was found in the second half of the period of exponential (log) phase cultures. These lipases were used as biocatalysts of the hydrolytic resolution of racemic *cis*- and *trans*-isomers of 2-(4-methoxybenzyl)cyclohexyl acetates¹. Enantiomeric purity and absolute configuration of the products, chiral isomers of 2-(4-methoxybenzyl)cyclohexanol, were studied. These lipases are also expected to be used for enrichment of polyunsaturated fatty acids, especially α -linolenic and γ -linolenic acid, in different fractions obtained by enzyme-mediated hydrolysis of blackcurrant oil.

The authors thank Ministry of Education of the Czech Republic for financial support of this research through the COST D13.10 project, a part of the COST D13/0014/01 network.

REFERENCES

- Zarevúcka M., Žalská Z., Rejzek M., Streinz L., Wimmer Z., Macková M., Demmerová K.: Enzyme Microbiol. Technol. 17, 866 (1995).

AKUMULACE RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH ANALOGŮ SOMATOSTATINU V LEDVINÁCH POTKANA

M. KOPECKÝ^a, P. NACHTIGAL^a, V. SEMECKÝ^a, A. LÁZNÍČKOVÁ^b, M. LÁZNÍČEK^c, F. TREJTNAR^c a C. DECRISTOFORO^d

^aKatedra biologických a lékařských věd, ^bKatedra biofyziky a fyzikální chemie a ^cKatedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Karlova univerzita v Praze, ^dDepartment of Nuclear Medicine, University Hospital Innsbruck, Austria

Radioaktivně značené analogy somatostatinu používají k diagnostice a léčbě některých neuroendokrinních nádorů (např. karcinoidů). Akumulace v ledvinách a případná nefrotoxicita limituje jejich širší využití v humánní medicíně. Předpokládá se, že tyto peptidy jsou kumulovány v proximálních tubulech ledvin mechanismem tubulární reabsorpce. Cílem této práce bylo přispět k objasnění mechanismů jejich zádrže v ledvinách.

V průběhu experimentu byly zkoumány distribuční a eliminační charakteristiky 99mTc -oktreetidu a 99mTc -EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreetidu po i.v. podání potkanům kmene Wistar. 99mTc -oktreetid byl pouze minimálně zadržován v ledvinách a do moči bylo během 48 hodin vyloučeno 15 % podané dávky. 99mTc -EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreetid byl vylučován převážně močí (více než 75 % podané dávky) a byl silně

kumulován v ledvinách i 48 hodin po podání. V modelu perfuze izolované ledviny byla renální clearance 99mTc -oktreetidu třikrát menší než clearance 99mTc -EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreetidu. Mikroautoradiografická analýza 99mTc -oktreetidu ukázala, že tento peptid byl přítomen v glomerulárních kapilárách a v cévách mezi ledvinnými tubuly. Naproti tomu 99mTc -EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreetid byl detegován převážně v ledvinné dřeni v buňkách sběracích kanálků a v okolní intersticiální tkáni, slabá pozitivita byla pozorována v proximálních a distálních tubulech. Pomocí *in vitro* autoradiografie byla v ledvinné tkáni prokázána přítomnost somatostatinových receptorů.

Předpokládáme, že rozdílná distribuce a eliminace těchto peptidů souvisí s jejich odlišnými fyzikálními vlastnostmi a jejich rozdílnou afinitou k somatostatinovým receptorům. 99mTc -oktreetid je v porovnání s 99mTc -EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreetidem lipofilnější, je vylučován převážně přes gastrointestinální trakt a navíc přímé značení 99mTc vede ke snížení affinity k somatostatinovým receptorům. 99mTc -EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreetid reprezentuje skupinu somatostatinových analogů, které jsou převážně vylučovány močí. Má vysokou afinitu k somatostatinovým receptorům. Mechanismus retence 99mTc -EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreetidu v ledvinách nelze vysvětlit pouze jako důsledek tubulární reabsorpce peptidu v proximálních tubulech ledviny, ale vzhledem ke kumulaci 99mTc -EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreetidu v ledvinné dřeni předpokládáme, že se na akumulaci těchto látek v ledvinách podílejí také další mechanismy. Svoji roli během vychytávání 99mTc -EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreetidu mohou hrát somatostatinové receptory, které jsou přítomny ve sběracích kanálcích ve dřeni ledvin.

Tato práce vznikla za podpory GA UK (č. 159/2001) a MŠMT (č. 11600002).

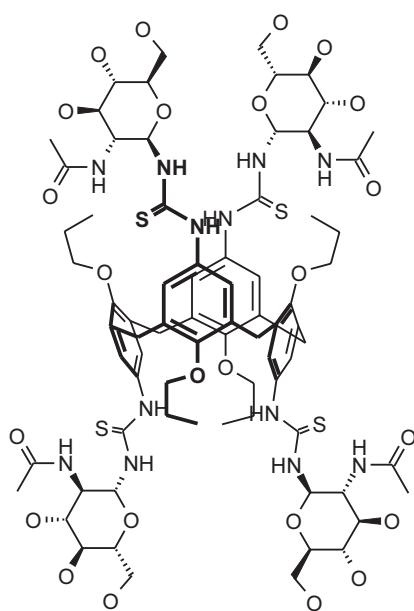
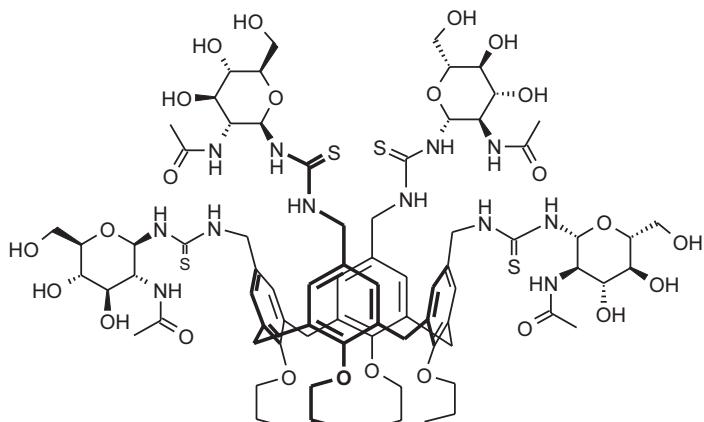
GLYKOMIMETIKA NA BÁZI CALIX[4]ARENŮ

KAREL KŘENEK^{a,b}, K. VÁCLAVÍKOVÁ^b, VLADIMÍR KŘEN^a a IVAN STIBOR^b

^aLaboratoř biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^bÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Calix[n]areny spolu s porfyry, cyclodextriny, crown ethery a kryptandy patří v poslední době mezi nejběžnější molekuly používané ke konstrukci supramolekulárních systémů, které mají zajímavé fyzikálně chemické i biologické vlastnosti.

Deriváty *N*-acetamido-2-deoxy- β -D-hexopyranos mají vysokou afinitu k aktivačnímu receptoru krysích, příp. lidských lymfocytů, NK buněk (NKR-P1 receptory). Po otestování aktivity monosacharidických ligandů jsme přistoupili k syntéze polyvalentních molekul na bázi glykokonjugátů a glycodendrimerů, které se vyznačují o několik růd výššími aktivitami než samotné nízkomolekulární ligandy. Příprava těchto látek je předurčena faktorem, že aktivační receptor NK-buněk má dvě aktivní místa, a proto k dosažení vyšší affinity je vhodné připravit polyvalentní sacharidické deriváty. Lipo-



filní calixaren by měl zajistit silnou interakci s membránou cílových buněk.

Hlavní náplní této práce je syntéza neoglykokonjugátů calix[4]arenů s *N*-acetamido-2-deoxy- β -D-glukózou. Možnost volby konformace calixarenu umožňuje volbu různého uspořádání vazebních míst cukerných substituentů. Substitucí spodního okraje calixarenového skeletu a změnou spaceru spojujícího cukr s calixarem můžeme regulovat rigiditu celé molekuly a tak změnit afinitu glykokonjugátu k receptoru NK-buněk.

Práce byla podpořena granty GA ČR 203/01/1018 a VZMBÚ č. AV025020903.

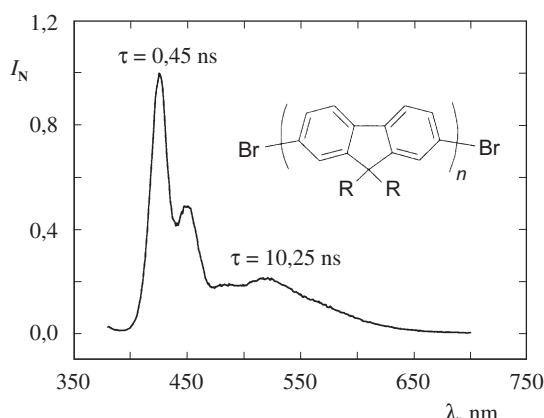
SYNTÉZA A STUDIUM LUMINISCENČNÍCH VLASTNOSTÍ NOVÝCH MATERIÁLŮ NA BÁZI FLUORENU

STANISLAV KUKLA

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

Elektroluminiscenční polymerní materiály se během posledních deseti let dostaly do popředí zájmu organických chemiků i fyziků. Z celé řady konjugovaných polymerů se jako velmi slibná skupina materiálů z hlediska odolnosti vůči chemické a termické degradaci jeví polyfluoreny (PF). Jejich nevýhodou je agregace řetězců v pevné fázi a vznik excimerové emise, která nepříznivě ovlivňuje optické charakteristiky a životnost polymerních světlo emitujících diod (PLED).

Dvoustupňovou syntézou byly připraveny 9,9-dialkyl-2,7-dibromofluoreny ($R = C_{10}H_{21}, C_{16}H_{33}, C_{22}H_{45}$), jejichž polymerizace (Yamamotova aryl-aryl coupling reakce katalyzovaná komplexem niklu) poskytla dobré charakterizované oligomerní PF. Různé stupně polymerizace, stanovené metodou SEC, byly vysvětleny na základě vlivu délky alkylových substituentů na průběh reakce. Pro ověření struktury monomerů i PF byly použity standardní metody strukturní analýzy: EA, IČ, ^1H NMR a LR-COSY (^1H - ^1H) spektroskopie.



Obr. 1. Fotoluminiscenční emisní spektrum PF ve filmu; I_N – normalizovaná intenzita

PF mají podél hlavního řetězce *p*-konjugovaný systém elektronů, jemuž vděčí za zajímavé optoelektronické vlastnosti. Nalezené kvantové výtěžky modré emise (maximum 415 nm, doba života 0,45 ns, 3 vibrační pásy) PF v roztoku THF se pohybovaly v rozmezí 0,82–0,97. Luminiscenční měření (obr. 1) ve filmu naneseném na křemenné sklo rotačním nanášením z roztoku toluenu (koncentrace 15 mg.ml⁻¹, 800 ot.min⁻¹) prokázala, že delší alkylové postranní řetězce brání agregaci řetězců PF v pevné fázi a tím i vzniku excimerové emise (maximum 520 nm, doba života 10 ns, široký pás). Elektroluminiscence byla měřena na PLED s jednou polymerní vrstvou (struktura ITO/PF/Al) a její externí kvantový výtěžek byl 0,01 %.

NOVÝ TYP KAPALNÝCH KRYSТАLŮ S BENZOTHOФENOVÝM JÁДREM

MILAN KURFÜRST^a, JIŘÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b, MILADA GLOGAROVÁ^b a PŘEMYSL VANĚK^b

^aÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bFyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
e-mail: milan.kurfurst@vscht.cz, jiri.svoboda@vscht.cz

Organické kapalné krystaly jsou známy již více než sto let, většího významu však dosáhly až v posledních třiceti letech. Jejich využití zahrnuje široké spektrum aplikací, především v zobrazovacích jednotkách a v elektronických prvcích.



Schéma 1

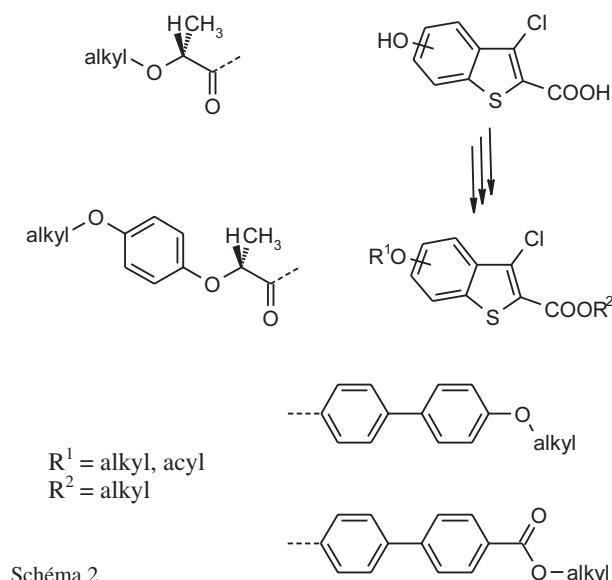


Schéma 2

V rámci našeho systematického výzkumu v oblasti syntézy a materiálového využití benzokondenzovaných heterocyclů jsme se zaměřili na přípravu potenciálních kapalných krystalů obsahujících benzothiophenový systém jako centrální jednotku a studium jejich vlastností.

Byla syntetizována 5-hydroxy- a 6-hydroxybenzo[b]thiophen-2-karboxylová kyselina nesoucí atom chloru jakožto laterální substituent v poloze 3 (schéma 1)

S použitím vhodných chránících skupin byla heterocyclická jádra dále derivativizována připojením alkylového nebo acylového řetězce, vložením chirálního prvku a prodloužením jádra o bifenylové uskupení (schéma 2).

Syntetizovali jsme tak sérii látek s různými postranními řetězci a sledovali jejich fyzikální vlastnosti. Měření ukázala výskyt různých mesofází, především pak žádané feroelektrické SmC fáze.

Projekt výzkumu byl podporován granty GA ČR č. 106/00/0582 a 202/02/0840.

DETEKCE CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ U NEMOCNÝCH S LEUKÉMIAMI METODOU KOMPARATIVNÍ GENOMOVÉ HYBRIDIZACE

Š. KURKOVÁ^a, J. BŘEZINOVÁ^a, Z. ZEMANOVÁ^b, L. ŠINDELÁŘOVÁ^b, B. RYPÁČKOVÁ^c a K. MICHALOVÁ^{a,b}

^aÚstav hematologie a krevní transfuze, ^bCentrum nádorové cytogenetiky ÚKBLD, VFN a I. LF UK, ^cI. interní klinika VFN a I. LF UK, Praha
e-mail: kurkova@uhkt.cz

Nízká proliferační schopnost *in vitro* limituje u nádorových buněk úspěšnost konvenční cytogenetické analýzy. Toto vyšetření proto doplňujeme molekulárně-cytogenetickými metodami, tj. různými modifikacemi fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), ke kterým patří i komparativní genomová hybridizace (CGH). Metoda CGH deteguje změny v počtu DNA sekvencí mezi nádorovou DNA a kontrolní DNA. DNA izolovanou z nádorových buněk značíme pomocí fluorochromu Spectrum Green a kontrolní DNA je značena Spectrum Red. Obě DNA kohybridizují k normálním metafázním chromozomům. Hybridizace je detegována ve fluorescenčním mikroskopu a pomocí speciálního softwaru je následně intenzita jednotlivých fluorochromů. Na základě změny poměru intenzit obou fluorescenčních signálů program určí oblasti zmnožení nebo ztráty DNA sekvencí ve smyslu amplifikace nebo delece. Příslušná místa změn se projeví změnou barvy homologních chromozomů (amplifikace zeleně, delece červeně).

Na našem pracovišti používáme tuto metodu k vyšetření nemocných s chronickou lymfatickou leukémií (CLL), akutní myeloidní leukémií (AML) a u nemocných s myelodysplastickým syndromem (MDS). U všech těchto pacientů provádíme klasickou cytogenetickou analýzu buněk kostní dřeně a FISH. Z 11 nemocných s CLL jsme u 7 potvrdili metodou CGH normální karyotyp. U dvou nemocných jsme pomocí CGH ověřili přítomnost již dříve nalezených chromozomo-

vých změn. U dalších dvou pacientů s normálním cytogenetickým nálezem potvrzeným i metodou FISH, jsme pomocí CGH nalezli submikroskopickou chromozomovou aberaci: duplikaci 2p [dup(2p)] u jednoho a deleci 19q [del(19q)] u druhého nemocného. U pacienta s MDS, u kterého jsme při klasickém cytogenetickém vyšetření nalezli rozsáhlé změny karyotypu, jsme pomocí FISH, mnohobarevné FISH (mFISH) a CGH potvrdili komplexní karyotyp: 46,XY,-5, del(7),+8, der(12)t(5;12).

Metoda CGH umožnuje určit amplifikaci a deleci DNA v buňkách. Nelze jí ale použít pro detekci balancovaných změn nebo přestaveb přítomných pouze v malém buněčném klonu. Proto jen vhodnou kombinací molekulárně-cytogenetických metod, tj. FISH, interfázické FISH (I-FISH), mFISH a CGH, které doplňují klasickou cytogenetickou analýzu, lze přesně detegovat všechny chromozomové aberace v nádorových buňkách.

Tato studie je podpořena granty: NC 6470-3, GA ČR 301/01/0200, CEZ:J/13/98 1111 0000 4 MŠMT ČR.

plasmidových vektorů s genem KHA1 za různě silnými promotory. Těmito vektory jsme transformovali kmeny Dkh1. Podle dosavadních výsledků se ovšem zdá, že fenotyp delečních mutantů popsaný v originální publikaci možná nebyl způsoben pouze deleci KHA1. Dále jsme pozorovali lokalizaci proteinu Kha1 značeného fluorescenčním proteinem GFP v buňkách. Gen z mnohokopiových vektorů je exprimován ve velké míře a následně lokalizován ve většině buněčných membrán. Pro určení lokalizace za přirozených podmínek bude nutno snížit množství syntetizovaného proteinu, nejlépe expresí z centromerového vektoru.

Kmeny s disruptovanými vlastními geny pro přenašeče draslíku jsou zároveň vhodnými nástroji pro charakterizaci obdobných proteinů u vyšších eukaryot. V blízké budoucnosti se chystáme transformovat kvasinky knihovnou cDNA živočišných buněk. Podaří-li se selektovat klony s funkčním živočišným přenašečem pro draslík, umožní to jeho studium mikrobiologickými a molekulárně biologickými metodami za přísně regulovaných podmínek bez potřeby živočišných tkáňových kultur.

TRANSPORTNÍ SYSTÉMY PRO DRASLÍK V *Saccharomyces cerevisiae*

LYDIE MAREŠOVÁ a HANA SYCHROVÁ

Oddělení membránového transportu, Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: lydie@biomed.cas.cz

Transport substrátu přes biologickou membránu je proces potřebný v mnoha životních funkcích buněk – od příslunu živin přes regulaci koncentrace metabolitů a homeostáze iontů až k vylučování toxicických komponent z cytoplazmy. Zvláště u jednobuněčných organismů je životně důležité, aby buňka byla schopna aktivně regulovat výměnu látek s okolním prostředím. Jako modelový organismus pro studium membránových přenašečů byla zvolena kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, hlavně díky krátké generační době, nenáročné kultivaci, kompletně osekvenovanému genomu a dostupnosti různých mutantních kmenů.

V posledních letech byly popsány mnohé transportní systémy této kvasinky. Předpokládá se, že počet proteinů účastnících se na transportu malých molekul přes membrány je asi 320, tj. 6 % proteomu. Funkce některých z nich byla ovšem pouze předpovězena na základě sekvenční podobnosti s transportérem již dříve charakterizovaným. Takové systémy je potom třeba dodatečně funkčně charakterizovat.

Příkladem transportního proteinu s předpovězenou funkcí na základě sekvence genu je Kha1p. Vykazuje podobnost s transportními systémy pro antiport alkalickej kationtů proti protonům v *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis* a *Escherichia coli*. Díky známé sekvenci mohl být gen disruptován homologickou rekombinací. Porovnání fenotypu mutantního kmene s rodičovským byla pak navržena funkce, tedy antiport K⁺ (z buněk ven) proti protonům (do buněk).

Správnost této hypotézy je ovšem nutno potvrdit zpětným vnesením genu KHA1 ve vhodném vektoru do buněk postrádajících gen vlastní. Součástí naší práce je tedy konstrukce

COMPARATIVE GENOMICS OF PATHOGENIC *Treponema pallidum* SUBSPECIES

PETRA MATĚJKOVÁ^a, DAVID ŠMAJS^a,
STEVEN J. NORRIS^b,
and GEORGE M. WEINSTOCK^c

^a*Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Joštova 10, 662 43 Brno,* ^b*Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Texas, Houston Medical School, 6431 Fannin Street, Houston TX 77030,*

^c*Human Genome Sequencing Centre, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Alkek N1519, Houston, TX 77030, USA*

Spirochaetal genus *Treponema* includes several pathogenic spirochetes (e.g. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* is the causative agent of syphilis, *T. pallidum* subsp. *pertenue* causes yaws). Recent serological tests are negative in early stages of treponemal infection and cannot distinguish between syphilis and yaws. The complete genome sequence, construction of a microarray chip with all 1039 predicted ORF PCR products, together with the findings that there is a high degree of sequence homology among pathogenic treponemes, enables comparative genomic analyses based on DNA-microarray techniques. Identification of chromosomal sequences specific for these pathogens can be used for selective PCR diagnostics of treponemal diseases. DNA of *T. pallidum* subsp. *pallidum* Nichols strain was compared to DNA isolated from three different strains of *T. pallidum* subsp. *pertenue* (strain Gauthier, Samoan D, CDC-2). As a result of DNA microarray comparisons, 26 genes (10 with stronger and 8 with weaker signal in pertenue strains and 8 control genes with similar signal in both subspecies examined) were selected and sequenced. Altogether, 23879 nucleotides (2.1 % of the genome) were sequenced in 3 pertenue strains and control Nichols. No region of extensive sequence heterogeneity was detected. However, 15 different single nucleotide polymorphisms (SNPs)

were identified: 3 SNPs in Gauthier strain, 13 in Samoan D and 14 SNPs in CDC-2. Ten (out of 15) SNPs cause amino acid changes. SNPs common for all pertenue strains as well as SNPs specific for each individual strain will allow to use these nucleotide polymorphisms to design sequence-specific PCR diagnostics of these strains.

VLIV TYPU MATRICE A MNOŽSTVÍ CHELATUJÍCÍCH SKUPIN V PSEUDOAFINITNÍ CHROMATOGRAFII NA IMOBILIZOVANÝCH KATIONTECH KOVŮ (IMAC)

**KATERŘINA MÉSZÁROSOVÁ^{a,b},
GALINA TIŠČENKO^a a MIROSLAV BLEHA^a**

^aÚstav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6, ^bFakulta přírodrově-decká, Karlova univerzita, Albertov 6, 120 00 Praha 2

Nové sorbenty pro pseudoafinitní chromatografii na immobilizovaných kationtech kovů (IMAC) byly připraveny z terpolymerních prekurzorů kovalentním připojením chelatující skupiny – kyseliny iminodiocetové (IDA). Bylo stanoveno množství navázaných chelatujících skupin a porovnáno s množstvím chelatovaných kationtů Ni^{2+} a Cu^{2+} . Byl sledován vliv porozity částic na kapacitu sorbentů při přímé modifikaci kyselinou iminodiocetovou a při nepřímé modifikaci esterem IDA s následnou hydrolyzou.

Terpolymerní prekurzory ve formě kulovitých částic velikosti 100–250 μm s rozdílnou porozitou byly připraveny z monomerů glycidyl-methakrylátu (GMA), diethylen-methakrylátu (DEGMA) a ethylen-dimethakrylátu (EDMA) suspenzní radikálovou polymerizací.

Na nikelnatých komplexech připravených sorbentů byla metodou frontální chromatografie studována přístupnost komplexů pro interakci s imidazolem, analogem histidinu, který je nejvíce zodpovědný za tvorbu koordinační vazby immobilizovaného kovu s bílkovinou.

Porovnáním frontálních chromatografických křivek byla vyhodnocena schopnost sorbentů tvořit koordinační vazby s dusíkovým atomem imidazolového kruhu a byly analyzovány kinetické vlastnosti sorbentů z dynamických podmínek. Teoretické závěry byly prakticky ověřeny studiem affinity specifického imunoglobulinu, IgG1 proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu, k připraveným sorbentům.

STUDY OF THE SPECIFICITY OF DIFFERENT ACYL-CoA OXIDASES OF THE YEAST *Yarrowia lipolytica* expressed IN *E. coli* AND *Yarrowia lipolytica*

KATERŘINA MLÍČKOVÁ

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 11, 78 371 Olomouc

Due to its ability to produce different metabolites such as citrate, and to secrete numerous proteins, the yeast *Yarrowia*

lipolytica has been used in industrial processes. It is also able to grow on and degrade alkanes and to use fatty acids as carbon sources, which makes it a promising tool for biotechnological uses. Its capacity to degrade oils of different origins makes it a potential de-polluting agent. The degradation products often serve as precursors of aromatic compounds (γ -decalactone with peach flavor).

Degradation of alkanes involves three enzymatic steps in endoplasmic reticulum to produce a fatty acid. Similarly, degradation of triglycerides is performed by secreted lipases which release the corresponding fatty acids, which are then metabolized via β -oxidation.

The initial step of peroxisomal β -oxidation is catalyzed by the acyl-CoA oxidases (Aoxs) encoded by the POX genes. *Y. lipolytica* POX set is the most complex among the yeasts studied to date, as it comprises five different genes encoding Aoxs.

Functions of different acyl-CoA oxidases have been investigated by successive gene disruptions (construction of mono-, bi-, tri- and tetradisruptants). These genes encode for proteins exhibiting different specificities with respect to the chain lengths of the acyl-CoA substrates. Aox3p and Aox2p from *Y. lipolytica* were bacterially expressed, purified and their activity as a function of substrate chain length was established. Using DNA shuffling techniques, we have also constructed chimeras between Aox2p and Aox3p which are exhibiting activity with a broad spectrum of substrates, according to the chain length. However, a precise knowledge of the kinetic properties of the different acyl-CoA oxidases is still lacking.

Eleven acyl-CoA oxidase chimeras (11 different yeast strains) were grown on medium containing oleic acid as a sole carbon source (concentrations of OA varied from 0,1–5 %). Two different growth trends were distinguished (by OD600 and dry weight biomass determination). Cellular, medium and surface lipid composition during the growth was analyzed using hexane or chloroform-methanol extractions, TLC, GS and MS methods.

Formations of lipid bodies and peroxisomes in different strains were stained using fluorescent and electron microscopy methods (fluorescent microscopy: Olympus BX 51, program Photometrics CoolSNAP) Nile red (Sigma N3013), D3832 and D3922 (Mol. Probe) were used as fluorescent colors for lipid bodies visualization.

For peroxisome staining, anti-Aox3p primary antibody recognizing acyl-CoA oxidases in peroxisomes was developed in rabbit. ALEXA 488 and Texas Red Dye served as secondary fluorescent antibodies. Different strains were compared concerning to formation of lipid bodies and number of peroxisomes during the growth (certain time intervals).

For visual determination by scanning and transmission electron microscopy, yeast cells were fixed by glutaraldehyde and post-fixed by imidazole buffered osmium tetroxide. Oil droplets and specific transport structures – protrusions – were identified on the cell surface. Lipid bodies and peroxisomes were visible inside cells. Increasing size of lipid bodies correlated with biomass increase.

**SYNTÉZA A CHARAKTERIZACE
POLYPYRROLOVÉHO FILMU
NA PERFLUOROVANÉ SULFONOVANÉ
MEMBRÁNĚ TYPU NAFION**

SABINA MORAVCOVÁ a KAREL BOUZEK

Ústav anorganické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Již více než dvě desetiletí jsou systematicky studovány látky se zpracovatelskými vlastnostmi polymerů a elektrickými vlastnostmi typickými pro polovodiče a kovy. Tyto látky jsou označovány jako vodivé polymery (CP). Jsou charakteristické tím, že na rozdíl od ostatních polymerů vykazují v oxi-dovaném stavu vysokou elektrosvitost. Do této skupiny látek patří např. polyacetylen, polythiofen, polyfenylen a z našeho hlediska nejzajímavější polyanilin (PAni) a polypyrrrol (PPy). Posledně jmenovaným polymerem jsme se zabývali v rámci předkládané práce. Důvodem volby tohoto polymeru je jeho dobrá chemická a mechanická stabilita, vysoká elektrosvitost a snadná elektrochemická syntéza kompaktních filmů z vodného roztoku monomeru.

Jednu z perspektivních aplikací CP představuje konstrukce nového typu elektrod pro nízkoteplotní palivový článek typu PEM (Proton Exchange Membrane). Zde CP slouží jako nosič katalyzátoru. Výhodou tohoto materiálu je schopnost vést paralelně elektrony i ionty. To zvyšuje pravděpodobnost vzniku tzv. trojfázového kontaktu nezbytného pro uskutečnění požadované elektrodrové reakce a vede tak ke zvýšení stupně využití katalyzátoru. Další významný argument představuje fakt, že interakce částic platinového katalyzátoru s CP vede ke vzniku kompozitu, jehož odolnost proti katalytické otravě oxidem uhelnatým je vyšší než u klasického platinového katalyzátoru na uhlíkovém nosiči. Rovněž tento jev vede ke snížení množství katalyzátoru nezbytného k dosažení potřebného výkonu palivového článku a tím ke snížení jeho výrobní ceny.

Práce dosud publikované na toto téma v odborné literatuře se zabývají především problematikou charakterizace elektrokatalytické aktivity kompozitů připravených z různých materiálů a za použití různých způsobů modifikace CP filmu katalyzátorem. Z téhoto studií však nevyplývá, zda a jakým způsobem lze připravit elektrokatalyticky aktivní tzv. Membrane-Electrode-Assembly (MEA), neboli vlastní palivový článek sestávající z elektrolytu ve formě funkcionalizované polymerní membrány s elektrodami připevněnými iontově vodivým kontaktem na jejích stranách. Klasické techniky lisování za horka, popř. naprašování katalyzátoru s nosičem nelze v tomto případě použít. Rovněž elektrochemická syntéza CP filmu přímo na povrchu membrány nepřípadá v úvahu, neboť tato membrána není elektronově vodivá. Cílem předkládané studie bylo připravit systém CP-PEM-CP, tedy anoda-elektrolyt-katoda a charakterizovat výsledné kompozity.

Jako PEM byla použita membrána Nafion 117, která představuje materiál dosud nejrozšířenější při výrobě tohoto typu palivového článku. Polypyrrrolový film byl přímo na povrchu této membrány syntetizován chemicky s možností eventuálního elektrochemického dosyntetizování CP filmu požadova-

né tloušťky. Získané kompozity vykazují dobrou mechanickou stabilitu a elektrochemickou aktivitu. Charakterizovány byly jak pomocí klasických elektrochemických technik, tak s využitím elektronové mikroskopie, UV-VIS a FTIR spektroskopie. V rámci přednášky budou prezentovány získané údaje o struktuře kompozitu, kinetice růstu CP filmu na povrchu Nafionu, jeho elektrochemické aktivitě a možnostech modifikace platinovým katalyzátorem.

**MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ SENSITIZACE
NA ÚČINKY OPIOIDŮ U MYŠÍ
A PRŮKAZ ZMĚN HLADIN m-RNA
OPIOIDNÍCH RECEPTORŮ**

**V. MORAVEC, M. VOTAVA, J. SLÍVA,
E. ŽDÁRSKÝ a M. KRŠIAK**

Ústav farmakologie, 3. Lékařská fakulta, Karlova univerzita, Ruská 87, 100 00 Praha 10

Cílem naší práce bylo zjistit, zdali nelze vznik behaviorní a neurochemické sensitizace k účinkům morfinu ovlivnit chronickým podáváním memantinem (1-amino-3,5-dimethyl-adamantanu), NMDA nekompetitivního antagonisty, a fluoxetinem (SSRI) v době mezi ukončením chronického podávání morfinu a podáním provokující dávky.

Myši (ICR kmen, Velaz, Praha) byly léčeny morfinem ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) s fluoxetinem ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) či memantinem (10 a $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.). Kontrolní skupiny byly léčeny fyziologickým roztokem (i.p.) či morfinem ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) po dobu 10 dnů $1 \times$ denně (den 1 až 10). Provokující dávka morfinu ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) byla podána den po ukončení léčby memantinem a fluoxetinem (21. den) či 15 dnů po ukončení této léčby (36. den). Pro průkaz behavorální sensitizace byla sledována horizontální lokomoční aktivita (Ugo Basile Activity Cage 7531) 1 hodinu po aplikaci morfinu po dobu tří minut 1., 5., 10. a 20. den aplikace morfinu. A páté měření lokomoce 21. nebo 36. den po podání provokující dávky morfinu ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) či fyziologického roztoku skupinám kontrolním.

Po usmrcení (21. či 36. den) jsme provedli odběr mozkové tkáně v mezolimbické a prefrontální oblasti a izolovali celkové RNA. Pomocí RT-PCR v real time uspořádání (interkalační SYBRGreen varianta) jsme stanovovali změny genové exprese mRNA m a k opioidních receptorů.

Výsledky prokazují ovlivnění behavorální sensitizace memantinem, kterým odpovídají i změny hladin m-RNA v mozku.

VZ: J13/98:111200005.

STEREOSELEKTIVNÍ A REGIOSELEKTIVNÍ OXIDACE THIACALIX[4]ARENŮ

JIŘÍ MORÁVEK^a, PAVEL LHOTÁK^a,
IVAN STIBOR^a a JAN SYKORA^b

^aÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav chemických procesů, Akademie věd České republiky, Rozvojová 125, 165 02 Praha 6

e-mail: Jiri.Moravek@vscht.cz

Stereoselektivní a chemoselektivní oxidace můstkových atomů síry vede k zavedení sulfoxidových skupin na skelet thiocalix[4]arenu. Tato reakce bude demonstrována s využitím různě alkylovaných derivátů thiocalix[4]arenu (Me, Et, Pr, Benzyl, CH₂COOEt). Oxidace se provádí dusičnanem sodným v trifluorooctové kyselině za laboratorní teploty. Bude diskutována souvislost konformace výchozí látky se stereochemií vzniklého produktu.

Tetraacetát thiocalix[4]arenu v cone konformaci byl použit jako výchozí látka pro regio- a stereoselektivní oxidaci. Použitím různých oxidačních činidel byly připraveny odpo-

vídající sulfinyl (mono-, di-, tri-, tetra-) a tetrasulfonyl deriváty, které byly charakterizovány spektrálními metodami.

Některé nově připravené sloučeniny vykazují velmi zajímavé vlastnosti v pevném stavu. Rentgenová strukturní analýza 25,26,27,28-tetramethoxy-tetrasulfinylcalix[4]arenu ukazuje, že tato sloučenina vytváří nekonečné kanály, které drží pohromadě pomocí CH-p interakcí mezi methoxy skupinami a aromatickou kavitou sousední molekuly.

LITERATURA

- Iki N., Kumagai H., Morohashi N., Ejima K., Hasegawa M., Miyanari S., Miyano S.: Tetrahedron Lett. 39, 7559 (1998).
- Iki N., Narumi F., Fujimoto T., Morohashi N., Miyano S.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 1998, 2745.
- Lhoták P.: Tetrahedron 57, 4775 (2001).

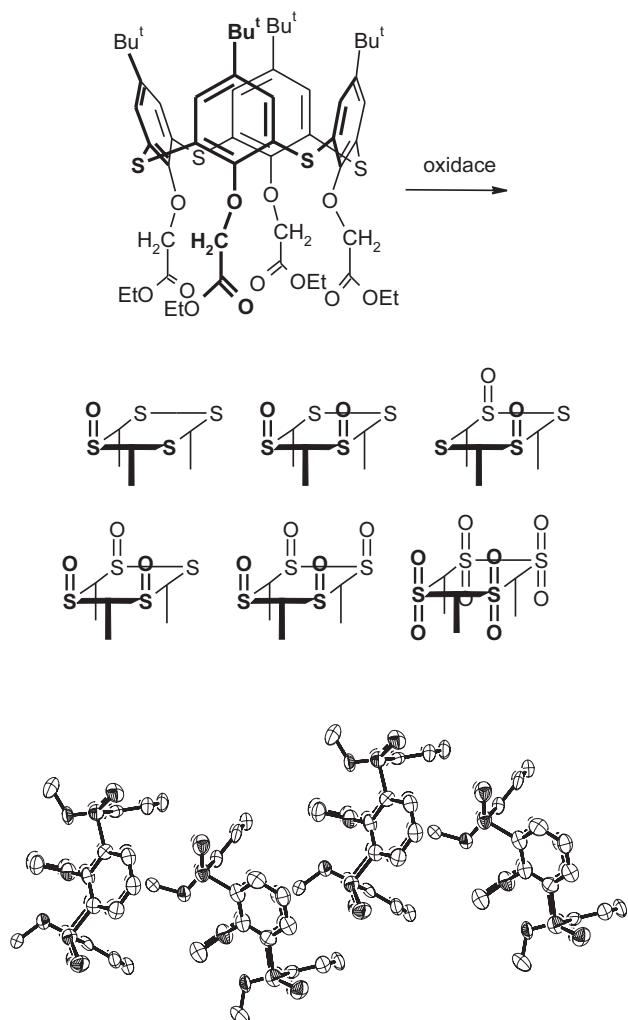
ISOLATION OF MONOCLONAL IMMUNOGLOBULIN FROM PLASMA OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA USING AFFINITY CHROMATOGRAPHY

R. MUSILOVÁ^{a,*}, E. TÁBORSKÁ^d, H. NOVOTNÁ^c,
L. BOURKOVÁ^a, L. KOVÁŘOVÁ^{a,b},
T. BUCHLER^{a,b}, M. PENKA^a, and R. HÁJEK^{a,b}

^aLaboratory of Experimental Hematology and Immunotherapy, Department of Clinical Hematology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 639 00 Brno, ^bDepartment of Internal Medicine – Hematooncology, ^cDepartment of Clinical Biochemistry, University Hospital, Brno, ^dDepartment of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno
e-mail: 20287@mail.muni.cz

Multiple myeloma is characterized by the proliferation of a malignant plasma cell clone and accounts for approximately 10 % of hematological malignancies. High-dose chemotherapy with autologous transplantation has improved the survival of patients with myeloma, however, relapse is inevitable¹. Recent research has targeted the minimal residual disease. One of the therapeutic options is of this setting is immunotherapy using specific tumor antigen as a vaccine. The idiotype of myeloma immunoglobulin (Id protein) that is specifically expressed by malignant cells can be used as a tumor antigen with the aim to induce cytotoxic T-lymphocyte response against myeloma cells^{2,3}.

For purification of Id protein, the plasma of relapsed IgG myeloma patients, who were before reinduction treatment, was precipitated with a saturated solution of ammonium sulphate. After precipitation and dialysis in saline at pH 7.3 to remove ammonium sulphate, the Id protein was separated on protein G immobilized on agarose. To break the bond between the Id-protein and the protein G, 0.2 M glycine (pH 2.7) was used and resulting fractions were immediately neutralized in 1 M Tris-base. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was used to determine the purity of Id protein. The isolation was carried out from plasma of 10 patients. Columns with the capacity of 30 mg.ml⁻¹ protein G and the flow rate of 1–2 drops per 10 seconds were used. The yield of Id protein ranged from



22 to 89 % of the amount applied on the column. The amount of Id protein extracted in each isolation was sufficient to a prepare Id-KLH conjugate that was used as the specific antigen in preclinical experiments.

This project was supported by the Grants IGF FNB 4/99 and IGA MZČR 6763-3 and MZČR 000 65 26 97 05.

REFERENCES

1. Hájek R., Vášová I., Adam Z., Mayer J.: Acta Med. Austriaca 23, 91 (1996).
2. Kwak L. W., Taub D. D., Duffey P. L., Bensinger W. I., Bryant E. M. et al.: Lancet 345, 1016 (1995).
3. Österborg A., Yi Q., Henriksson L., Fagerberg J., Bergendrant S.: Blood 91, 2459 (1998).

VYUŽITÍ STEREOLOGICKÝCH METOD PRO KVANTITATIVNÍ ANALÝZU ATEROSKLEROTICKÝCH LÉZÍ VE STĚNĚ CÉVY U EXPERIMENTÁLNÍHO MODELU KRÁLÍKA

P. NACHTIGAL^a, V. SEMECKÝ^a, M. KOPECKÝ^a,
A. GOJOVÁ^a, D. SOLICOVÁ^b a P. ŽDÁNSKÝ^b

^aKatedra lékařských a biologických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, ^bKlinika gerontologická a metabolická, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Karlova univerzita v Praze

Ateroskleróza je chronické systémové zánětlivé onemocnění, charakterizované endoteliální dysfunkcí s následnou kumulací lipidů, leukocytů, hladkosvalových elementů a extracelulární matrix v intimě cév, což má za následek zužování cévního lumen s následnou redukcí až obstrukcí cévního průtoku. Morfometrická kvantifikace aterogenních změn je dnes často používána k objektivnímu popisu aterosklerotických lézí u experimentálních zvířat i lidí. Stereologie zahrnuje soubor metod, které se používají ke kvantifikaci dvojrozměrných a trojrozměrných struktur pomocí řezů, či projekcí. Stereo logické metody je mimo jiné možno využít pro odhad celkového objemu objektu, plochy povrchu objektu, délky lineárních útvarů a počtu částic.

Jako experimentální model byl v této práci zvolen králič kmene Novozélandský bílý. K indukci aterogenních změn byla použita standardní dieta obohacená o 0,4 % cholesterolu, která byla podávána zvířatům po různě dlouhou dobu (1–3 měsíce). K detekci makrofágů, hladkosvalových buněk a adhezivních molekul VCAM-1, ICAM-1 byly použity imunohistochemické metody. Pomocí stereologických metod bylo poté hodnoceno několik parametrů, které charakterizují aterogenní proces. Patří mezi ně objem aterosklerotických lézí, procentuální zastoupení makrofágů a hladkosvalových buněk v lézi a celková plocha exprese VCAM-1 a ICAM-1 ve stěně cévy (intima a medie).

Biochemické vyšetření potvrdilo indukci hypercholesterolemie u experimentální skupiny zvířat. Stereologický odhad objemu aterosklerotické léze pomocí Cavalieriho metody prokázal zvyšování objemu v závislosti na délce aterogenní die ty. Imunohistochemické metody potvrzily detekci makrofágů

a hladkosvalových buněk VCAM-1 a ICAM-1 v intimě cév pouze u experimentální skupiny zvířat. Stereologická analýza prokázala větší procentuální zastoupení makrofágů v lézi vůči hladkosvalovým buňkám. Dále bylo prokázáno, že exprese VCAM-1 a ICAM-1 roste v závislosti na délce diety a že je lokalizována především v oblasti aterosklerotického plátu.

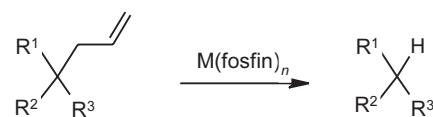
Výsledky biochemické, imunohistochemické a stereologické analýzy dle očekávání potvrdily indukci aterogenních změn u jedinců, kterým byla podávána dieta s obsahem 0,4 % cholesterolu. Práce ale především poukázala na výhodnost použití stereologických metod pro kvantifikaci velikosti aterosklerotických lézí a pro kvantifikaci imunohistochemických barvení. V současnosti probíhá studie, která využívá výše uvedených metod ke sledování vlivu vybraných farmak ze skupiny statinů na aterogenní procesy ve stěně cévy.

ŠTĚPENÍ γ,δ -C-C VAZBY TERMINÁLNÍCH ALKENŮ

DAVID NEČAS a MARTIN KOTORA

Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, Hlavova 6, 128 43 Praha 2
e-mail: david.necas@seznam.cz

Reakcí alkenů s komplexy různých přechodných kovů dochází většinou k tvorbě vazeb C–kov, které pak reagují dále za vzniku jedné či více nových C–C vazeb. Typickým příkladem jsou např. cyklizace dienů¹, polymerace² atd. Opačný proces, tj. degradace alkenů na menší celky, není příliš znám. Tento jev totiž vyžaduje, aby při reakci docházelo k aktivaci a štěpení C–C vazeb. Štěpení C–C vazeb pomocí komplexů přechodných kovů je sice známá reakce, ale probíhá většinou pouze s látkami se silným sterickým prutím, kde je hnací silou snížení tohoto prutí. Štěpení alicyklických olefinů je spíše chemická rarita³.



Tato práce vychází z předešlého studia cyklizací 2-chloro- α,ω -dienů, při které jsme zjistili, že volbou vhodně substituovaných alkenů a za určitých podmínek nedochází k cyklizaci na deriváty cyklopentanu (tvorba nové C–C vazby), ale ke štěpení γ,δ -vazby výchozího dienu. Výsledná látka přitom ztratila tříuhlíkatý fragment a proto formálně došlo k deallylacii. Tento jev byl podrobén zkoumání na dalších vhodně substituovaných terminálních alkenech za použití komplexů různých přechodných kovů. V příspěvku bude diskutován vliv přechodného kovu a substituce ve výchozích látkách na průběh reakce, pravděpodobný reakční mechanismus a potenciální syntetické využití.

LITERATURA

1. (a) Knight K. S., Waymouth R. M.: J. Am. Chem. Soc.

- 113, 6268 (1991); (b) Yamamoto Y., Ohkoshi N., Kameda M., Itoh K.: J. Org. Chem. 64, 2178 (1999).
2. Chen E. Y. X., Marks T.: J. Chem. Rew. 100, 1391 (2000).
 3. Yamazaki T., Kasatkin A., Kawanaka Y., Sato F.: J. Org. Chem. 61, 2266 (1996).

STANOVENÍ CYTOKININŮ V ROSTLINÁCH METODOU IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRAFIE A KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

**ONDŘEJ NOVÁK, PETR TARKOWSKI,
DANUŠE TARKOWSKÁ, KAREL DOLEŽÁL,
RENÉ LENOBEL a MIROSLAV STRNAD**

Laboratoř růstových regulátorů, Palackého univerzita a Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

Pro stanovení většiny přirozeně se vyskytujících isoprenoidních a aromatických cytokininů v rostlinách jsme vyvinuli novou citlivou metodu. Jejím základem je kvalitní chromatografická separace 20 rostlinných hormonů – cytokininů (báze, ribosidy a 9-glukosidy) na reverzní fázi ve spojení s hmotnostní detekcí na jednoduchém kvadrupolu (HPLC/MS), za podmínek ionizace elektrosprejem. Pro stanovení O-glukosidů a nukleotidů cytokininů lze tuto metodu rovněž s úspěchem použít po předchozím enzymovém ošetření rostlinných extraktů.

Tok mobilní fáze byl dělen za chromatografickou kolonou v poměru 1:1 a současně měřen na detektoru diodového pole a hmotnostním detektorem. Pro stanovení cytokininů byly hledány vhodné podmínky – optimální průtok mobilní fáze, desolvační teplota, průtok desolvačního plynu, nejvhodnější napětí na kapiláře elektrospreje a optimální napětí na vstupní šterbině hmotnostního detektoru pro účinnou ionizaci analytů v iontovém zdroji. Sledované cytokininy byly monitorovány na hlavním molekulovém píku $[M+H]^+$ při použití nízkého napětí na vstupní šterbině (20 V) v režimu sledování vybraného iontu, tzv. selektivní iontový monitoring (SIM). Při splnění těchto podmínek jsme dosáhli limit detekce v rozmezí 10–50 fmol.

Pro běžnou laboratorní praxi byl ověřen optimální lineární rozsah kalibrace 25(75) fmol–100 pmol při kvantifikaci přirozeně se vyskytujících isoprenoidních a aromatických cytokininů v přečištěných extraktech tabákových kultur BY-2 a v topolových listech (*Populus × Canadensis Moench*, cv. *Robusta*).

Spolehlivost metody byla validována za pomoci směsi deuterovaných cytokininových standardů přidávaných při extrakci rostlinného materiálu. Rostlinný materiál byl po extrakci do Bieleckého roztoku přečištěn použitím dvojnásobné ionexové chromatografie (SCX a DEAE Sephadex) v kombinaci s imunoafinitní chromatografií na gelu s navázanými skupinově selektivními monoklonálními protilátkami proti cytokininům. Přítomnost isoprenoidních a aromatických cytokininů ve studovaných extraktech byla současně potvrzena metodou enzymatické imunoanalýzy (ELISA), které předcházela rovněž chromatografická separace pomocí HPLC.

VYUŽITÍ NÁDOROVÝCH VAKCÍN U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

D. OČADLÍKOVÁ

Laboratoř léčebné a experimentální hematologie a buněčné imunoterapie (LEHABI), Fakultní nemocnice Brno, Jihlavská 20, 635 00 Brno
e-mail: docadlikova@fnbrno.cz

Mnohočetný myelom (MM) je nádorové onemocnění, které je charakterizováno zhoubnou proliferací plazmatických buněk (B-lymfocytů), produkovajících monoklonální imunglobulin (Id-protein-možnost izolace z plazmy MM-pacienta). MM zaujímá asi 10 % ze všech hematologických nádorových onemocnění a medián dlouhodobého přežití je asi 3–5 let v případě, jsou-li nemocní léčeni pomocí chemoterapie či chemoterapie a autologní transplantace. MM je tedy smrtelné onemocnění.

Dendritické buňky (DB) jsou profesionální antigen-presentující buňky známé svou schopností účinně předkládat antigen (Ag) T-lymfocytům a indukovat takto protinádorovou odpověď specifických cytotoxických T-lymfocytů (CTL) *in vivo*. Dospud byly připraveny vakcíny, kde jako nádorové Ag sloužily lyzát myelomových buněk, Id-protein, DB a Id-proteinem (či jinými Ag – nikoli však na našem pracovišti) stimulované DB. Tyto vakcíny jsou netoxické.

Největší protinádorová odpověď byla vyvinuta při podání antigenem (na našem pracovišti Id-proteinem) stimulovaných DB. Avšak tato odpověď byla jen mírná, což svědčí o limitované imunogennosti Id-proteinu. Proto jsou navrhovány jiné postupy vpravení nádorového Ag do DB za účelem indukce tumor-specifických CTL, které se ubírají dvěma směry 1) použití univerzálnějšího nádorového Ag než je Id-protein (TAA-tumor asociované Ag) 2) elektroporace celkové tumorové mRNA do DB.

Jako univerzální nádorové Ag u MM je možno využít například katalytickou podjednotku telomerasy (hTERT) exprimovanou na povrchu MM-buněk. Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích eukaryotických chromozomů, které stabilizují a chrání. Telomerasa je ribonukleový enzym syntetizující telomery reverzní transkripcí (hTERT) její templátové RNA. U zdravých buněk je telomerasová aktivita reprimována a tudíž jejich replikační kapacita omezena. U nádorových buněk je vysoká a je podmínkou jejich nesmrtnosti, malignity. Telomerasová aktivita byla detegována u 90 % všech lidských nádorů. Je prokázáno, že hTERT je schopna indukovat CTL namířené proti MM-buňkám.

Dalším dobrým kandidátem na tumorový antigen je MUC1, epitheliální membránový glykoprotein, který je rovněž exprimován MM-buňkami. Slouží jako tumorový marker a byl detegován v séru MM-pacientů. Imunizace nádorovými peptidy je však limitována počtem Ag a HLA-typem pacienta. Proto se do popředí zájmu dostává elektroporace (vpravení pomocí krátkého elektrického šoku) celkové tumorové mRNA do DB. Nevyžaduje definici TAA a HLA-typu a je možno ji amplifikovat pomocí RT-PCR. Dále je její účinnost srovnatelná s virovou transdukcí bez rizika virového přenosu.

Doufáme, že některé z těchto nově navrhovaných a zkoušených postupů přinese výsledky v léčbě pacientů s mnohočetným myelomem.

**VÝZNAM LIDSKÉ ASPARTYL (ASPARAGINYL)
β -HYDROXYLASY PŘI MALIGNÍCH
TRANSFORMACÍCH, JEJICH
DIAGNOSTICE A LÉČBĚ**

**EVA OTÁHALOVÁ^a, MICHAEL S. LEBOWITZ^b
a HOSSEIN A. GHANBARI^b**

^aÚstav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2, ^bPanacea Pharmaceuticals, 207 Perry Parkway, Suite 2, Gaithersburg, MD 20877, USA

Lidská aspartyl (asparaginyl) β-hydroxylasa (HAAH) je enzym katalyzující posttranslační modifikaci specifických domén signálních proteinů, receptorů, proteinů spojených s transformací a enzymů, které se účastní apoptosis. Jedná se o transmembránový enzym vyskytující se na membráně endoplazmatického retikula buněk všech testovaných tkání.

Zvýšená produkce i aktivita HAAH byly pozorovány v buňkách různých druhů pevných maligních nádorů. U těchto buněk, na rozdíl od buněk normálních, se HAAH vyskytuje ve velké míře i na cytoplazmatické membráně. Hydroxylasová aktivita HAAH je u maligních buněk zvýšena asi 10x (cit.¹). Bylo prokázáno, že nadprodukce HAAH je dostatečná k indukci buněčné transformace, zvyšuje pohyblivost a schopnost buněk invaze do dalších tkání, která je spojena s tvorbou metastáz, a vede ke vzniku nádorů *in vivo*².

Imunohistochemicky jsme testovali biopsie 12-ti různých typů solidních nádorů ($n > 1000$) a také vzorky příslušných zdravých tkání ($n > 200$). Pomocí dvou specifických monoklonálních protitílků byl HAAH detegován u 99 % vzorků maligních nádorů, ne však u vzorků příslušných zdravých tkání. Imunochemicky (ELISA, Western blotting) byl HAAH detegován v živném mediu a také vzorcích séra pacientů s maligní transformací. Ošetření linií nádorových buněk monoklonálními protitílkami *in vitro* vedlo k omezení projevů malignity buněk – intenzivního buněčného růstu a dělení, schopnosti pohybu a průniku buněk do dalších tkání.

Zjištěné vlastnosti HAAH a příslušných specifických protitílků naznačují možnost využití při diagnostice maligních transformací neinvazivní cestou vyšetření tělních tekutin. Kromě velmi citlivé diagnostiky mohou být specifické protitílky použity též k léčbě maligních transformací a to využitím jejich schopnosti potlačit maligní vlastnosti a projevy transformovaných buněk, nebo jejich použitím pro cílený transport cytostatik.

LITERATURA

1. Lavaissiere L., Jia S., Nishiyama M., de la Monte S., Stern A. M., Wands J. R., Friedman P. A.: *J. Clin. Investig.* 98, 1313 (1996).
2. Ince N., de la Monte S., Wands J. R.: *Cancer Res.* 60, 1261 (2000).

**ENZYMY KVASINKY *Candida tropicalis*
PARTICIPUJÍCÍ NA BIODEGRADACI FENOLU**

JAN PÁCA a MARIE STIBOROVÁ

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

Řada složek životního prostředí je kontaminována fenolickými látkami. Kvásinky *Candida tropicalis* jsou schopné využívat fenolu jako zdroje uhlíku a energie. Hydroxylace fenolu na katechol je prvním, limitujícím krokem aerobní degradace fenolu. Následné přeměny tohoto produktu katalyzují enzymy štěpící aromatické dihydroxyderiváty. Katechol-1,2-dioxygenasa zprostředkuje vznik kyseliny *cis,cis*-mukonové, která se metabolizuje na acetyl CoA a sukcinát. Katechol-2,3-dioxygenasa participuje na tvorbě semialdehydu kyseliny 2-hydroxymukonové, z které se dále tvoří pyruvát. Výsledné produkty vstupují do intermediárního metabolismu buňky. V práci je řešena lokalizace, charakterizace a izolace enzymových systémů kvásinky *C. tropicalis* degradujících fenol. To je důležité z hlediska genového inženýrství (navržení rekombinantrních kmenů využitelných v biotechnologických a bioremediacích). Z kvásinek *C. tropicalis*, rostoucích ve třech různých mediích v přítomnosti glukózy, fenolu nebo obou těchto zdrojů uhlíku, byly izolovány subcelulární kompartmenty, mikrosomy a cytosol. V obou frakcích byla sledována aktivita enzymů schopných oxidovat fenol. Zatímco žádná aktivita nebyla detegována v mikrosomech a cytosolu buněk rostoucích na glukóze, buněčné kompartmenty *C. tropicalis*, rostoucí v mediu obsahujícím fenol, vykazovaly fenol-hydroxylasovou aktivitu. V mikrosomech byla zaznamenána indukce hlavních složek monooxygenasového systému se smíšenou funkcí, cytochromu P450 (CYP) a NADPH:CYP reduktasy, schopných hydroxylovat fenol. Stejně tak i v cytosolu došlo působením fenolu k indukci flavoproteinové monooxygenasy, NADPH-dependentní fenolhydroxylasy. S využitím originálně vyvinuté metody HPLC a pomocí hmotnostních analýz bylo zjištěno, že fenol je monooxygenasami *C. tropicalis* oxidován na katechol. V práci porovnáváme účinnost hydroxylačních enzymů obou buněčných kompartmentů.

Autori děkují za podporu MŠMT ČR (MSM113100001) a GA ČR (104/03/0407).

**MICROARRAYS – MODIFIKACE SKLENĚNÉHO
POVRCHU PRO VAZBU BIOMOLEKUL**

ONDŘEJ PAČES^a a WILHELM ANSORGE^b

^aÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, ^bEuropean Molecular Biology Laboratory, Mayerhofstr. 1, D-69117 Heidelberg, Germany
e-mail: paces@uochb.cas.cz

Primární výhodou microarrays^{1,2} technologie je možnost studia interakcí velkého souboru látek v jediném experimentu. Metoda byla vystavěna na základě výzkumu interakcí DNA. Princip spočívá ve vysokohustotním umístění a navázání vzor-

ků DNA (primery, geny či známé sekvence) na podložní materiál. Tím vzniká tzv. microarray (též chip, slide). Vzniklé pole DNA se následně hybridizuje se substrátem, kterým může být např. směs značených úseků DNA z biologického materiálu. Scanováním povrchu pole se pak získá přehled o interakcích vázané DNA na povrchu chipu se značenou DNA.

V poslední době se metoda rozšiřuje i na průzkum interakcí dalších typů molekul (zejména proteinů)^{3,4} a dokonce i celých buněk⁵. To přináší celou řadu problémů. Na rozdíl od jasných a velmi specifických interakcí DNA je působení mezi jinými typy biomolekul méně uniformní.

V současné době se používají dva druhy vázání molekul k podložnímu substrátu⁶. Jedná se buď o vytvoření kovalentní vazby nebo o tvorbu většího počtu slabších elektrostatických interakcí.

Při studiu interakcí proteinů a podobných typů molekul se může objevit problém sterického bránění interagujícího místa v případě, že dochází k vazbě na substrát právě v této oblasti. Proto byla prováděna studie vlastností různých druhů povrchů vhodných k vazbě s cílem vyhnout se výše zmíněnému efektu.

Předmětem mého výzkumu byl způsob vazby biomolekul na skleněný substrát. Ukázalo se totiž, že to je jedna z klíčových věcí v chipové technologii.

Byla vyvinuta metoda modifikace skleněných povrchů alkylaminořetězci pro DNA chipy. Pro povrchy proteinových chipů byly objeveny nové metody modifikace skla, které zabraňují diskutovaným problémům.

LITERATURA

- Lehrach H., Drmanac R., Hoheisel J. D., Larin Z., Lennon G., Monaco A. P., Nizetic D., Zehetner G., Poustka A., v: *Genome Analysis: Genetic and Physical Mapping* (Davies K. E., Tilghman S., ed.), str. 39. Gold Spring Laboratory Press, Gold Spring Harbor, NY 1990.
- Lennon G., Lehrach H.: *Trends Genet.* 7, 314 (1991).
- MacBeath G., Schreiber S. L.: *Science* 289, 1760 (2000).
- Haab B. B., Dunham M. J., Brown O. P.: *Genome Biol.* 1 (6), preprint0001.1-0001.22 (2000).
- Ziauddin J., Sabatini D. M.: *Nature* 411, 107 (2001).
- Beier M., Hoheisel J. D.: *Nucl. Acids Res.* 27, 1970 (1999).

2'-5' OLIGOADENYLÁTY S C-FOSFONÁTOVOU INTERNUKLEOTIDOVOU VAZBOU

**ONDŘEJ PÁV, MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ,
MILENA MASOJÍDKOVÁ a IVAN ROSENBERG**

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

V posledních letech bylo vynaloženo značné úsilí při hledání modifikovaných oligonukleotidů, potenciálních antisenzních terapeutik, které by vykazovaly zlepšené hybridizační vlastnosti, zvýšenou stabilitu vůči nukleasam a vysokou rozpoznávací specifitu vůči cílové RNA. Nahrazení fosfodiesterové vazby alternativní anionickou, neutrální nebo kationickou internukleotidovou vazbou je jednou z možností, jak ovlivnit právě tyto požadované vlastnosti.

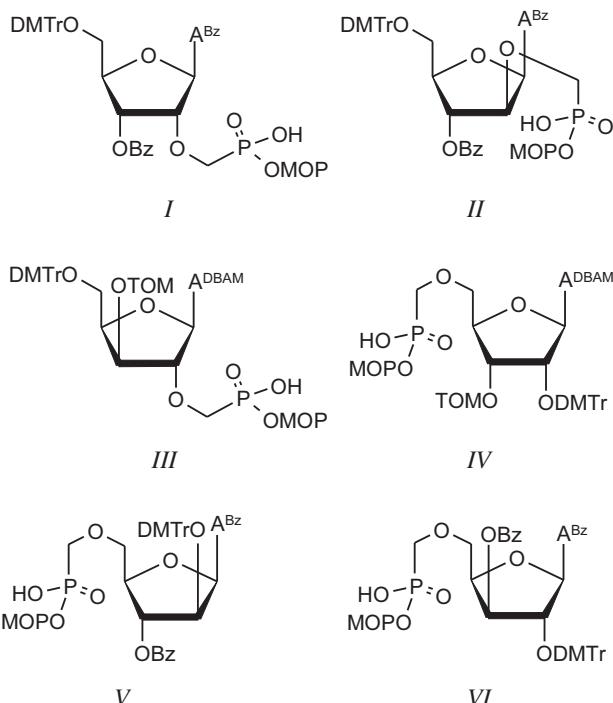


Schéma 1

V rámci našeho studia fosfonátových analogů nukleotidů a oligonukleotidů¹⁻⁴ byly připraveny vhodně chráněné monomery (schéma 1) pro syntézu oligonukleotidů fosfotriestrovou metodou získané z příslušných ribo, xylo a arabino nukleosidů. Metodika chránění adeninových nukleosidů byla vypracována tak, aby bylo možné syntetizovat plně chráněné fosfonáty jak v 2' tak v 5' řadě.

Z těchto monomerů byly připraveny oligoadenylové *n*-mery, u nichž byla testována stabilita vůči různým typům nukleas a také jejich hybridizační vlastnosti. Zavedení C-fosfonátové vazby, která je neisosterní a isopolární vzhledem k fosfodiesterové, vede ke vzniku dvou regioisomerních inter-nukleotidových vazeb (2'-O-CH₂-P-O-5'' a 2'-O-P-CH₂-O-5''), které se liší enzymatickou stabilitou i hybridizačními vlastnostmi.

Práce je podpořena grantem reg. č. A4055101 AV ČR v rámci výzkumného projektu Z4055905.

LITERATURA

- Králíková Š., Buděšinský M., Masojídková M., Rosenberg I.: *Nucleosides Nucleotides, Nucleic Acids* 19, 1159 (2000).
- Králíková Š., Buděšinský M., Masojídková M., Rosenberg I.: *Tetrahedron Lett.* 41, 955 (2000).
- Rejman D., Snášel J., Liboska R., Točík Z., Pačes O., Králíková Š., Rinnová M., Koiš P., Rosenberg I.: *Nucleosides Nucleotides, Nucleic Acids* 20, 819 (2001).
- Hanuš J., Barvík I., Ruszová-Chmelová K., Štěpánek J., Turpin P. Y., Bok J., Rosenberg I., Petrová-Endová M.: *Nucl. Acids Res.* 29, 5182 (2001).

**NEW MYCOBACTERIAL HALOALKANE
DEHALOGENASE DhmA:
CLONING, EXPRESSION AND IDENTIFICATION
OF A CATALYTIC TRIAD**

**M. PAVLOVÁ^a, A. JESENSKÁ^a, Y. NAGATA^b,
and J. DAMBORSKÝ^a**

^aNational Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^bDepartment of Environmental Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai, 980-8577, Japan

Haloalkane dehalogenases are enzymes that belong to the α/β -hydrolase superfamily. They are bacterial enzymes cleaving the carbon-halogen bond of the halogenated aliphatic compounds by a hydrolytic mechanism. These enzymes have a potential application in detoxification of subsurface pollutants and recovery of industrial side products. Four different haloalkane dehalogenases have been described in the literature until today: DhLA enzyme from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 ref.¹, DhaA enzyme from *Rhodococcus* sp.²⁻⁵ and *Pseudomonas pavonaceae* 170 ref.⁶, LinB enzyme from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 ref.⁷ and DhmA enzyme from *Mycobacterium avium* N85 ref.⁸ DhmA has a broad substrate specificity and good activity with the priority pollutant 1,2-dichloroethane⁸ and it is the first dehalogenase obtained from bacterium that colonizes animal tissues. Therefore, we focused on DhmA in this project.

The tertiary structure of DhmA has not been determined yet, but it was predicted on its similarity to haloalkane dehalogenases by homology modeling. DhmA is expected to contain a main and a cap domain and it structurally belongs to the superfamily of α/β -hydrolases. This superfamily has a highly conserved arrangement of their catalytic residues: nucleophile-histidine-acid. The proposed residues of DhmA corresponding to the catalytic triad are Asp123, His279 and Asp250. Another catalytically important residue is W124 that play a role of halide-stabilizing amino acid. In order to confirm the catalytic residues of DhmA, we constructed four mutants by site-directed mutagenesis (D123A, W124L, D250A and H279A).

DhmA overexpressed in *Escherichia coli* GI724 showed low expression and low stability⁸. Therefore, we used pET-32(a) vector for improved expression of DhmA in current study. The pET-32(a) vector is designed for cloning and high-level expression of polypeptide sequences fused with thioredoxin protein. To support correct folding and stability of DhmA we used pG-Tf3 plasmid harboring trigger factor and GroEL-GroES chaperones. The trigger factor and GroEL-GroES chaperones play cooperative roles in assistance to folding for some proteins. Their overexpression can effectively prevent aggregation of recombinant proteins coexpressed in *E. coli*. Haloalkane dehalogenase DhmA was highly expressed and showed good activity in this expression system. All mutant proteins were inactive in crude extracts confirming essential role of the catalytic residues. Based on this result, detailed reaction mechanism of DhmA was proposed.

REFERENCES

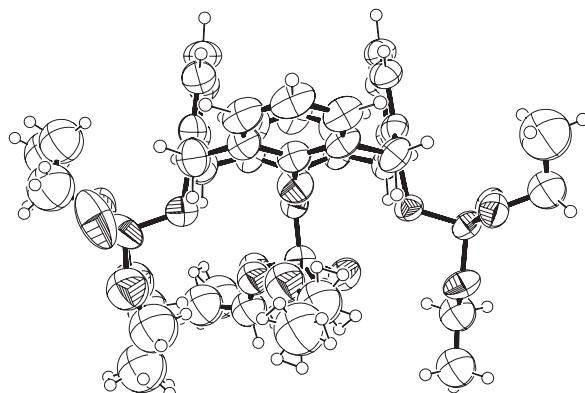
- Keuning S., Janssen D. B., Witholt B.: *J. Bacteriol.* **163**, 635 (1985).
- Yokota T., Omori T., Kodama T.: *J. Bacteriol.* **169**, 4049 (1987).
- Scholtz R., Leisinger T., Suter F., Cook A. M.: *J. Bacteriol.* **169**, 5016 (1987).
- Janssen D. B., Gerritse J., Brackman J., Kalk C., Jager D., Witholt B.: *Eur. J. Biochem.* **171**, 67 (1988).
- Sallis P. J., Armfield S. J., Bull A. T., Hardman D. J.: *J. Gen. Microbiol.* **136**, 115 (1990).
- Poelarends G. J., Wilkens M., Larkin M. J., vanElsas J. D., Janssen D. B.: *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2931 (1998).
- Nagata Y., Miyauchi K., Damborsky J., Manova K., Ansorgova A., Takagi M.: *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3707 (1997).
- Jesenska A., Bartos M., Czernekova V., Rychlik I., Pavlik I., Damborsky J.: *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3724 (2002).

STRUKTURNÍ STUDIUM TRISUBSTITUOVANÝCH CALIX[4]ARENŮ

HANA PETŘÍČKOVÁ^a a JAN BUDKA^b

^aÚstav chemie pevných látok a ^bÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: hana.petrickova@vscht.cz, jan.budka@vscht.cz

K odstranění hydroxylových skupin ze spodního okraje calix[4]arenů se využívá redukce¹ příslušného tetrafosforyl-derivátu kovovým draslíkem v kapalném amoniaku. Při syntéze této sloučeniny reakcí calix[4]aren-25,26,27,28-tetraolu s diethyl-chlorfosfátem v přítomnosti K_2CO_3 v acetolu byl získán trisubstituovaný derivát 26,27,28-tris(diethoxy-fosfo-ryloxy)calix[4]aren-25-ol. Produkt byl odpařen do sucha (žlutý olej) a ponechán bez rozpouštědla krystalovat. Pomocí rentgenové strukturní analýzy na monokrystalu byla určena molekulová a krystalová struktura tohoto „trifosfátu“ calix[4]arenů (obr. 1).



Obr. 1.

Získaná struktura je v mnoha pohledech unikátní. Rešerší v Cambridgeské strukturní databázi bylo zjištěno, že všechny rentgenové struktury trisubstituovaných calixarenů^{2–4} ve stlačené kónické konformaci mají dvě protější jádra koplanární, zatímco u našeho derivátu jsou jádra stlačena horními okraji k sobě. Také poloha vodíku hydroxylové skupiny se svou orientací zcela vymyká pravidlům. U monosubstituovaných, disubstituovaných a trisubstituovaných calix[4]arenů jsou hydroxylové skupiny většinou vázány vodíkovými vazbami k vedlejším etherickým kyslíkům. V případě studovaného trisubstituovaného calix[4]arenu jsou etherické kyslíky vedlejších jader hydroxylu více vzdálené a OH skupina je zcela unikátním způsobem orientována dovnitř kavity. Z naměřených vzdáleností lze předpokládat, že vodík hydroxylové skupiny je v kavitě poután neobyvyklou O-H-π interakcí a zároveň slabou vodíkovou vazbu na protější etherický kyslík.

LITERATURA

- McMurry J. E., Phelan J. C.: Tetrahedron Lett. 32, 5655 (1991).
- Konig B., Fricke T., Dix I., Jones P. G., Thondorf I.: Liebigs Ann. Chem. 1997, 2315.
- Gloege J., Keitel I., Costicella B., Kunath A., Schneider M.: Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem. 117, 67 1996.
- Markovsky L. N., Visotsky M. A., Pirozhenko V. V., Kalchenko V. I., Lipkowski J., Simonov Y. A.: Chem. Commun. 1996, 69.

MECHANISM OF ALA-PDT CYTOTOXIC EFFECTS ON K562 CELLS DERIVED FROM CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA

**M. PLUSKALOVÁ^a, P. HALADA^b,
K. SMETANA^a, and Z. HRKAL^a**

^aDepartment of Cellular Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, ^bLaboratory of Mass Spectrometry, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague

Chronic myelogenous leukemia (CML) is known to be resistant to various chemotherapeutic treatments. An explanation of such a strongly and widely spread resistance on the molecular level is of a high importance.

The induction of an apoptotic process leading to a cell death is used for medical application in a treatment of leukemia in general. We used a cell line K562 as a model of blast phase of CML. A photodynamic treatment, ALA-PDT, was used as an inducer of apoptosis in different cell lines – HL60, HeLa etc. and is employed to treat a variety of cancers. ALA-PDT is based on the application of 5-aminolevulinic acid i.e. incubation of cells with 5-ALA followed by their irradiation with visible light. ALA-PDT represents a possible method for investigation of molecular processes within a treatment of CML.

The cell proliferation of K562 was found to be affected by photodynamic treatment – ALA-PDT. The effect of light dose on proliferation of K562 preincubated with 1mM ALA for 4

hours was significant. It was determined by ³H-thymidine incorporation into the cell DNA within 18-hours. Light dose 12 J.cm⁻² reduced the number of proliferating cells by 50 %. Nevertheless, no apoptotic cells occurred. No apoptotic peak was obtained with propidium iodide assay using flow cytometry. The cytological findings showed the occurrence of necrosis rather than a presence of apoptotic cells within few hours after ALA-PDT.

But, interestingly, some pre-apoptotic events were reported. Stress-induced release of cytochrome c regulates caspase activity via Apaf-1 and activates an execution phase of apoptosis. The protein Bcl-XL prevents a release of cytochrome c from mitochondria after stress stimuli. The expression of anti-apoptotic protein Bcl-XL was down-regulated after ALA-PDT. Cytochrome c was found in cytoplasm in accordance with the down-regulation of Bcl-XL after ALA-PDT treatment. But on the contrary no caspase activity after ALA-PDT was detected.

Some other proteins which are connected to an apoptotic process weren't affected after ALA-PDT treatment at all. An expression of heat shock protein 60 remained at the same protein level. Phosphorylation of retinoblastoma protein, which is the key regulatory protein of cell cycle and apoptosis, wasn't changed in response to ALA-PDT.

It's possible to conclude, that ALA-PDT affects cell proliferation and enables an induction of some pre-apoptotic events which are subsequently somehow inhibited. Our preliminary results have shown, that some changes in protein phosphorylation or dephosphorylation on tyrosine occur after ALA-PDT. The identification of these proteins may contribute to explain reasons for inhibition of apoptotic processes, which were probably once induced.

This work was supported by grant GA CR 303/01/1445.

ENHANCEMENT OF DNA VACCINE POTENCY VIA MHC- AND/OR RECEPTOR-MEDIATED TARGETING SIGNALS

**D. POKORNÁ^a, M. ŠMAHEL^a, N. ČEROVSKÁ^b,
T. MORAVEC^b, H. SYNKOVÁ^b,
and J. VELEMÍNSKÝ^b**

^aInstitute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Experimental Virology, U Nemocnice 1, 128 00 Prague 2,

^bInstitute of Experimental Botany of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 165 02 Prague 6

e-mail: danap@uhkt.cz

Vaccine strategies for treatment of human papillomavirus-induced cervical cancer are based mainly on the model antigen, human papillomavirus type 16 (HPV16) E7. The immunogenicity of E7 gene has been enhanced by construction of fusion genes, e.g. Sig/E7/LAMP-1 chimera¹. The sorting signal of the lysosome-associated membrane protein (LAMP-1) targets E7 into the endosomal and lysosomal compartments resulting in the enhanced presentation of the E7 antigen by MHC class II molecules. To increase safety of this fusion gene we introduced three point mutations into the pRb-binding site of E7. The immunogenicity of DNA vaccine with the resultant

Sig/E7GGG/LAMP-1 gene was found to be similar to Sig/E7/LAMP-1. We also fused the E7 and E7GGG antigens with mouse heat shock protein (HSP). The E7/HSP and E7GGG/HSP fusion genes generated higher E7-specific immune responses than E7, E7GGG, and HSP 70 genes in immunized mice. Another fusion gene L2/CP/E7, that contains common neutralization epitope of minor capsid protein L2 of HPV 16 fused with the coat protein (CP) of potato virus A (PVA) and with the HPV16 E7 epitope, showed enhanced immunogenicity in comparison with E7 and CP/E7. We hypothesized that this was caused by the L2 epitope, that bound to the unknown cell surface receptor². CP fusion proteins, just like CP alone, spontaneously assembled into virus-like particles (VLPs). The immunogenic efficacy of DNA vaccines was evaluated using two HPV16 transformed cell lines with different level of MHC class I surface expression: TC-1 cell line prepared by³ that has been MHC class I positive and its derivative, TC-1/A9 clone, with reduced surface production of MHC class I molecules, that has been developed in our laboratory. The loss of MHC class I expression has been accompanied by increased resistance of TC-1/A9 cells to DNA vaccination against the E7 antigen⁴. Mice were immunized i.d. by gene gun with 1 µg of each plasmid. In both the preventive immunization experiment (immunization/challenge) and the therapeutic immunization experiment (tumor cell inoculation/immunization) the incidence and growth of TC-1-induced tumors was highly reduced in mice treated with L2/CP/E7, and to the lesser extent in mice treated with E7/HSP, E7GGG/HSP and Sig/E7GGG/LAMP-1. In the preventive vaccination experiment, any protection against TC-1/A9-induced tumors was not achieved by immunization with E7/HSP, E7GGG/HSP nor Sig/E7GGG/LAMP-1. The data suggest that the fusions of HSP or L2 neutralization epitope with antigen are two promising strategies for the enhancement of vaccine potency.

REFERENCES

- Wu et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 11671 (1995).
- Kawana et al.: J. Virol. 75, 2331 (2001).
- Lin et al.: Cancer Res. 56, 21 (1996).
- Šmahel et al.: Vaccine 21, 1125 (2003).

NOVÉ MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ PŘÍSTUPY V PROTINÁDOROVÉ TERAPII

ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Brno, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

Vznik nádorů je zpravidla charakterizován mnohočetnými genetickými změnami, které ovlivňují především mechanismy kontrolující buněčnou proliferaci, diferenciaci a programovanou smrt buněk – apoptózu. Mezi nejčastější příčiny maligní transformace buňky patří inaktivace antionkogenů, které tak ztrácejí schopnost účastnit se regulace buněčného cyklu, a chromozomální translokace mající za následek tvorbu chimérických fúzních proteinů odpovědných za tvorbu onkogenfónu fenotypu buňky.

K primárním cílům onkologického výzkumu patří charakterizace molekulárních rozdílů mezi normální a nádorovou buňkou, a to jak na úrovni exprese mRNA, tak na úrovni proteinů. K tomuto účelu byly vyvinuty technologie microarrays, které umožňují sledovat expresi až několika desítek genů v jednom experimentu a stanovit tak nádorově-specifické expresní profily. Jejich stanovení má význam jak pro diagnostiku a prognózu onemocnění, tak pro protinádorovou léčbu, neboť umožní optimální zacílení genové terapie.

Další perspektivní molekulárně-biologickou technologií, která se postupně stává účinným nástrojem terapie cílené proti nádorům způsobených chromozomálními translokacemi, je siRNA (small interfering RNA) navozující jev tzv. RNAi (RNA interference). Jde o mechanismus post-translačního utlumování genů (gene silencing) prostřednictvím specifické dvouřetězcové RNA o délce 21–23 bp. Pomocí této technologie se nám již podařilo dosáhnout prvních úspěšných výsledků na modelu Ewingova sarcomu, jednoho z nejčastějších kostních nádorů dětí.

OSMOTOLERANTNÍ KVASINKA

Zygosaccharomyces rouxii – IZOLACE AUXOTROFNÍCH MUTANTŮ A OPTIMALIZACE TRANSFORMAČNÍHO PROTOKOLU

LENKA PŘIBYLOVÁ a HANA SYCHROVÁ

Oddělení membránového transportu, Fyziológický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: pribyll@biomed.cas.cz

Kvasinka *Zygosaccharomyces rouxii*, druh blízce příbuzný modelové kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, se často vyskytuje jako kontaminace potravinových produktů s vysokým obsahem cukrů nebo solí jako jsou různé šlávy, omáčky, džemy nebo salátové zálivky; také se ale používá při výrobě tradičních slaných japonských pokrmů – sójové omáčky a koncentrované slané kořeníčí směsi zvané miso. Růst v prostředí s relativně nízkou aktivitou vody jí umožňuje její vysoká osmotolerance. Tato typická vlastnost je patrně způsobena přítomností specifických genů, jež umožňují kvasince *Z. rouxii* růst i v tak koncentrovaném prostředí, ve kterém již většina ostatních druhů kvasinek přezívá nedokáže. Identifikace těchto specifických genů a jejich exprese v *S. cerevisiae* by tedy mohly významně přispět ke zlepšení vlastností průmyslových kmenů *S. cerevisiae*.

Z. rouxii bylo dosud identifikováno pouze několik genů, většina z nich prostřednictvím jejich exprese v mutantních kmenech *S. cerevisiae* s poruchou v regulaci homeostáze kationů (geny pro Na⁺-ATPasu nebo Na⁺/H⁺ antiporter) nebo v odpovědi na osmotický stres (např. HOG1, GPD1). Jednou z příčin nedostatečného poznání této kvasinky na molekulové úrovni je to, že buňky *Z. rouxii* dosud úspěšně odolávaly pokusům o rychlou a účinnou transformaci prostřednictvím DNA, existoval pouze jediný typ auxotrofních mutantů (Leu-) a pro ten bylo vytvořeno zatím jen několik málo vhodných vektorů.

V naší práci se nám podařilo izolovat první mutanty *Z. rouxii* Ura-, vytvořily jsme protokol pro účinnou transformaci

buněk *Z. rouxii* Leu- nebo Ura- prostřednictvím elektroporace a pro využití v *Z. rouxii* jsme zkonstruovaly a testovaly různé typy vektorů (centromerové, episomální, s markery ScLEU2, ZrLEU2, ScURA3).

V současnosti se pokoušíme o konstrukci disruptivních kazet pro přípravu mutantů s vícenásobnými auxotrofními mutacemi či s mutacemi způsobujícími osmosensitivitu. Tyto mutanty pak budeme transformovat genomovou bankou *Z. rouxii* (kterou připravíme v nevhodnějším vektoru) a pokusíme se tak izolovat geny zodpovědné za vysokou osmotoleranci této kvasinky.

Tato práce byla podpořena granty GA ČR 204/01/0272 a AVOZ 5011922.

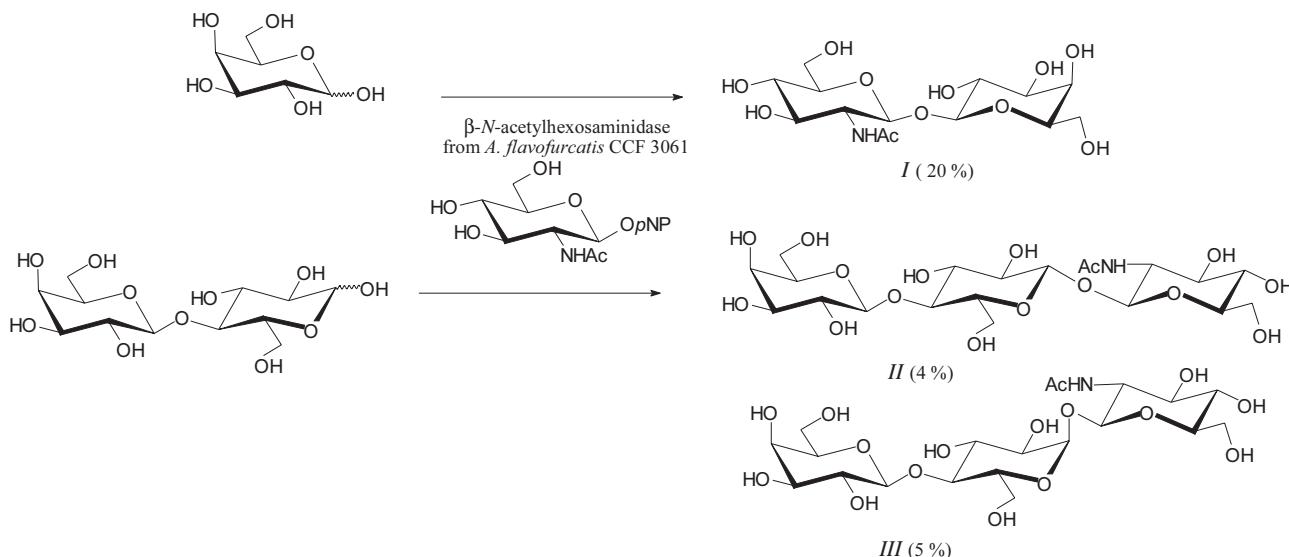
ENZYMIC SYNTHESIS OF BIOACTIVE CARBOHYDRATES CONTAINING N-ACETYLHEXOSAMINES

JANA RAUVOLFOVÁ, M. KUZMA,
V. PŘÍKRYLOVÁ, LENKA WEIGNEROVÁ,
and VLADIMÍR KŘEN

Institute of Microbiology, Laboratory of Biotransformation,
Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4
e-mail: rauwolf@biomed.cas.cz

The importance of oligosaccharides containing *N*-acetylhexosamines (*HexNAc* = GlcNAc; GalNAc; ManNAc) is increasing due to their biological activities. For example, oligosaccharides comprising ManNAc are important immunodeterminants of some pathogenic bacteria, β -GlcNAc moiety linked to galactose occurs as an essential core unit of glycoconjugates isolated from human milk, derivatives of chitooligomers with GlcNAc moieties have high affinity for NKR-P1 protein, the major activating receptor at the surface of rat natural killer cells¹.

Unique non reducing di- and trisaccharides β -D-GlcNAc-(1 \leftrightarrow 1)- β -D-Gal (*I*) and β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc- α / β -(1 \leftrightarrow 1)-



- β -D-GlcNAc (*II/III*) were synthesized by *N*-acetylglucosaminyl transfer of β -GlcNAc moiety from pNP- β -GlcNAc onto D-galactose or lactose using β -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus flavofurcatus*, respectively.

This project was supported by grants from Czech National Granting Agency No. 03/01/1018, and No. 204/02/P096/A, MSMT grant ME 371 and Research Concept No. AVOZ5020903.

THERMOSTABILITY OF MULTIDOMAIN PROTEINS: PROPERTIES OF CHIMAERIC ELONGATION FACTORS EF-Tu COMPOSED OF DOMAINS OF MESOPHILIC-*Escherichia coli* EF-Tu AND THERMOPHILIC-*Bacillus stearothermophilus* EF-Tu

H. ŠANDEROVÁ^a, M. HŮLKOVÁ^a,
PETR MALOŇ^b, and JIŘÍ JONÁK^a

^aDepartment of Protein Biosynthesis, Institute of Molecular Genetics and ^bDepartment of Peptide Chemistry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6

Elongation factors EF-Tu/EF-1 α are abundant cellular proteins. They are highly homologous in the broad range of prokaryotic and eukaryotic organisms. These monomeric three-domain GTPases are involved in translation as universal carriers of aminoacyl-tRNAs to the A-site of the ribosome. Their GTPase centre and guanine nucleotide binding site are situated in the N-terminal domain (G-domain). All three domains participate in binding of aminoacyl-tRNA.

The EF-Tu proteins from *E. coli* and *B. stearothermophilus* were examined by the chimaerization approach to evaluate the contribution of the domains to the thermostability of these proteins. Molecules of EF-Tus were genetically dissected into three corresponding domains and the domains combined to form chimaeric EF-Tu proteins. The resulting six recombinant

mesophile/thermophile chimaeric EF-Tus, together with the recombinant *E. coli* and *B. stearothermophilus* EF-Tus and isolated G-domains, were characterized with regard to GDP and GTP binding activity, intrinsic GTPase activity and thermostability. The thermostability was measured both as the maintenance, at increasing temperatures, of a defined functional state by the ability to bind GDP and GTP, and to hydrolyze GTP and, independently, using CD spectroscopy, as the maintenance of the α -helix content.

The kinetic parameters of the EF-Tus, chimaeric EF-Tus and G-domains from *B. stearothermophilus* and *E. coli* were determined. *B. stearothermophilus* EF-Tu displayed affinity for GDP and GTP quite comparable with those of *E. coli* EF-Tu (hundredfold higher affinity for GDP than for GTP), and these properties, unlike in the *E. coli* G-domain, were intrinsic to the *B. stearothermophilus* G-domain itself.

The thermostability of the EF-Tus was found to be primarily determined by the stability of the G-domain. The thermophilic G-domain set up an about 20 °C higher basic level of thermostability than the mesophilic G-domain. The final thermostability of the EF-Tus was the sum of the thermostability contributions of G-domains and domains 2 and 3, which added additional 12–23 °C, depending on the domain origin and GTP or GDP conformation.

The GDP form of *E. coli* EF-Tu was more thermostable than the GTP form and *E. coli* domain 2 was mainly responsible for this difference. In contrast to *E. coli* EF-Tu, the thermostability of GDP and GTP conformations of *B. stearothermophilus* EF-Tu, *E. coli* G-domain and *B. stearothermophilus* G-domain was almost identical.

One of the reasons for the assembly of EF-Tu molecules into three-domain structures appears to be a substantial increase of the thermal stability and modulation, by domains 2+3, of the efficiency (up or down) of the functions executed by their G-domains. The thermostability of the EF-Tu was not related to the affinity to GDP and GTP.

This work was supported by grants 204/98/0863 and 303/02/0689 from the Grant Agency of the Czech Republic (to J. J.).

OVLIVŇUJÍ BIS-INTERKALÁTOROVÉ PEPTIDY AGREGACI PRIONOVÉHO PEPTIDU 106-26 V PŘÍTOMNOSTI dsDNA?

**JAROSLAV ŠEBESTÍK^a, JAN HLAVÁČEK^b
a IVAN STIBOR^a**

^aVysoká škola chemicko technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Fleminogovo n. 2, 166 10 Praha 6

Charakteristickou vlastností prionových onemocnění je akumulace buněčného prionového proteinu (PrP^C) a to v jeho toxické konformaci (PrP^{Sc}) v mozku. PrP^{Sc} je na rozdíl od přirozeného PrP^C částečně odolný vůči štěpení proteasami, protože vysoký obsah β -sheetu vede k vzniku nerozpustných agregátů a amyloidních vláken. Peptid, jehož sekvence odpovídá 106–126 zbytku lidského prionového proteinu (HuPrP106-26), velmi dobře napodobuje vlastní protein a dokonce je

toxický pro neurony *in vitro*^{1,2}. Proto je tento peptid používán jako model infekčního PrP^{Sc}. Bylo zjištěno, že nukleové kyseliny jsou nezbytné pro experimentální přenos BSE na myš a zároveň urychlují agregaci prionového peptidu v roztoku³. dsDNA, které interagují s 9-aminoakridinem (interkalátor), indukují polymerizaci PrP^C částečným rozvinutím proteinu^{4,5}. Interkalace akridinu do DNA způsobí změnu její konformace a tedy schopnost rozpozнат PrP. Přibližně platí, že čím více vhodně umístěných interkalátorových jednotek molekula obsahuje, tím vyšší je její interakční konstanta s DNA a schopnost zabránit kompetiční vazbě jiných látek např. HuPrP106-26. Knihovna bis-interkalátorových peptidových derivátů s 9-aminoakridinem pro pozici sken (PSL) byla připravena na modifikované Merrifieldově pryskyřici⁶. Dále byla připravena jedna směsná knihovna obsahující 9826 látek z 51 PSL podknihoven následujících vzorců Acr-Gly-X-Y-Z-NHCH₂CH₂NH-Acr a Acr-Gly-X-Y-Z-NHCH₂CH₂NH-Z-Y-X-Gly-Acr. Látky s největším vlivem na interakci HuPrP106-26 a dsDNA jsou vyhledávány pomocí reverzní dialýzy směsne knihovny a fluorescenčním skenem PSL, dsDNA, HuPrP106-26 a barviva na amyloid.

Tato práce byla podpořena GA ČR grant č. 203/02/1379.

LITERATURA

1. Tagliavini F., Prelli F., Verga L., Giaccone G., Sarma R., Gorevic P., Ghetti B., Passerini F., Ghibaudo E., Foroloni G., Salmona M., Bugiani O., Frangione B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 9678 (1993).
2. Foroloni G., Angeretti N., Chiesa R., Monzani E., Salmona M., Bugiani O., Tagliavini F.: Nature 362, 543 (1993).
3. Nandi P. K.: Arch. Virol. 143, 1251 (1998).
4. Nandi P. K., Leclerc E.: Arch. Virol. 144, 1751 (1999).
5. Nandi P. K., Leclerc E., Nicole J.-C., Takahashi M.: J. Mol. Biol. 322, 153 (2002).
6. Šebestík J., Hlaváček J., Stibor I.: Peptides (2002), v tisku.

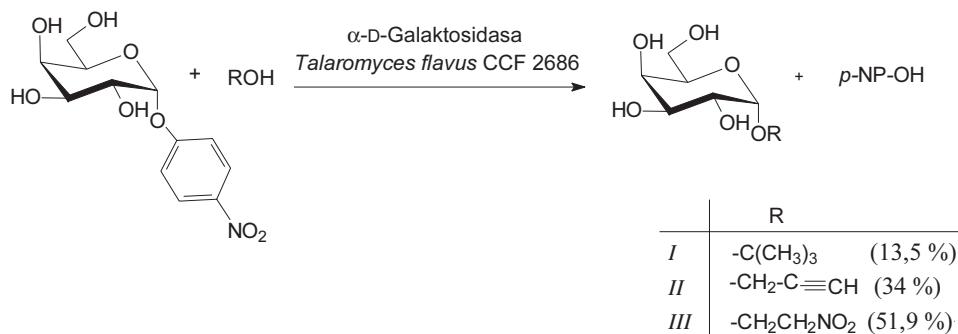
ENZYMOVÉ GLYKOSYLACE STERICKÝ BRÁNĚNÝCH ALKOHOLŮ

**PAVLA SIMERSKÁ, A. PIŠVEJCOVÁ,
LENKA WEIGNEROVÁ, M. KUZMA
a VLADIMÍR KŘEN**

*Laboratoř biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: simerska@biomed.cas.cz*

Podstatou této práce je studium nových transglykosylačních enzymových reakcí v chemii sacharidů se zaměřením na přípravu nových glykosidů. Glykosidasys při transglykosylaci preferují primární alkoholové skupiny, které jsou reaktivnější a přístupnější.

Testovali jsme rozsáhlou sérii alkoholů (primárních, sekundárních i terciálních) jako akceptorů při transglykosylačních reakcích. Orientovali jsme se hlavně na glykosylaci stericky bráněných alkoholů, které až na výjimky doposud nebyly glykosylovány pomocí glykosidas. Například *terc*.



tylalkohol je považován za inertní polární rozpouštědlo, které enzymově nelze glykosylovat.

*Terc.*butyl- α -D-galaktopyranosid (I), propargyl- α -D-galaktopyranosid (II) a 2-nitroethyl- α -D-galaktopyranosid (III) byly připraveny transglykosylačními reakcemi katalyzovanými α -D-galaktosidasou z *Talaromyces flavus* CCF 2686. Bylo zjištěno, že jejich příprava je možná i za použití některých α -D-galaktosidas a také pomocí reverzní hydrolyzy s volnou galaktosou jako donorem glykosylu.

Tento projekt je financován grantem 203/01/1018, 204/02/P096 z GA ČR a Výzkumným záměrem MBÚ AV ČR AV0Z5020903.

VLIV PERIFERNĚ VYVOLANÉ ZÁNĚTLIVÉ REAKCE NA EXPRESI mRNA KÓDUJÍCÍ CYKLOOXYGENASU V MÍŠE POTKANŮ WISTAR ALBINO

J. SLÍVA, M. PROCHÁZKOVÁ, T. DOLEŽAL,
V. MORAVEC a E. ŽDÁRSKÝ

Farmakologický ústav, 3. lékařská fakulta, Karlova univerzita, Ruská 87, 100 00 Praha 10
e-mail: Jiri.Sliva@lf3.cuni.cz

Prostaglandiny byly popsány jako klíčové mediátory bolesti při zánětlivém podnětu. Pro jejich syntézu z kyseliny arachidonové je esenciální přítomnost enzymu cyklooxygenasy, která se dnes rozlišuje na dvě hlavní isoformy, a sice COX-1 a COX-2. Ačkoliv se v míše nacházejí obě tyto isoformy, dosud není zcela objasněna přesná a detailní úloha obou těchto enzymů, ačkoliv jsou předmětem mnoha studií. Prostaglandiny vyvolávají tzv. centrální sensitizaci v zadních rozích mišních. Bylo popsáno, že COX-2 se indukuje asi 6 hodin po zánětlivé stimulaci. Role COX-1 je zatím nejasná. V naší experimentální studii se snažíme objasnit jejich úlohu, resp. sledujeme expresivitu mRNA kódující tyto isoformy v oblasti lumbální míchy u potkanů kmene Wistar albino. Jako zdroj nociceptivního stimulu slouží aplikace 5% formalinu do dorza zadní pravé tlapky. První experimentální skupina byla usmrčena po 6-ti hodinách a druhá po 24 hodinách od aplikace formalinu. Kontrolní skupinám bylo aplikováno adekvátní množství fyziologického roztoku. Z odebraného vzorku míchy izolujeme celkovou RNA, provádíme reverzní transkripcí

do cDNA a cestou polymerasové řetězové reakce v reálném čase stanovujeme množství exprimované RNA. Předběžné výsledky nasvědčují zvýšenou koncentraci cyklooxygenasy po nociceptivní stimulaci.

SPECIFICKÉ GLYKOPEPTIDY IMUNOGLOBULINU IgG A JEJICH IZOLACE

M. SLOVÁKOVÁ^a, Z. BÍLKOVÁ^a, J. JEŽOVÁ^a,
Š. OUZKÁ^a a J. LENFELD^b

^aKatedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, ^bÚstav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Praha

Peptidové mapování je základní technika umožňující studium primární struktury proteinů. Poskytuje informaci o expresi požadované aminokyselinové sekvence a o postranslačních modifikacích proteinu. Postup mapování zahrnuje enzymatické nebo chemické naštěpení proteinu proteasami na množství menších peptidových fragmentů, následuje jejich separace a detekce.

Vzhledem k vysoké heterogenitě některých molekul, např. IgG (v sekvenci AMK v oblasti vazebného místa a glykosylaci), a vzhledem k jeho vysoké molekulové hmotnosti (150 000 daltonů), je vhodné zařadit předseparační krok, pomocí něhož se podaří oddělit glykosylované části molekuly (glykopeptidy specifické pro daný glykoprotein) ze složité směsi peptidových fragmentů. Tyto glykopeptidy umožní identifikaci charakteristických peptidových map IgG pomocí MS.

K izolaci a analýze glykopeptidů molekuly IgG byly použity enzymové a bioafinitní reaktory immobilizací enzymů papainu, trypsinu, neuraminidasy, beta-galaktosidas a lektinů *Bandeira simplicifolia* I, II a Concanavalin A na magnetické makro- a mikropartikule. K immobilizaci byly použity nově vyvinuté nosiče neporézního charakteru typu poly(HEMA-co-EDMA), poly(HEMA-GMA) a makroporézní perlová celulóza modifikovaná dihydrazidem kyseliny adipové (ÚMCH AV ČR).

Způsob immobilizace se liší povahou proteinu: enzymy trypsin, papain a beta-galaktosida byly immobilizovány po aktivaci nosiče trichlorotriazinem, u neuraminidasy bylo využito její glykoproteinové části molekuly k orientované immobilizaci, lektiny byly immobilizovány prostřednictvím vysoko-

afinitního interakce biotin-streptavidin. Ihned po imobilizaci, ale i v průběhu skladování, je nutné sledovat aktivitu imobilizovaných enzymů. Čistota všech izolovaných a štěpených vzorků, tj. purifikovaný IgG, izolovaný Fc fragment a štěpené produkty IgG a Fc po aplikaci enzymových reaktorů, je kontrolována pomocí SDS/PAGE.

Tento projekt vznikl za finanční podpory grantu GA ČR č. 203/02/0023 a grantu MŠMT ČR č. 253100002.

**TRANSCRIPTOME OF *Treponema pallidum*:
GENE EXPRESSION PROFILE DURING
EXPERIMENTAL RABBIT INFECTION**

**DAVID ŠMAJS^a, PETRA MATĚJKOVÁ^a,
STEVEN J. NORRIS^b,
and GEORGE J. WEINSTOCK^c**

^aDepartment of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Joštova 10, 662 43 Brno, ^bDepartment of Pathology and Laboratory Medicine, University of Texas, Houston Medical School, 6431 Fannin Street, Houston TX 77030, ^cHuman Genome Sequencing Centre, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Alkek N1519, Houston, TX 77030, USA

DNA microarray technology was utilized to study gene expression by the syphilis spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols) during infection of rabbits. Microarrays containing all 1039 annotated ORFs of *T. pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols) were printed on glass slides. For 1034 ORFs (out of 1039), signals higher than the threshold (average of negative control spots + 3 SDs) were detected for both RNA and DNA probes. Total RNA from *T. pallidum* isolated from rabbit testes 10 days post infection was labeled and standardized by cohybridization of the same arrays with treponemal chromosomal DNA labeled with a different fluorescent marker. This internal standardization technique proved to be highly reproducible and to decrease the impact of variables such as host nucleic acid contamination or variable target DNA lengths. The most highly transcribed genes were found to correlate with the most conspicuous spots identified by two dimensional gel electrophoresis, indicating that the transcript levels generally corresponded to the relative protein concentrations. Genes with high transcript concentrations included those encoding flagellar filament and cytoplasmic filament proteins, prominent lipoproteins and membrane proteins, chaperonins, proteins involved in red-ox balance, chemotaxis regulatory proteins, a V-ATPase operon, and certain metabolic enzymes such as glycolytic pathway enzymes. Independent quantitation of the expression of 84 *T. pallidum* genes using real-time RT-PCR approach yielded a high degree of correlation ($r = 0.94$). Characterization of the *T. pallidum* transcriptome during experimental infection provides further insight into the importance of gene expression levels in the survival and pathogenesis of this bacterium in the mammalian host.

**HYDROLÝZA NITRILŮ POMOCÍ ENZYMU
VLÁKNITÉ HOUBY *Aspergillus niger* K10**

**RADKA ŠNAJDROVÁ^a, L. MARTÍNKOVÁ^a,
K. NICOLAOU^a, D. CRESTIA^b, V. MYLEROVÁ^a,
J. BOLTE^b a VLADIMÍR KRÉN^a**

^aLaboratoř biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4,

^bUniversité Blaise Pascal, Clermont – Ferrand, Francie
e-mail: snajdrova@biomed.cas.cz

Nitrily jsou organické sloučeniny, které jsou vyráběny ve velkém měřítku v chemickém průmyslu (akrylonitril, acetonitril apod.) a zároveň jsou využívány jako prekurzory při syntézách amidů a kyselin. Chemická hydrolyza nitrilů má řadu nevýhodných aspektů, jako např. racemizaci, vysoké energetické nároky. Jednou z možností, jak těmto problémům předcházet, je použití mikrobiálních enzymů. Jejich nesporným přínosem jsou především stereoselektivita, regioselektivita a chemoselektivita a mírné reakční podmínky.

Pro biotransformaci nitrilů byla použita vláknitá houba *Aspergillus niger* K10 produkovající enzymy, které se účastní hydrolyzy nitrilů. Enzymy pro hydrolyzu nitrilů nebyly zatím u hub popsány. K indukci těchto enzymů docházelo v mediu obsahujícím 3-kyanopyridin. Hydrolyza nitrilové skupiny na karboxylovou byla katalyzována celými buňkami nebo buněčným extraktem. Pro studium substrátové specificity hydrolytických enzymů byly použity aromatické a arylalifatické nitrily, substituované akrylonitrily, kyanopyridiny a kyano-benzoáty. Nejefektivněji ze všech substrátů byl transformován benzonitril. Při transformaci dikyanobenzenů byla selektivně hydrolyzována pouze jedna kyanoskupina (schéma 1). Nitrilhydratasa byla aktivní v širokém rozmezí hodnot pH (4–9). Maxima aktivity bylo dosaženo při pH 7. Při hydrolyze nitrilů pomocí buněčného extraktu byly detegovány amidy, jejichž vznik je katalyzován enzymem nitrilhydratasou. Přítomnost tohoto enzymu nebyla zatím prokázána u jiných vláknitých hub.

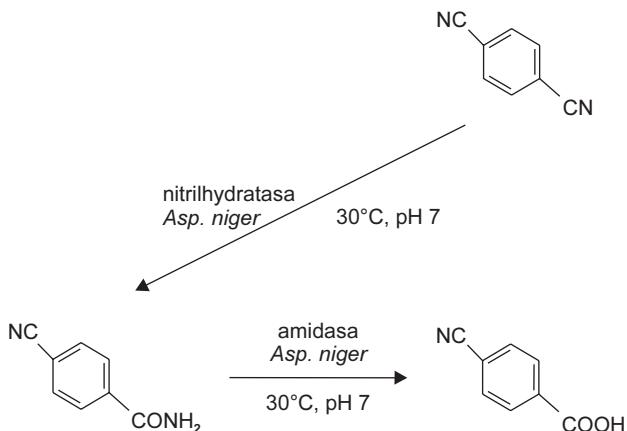


Schéma 1

Tento projekt je financován následujícími granty: A 4020213 GA AV ČR, ME 579 MŠMT, OC D25.001 MŠMT a BARRANDE 2002-020-1, výzkumný záměr MBÚ AVOZ 5020903.

SYNTÉZA GLYKOSIDŮ 2-SUBSTITUOVANÉHO CYKLOHEXANOLU

**PAVLA SOCHŮRKOVÁ, MARIE ZAREVÚCKA
a ZDENĚK WIMMER**

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

Do série bioanalogů hmyzích juvenilních hormonů (juvenilek) patří také deriváty 2-substituovaného cyklohexanolu nesoucí karbamátovou skupinu (např. ethyl-N-[2-[4-(2-hydroxycyklohexylmethyl)fenoxyl]ethyl]karbamát; *II*). Přípravu této sloučeniny jsme prováděli redukcí ethyl-N-[2-[4-(2-oxocyklohexylmethyl)fenoxyl]ethyl]karbamátu (*I*; schéma 1) chemickou i enzymatickou cestou. Produktem těchto redukcí jsou racemické nebo chirální alkoholy, které byly použity pro přípravu alkylglykosidů (juvenogenů). Juvenogeny jsou látky, které se vyznačují nízkou biologickou aktivitou, ale jsou schopné po aplikaci do organismu uvolňovat biologicky aktivní část molekuly (juvenilek) biotickou cestou. Během tohoto výzkumu jsme se zaměřili na přípravu alkylglykosidů (*IVa,b*) výše uvedených alkolů (akceptorů glykosylu) pomocí derivátů bromglukosy (*IIIa*) a bromgalaktosy (*IIIb*) (donorů glykosylu). Glykosylace jsme prováděli Koenigsovou-Knorrovou metodou (schéma 1) za přítomnosti promotoru (CdCO_3).

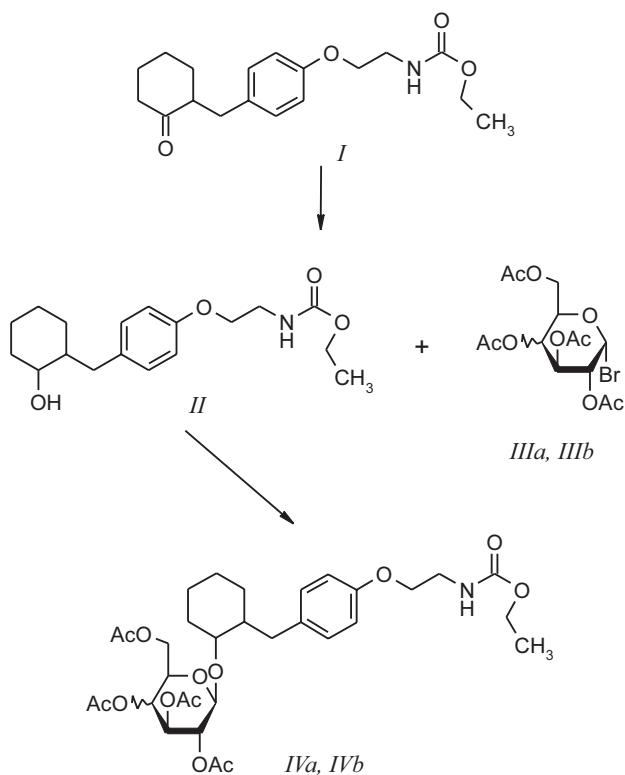


Schéma 1

Autoři děkují za finanční podporu tohoto výzkumu grantu GA ČR 203/02/0166.

LITERATURA

1. Schmidt R. R., Jung K.-H., v: *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Hanessian S., ed.), str. 283. Dekker 1997.

SYNTÉZA DERIVÁTŮ THIACALIX[4]ARENU S VOLITELNOU FLEXIBILITOU MAKROCYKLU

**VÁCLAV ŠŤASTNÝ^a, PAVEL LHOTÁK^a,
IVAN STIBOR^a, HANA PETŘÍČKOVÁ^b
a JAN SÝKORA^b**

^aKatedra organické chemie a ^bKatedra chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: stastnyv@vscht.cz

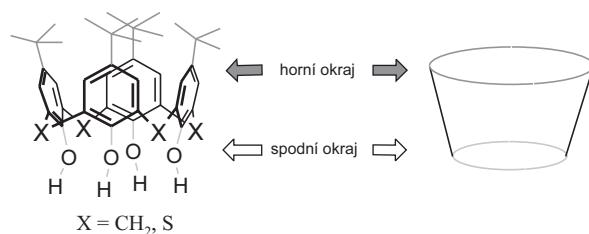
Calix[n]areny¹ (obr. 1) a jejich deriváty hrají v posledních letech důležitou roli v oblasti supramolekulární chemie, zvláště v procesech self-assembly² a v syntéze receptorů pro komplexaci iontů i organických molekul³.

V současné době je v oblasti calixarenové chemie značná pozornost upřena k thiocalixarenům (obr. 1), kde jsou můstkové methylenové skupiny nahrazeny atomy síry⁴. Zjistilo se, že některé jejich vlastnosti jsou v chemii calixarenů bezprecedentní⁵. Vnesení atому síry do molekuly calixarenu znamená přítomnost nového reakčního centra v makrocyclu a s tím spojenou novou možnost jeho derivatizace i další substituce spodního a horního okraje thiocalix[4]arenu^{6–8}.

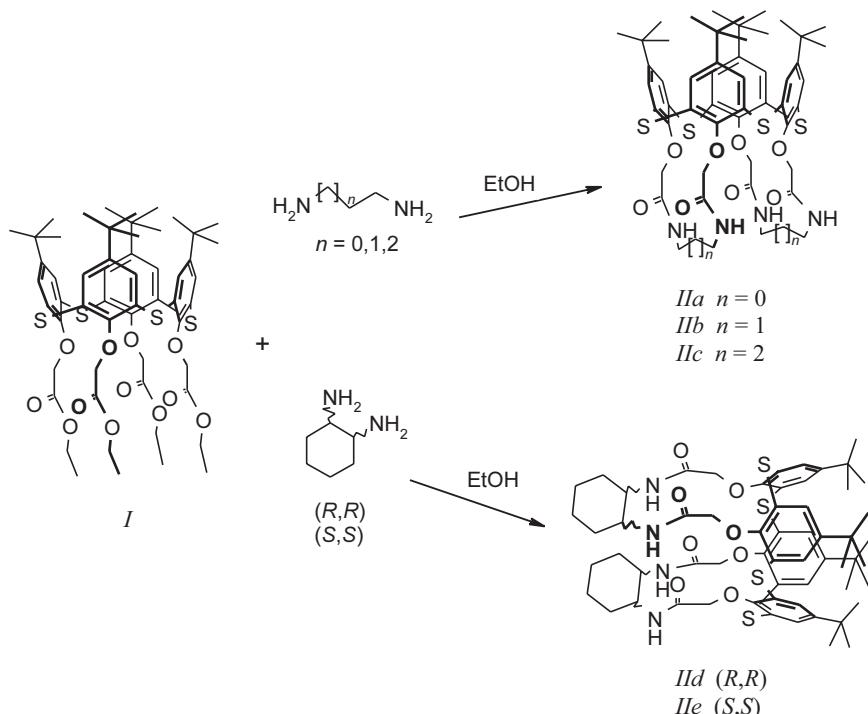
V naší práci jsme navázali na předešlé zkušenosti s derivací spodního okraje thiocalix[4]arenu a využili námi dříve připraveného⁹ cone konformeru „tetraacetátu“ *I* (obr. 2). Jeho aminolýzou¹⁰, účinkem alifatických α,ω -diaminů byla připravena zajímavá série derivátů *IIa–c* s intramolekulárně přemostěným spodním okrajem.

Tyto molekuly zaujmají v tuhému stavu i v roztoku cone konformaci a díky netypickému proximálnímu přemostění fenolických jader vykazují *C*2*V* symetrii. Tato jednoduchá syntetická transformace s sebou přinesla řadu nových možností. Volbou amidických můstků různé délky jsme dosáhli rozdílné flexibilitě jednotlivých makrocyclů. Použitím chirálního diaminu (*R,R*- nebo *S,S*-diaminocyklohexanu) jsme doplnili k příslušným thiocalixarenovým enantiomerům *IId,e*. Dále se nám do budoucna nabízí možnost přípravy inherentně chirálních thiocalix[4]arenů s *C*2 symetrií.

Z vyřešených krystalových struktur *IIa–c* je patrné, že tyto deriváty představují makrocyclické struktury s velmi dobré preorganizovaným systémem amidických funkcí. Spojíme-li s tímto faktorem přítomnost můstkových atomů síry a zmíněnou



Obr. 1.



Obr. 2.

možnost ovlivnění flexibilitu, mohly by být tyto makrocyclky vhodnými ligandy pro koordinaci lanthanidových iontů (Tb^{3+} , Eu^{3+} , Sm^{3+} a Pr^{3+}). Podobné komplexy na bázi thiocalix-[4]arenů jsou v poslední době zkoumány v důsledku své vysoké luminiscenční schopnosti¹¹. Podle předpokladů uvedených v cit.¹¹ by navíc vhodná substituce spodního okraje thiocalixarenu měla v těchto případech značně zvyšovat luminiscenci v důsledku snadnější inkluze daného iontu a vyloučení koordinace molekul rozpouštědla s rušivými účinky. Právě amidické skupiny se již dříve ukázaly být vhodnými kandidáty¹².

Další syntetickou modifikací, kterou se nyní intenzivně zabýváme, je oxidace můstkových atomů síry. Na příkladu derivátu IIa budou diskutovány možnosti oxidace můstkových atomů síry. Volbou vhodného činidla zde lze dosáhnout zajímavé chemo- i regioselektivity.

LITERATURA

- Asfari Z., Böhmer V., Harrowfield J., Vicens J. (Eds.): *Calixarenes 2001*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001.
- Rudkevich D. M.: *Calixarenes 2001*, 155.
- Arduini A., Pochini A., Secchi A., Uguzzoli F.: *Calixarenes 2001*, 457.
- Kumagai H., Hasegawa M., Miyanari S., Sato Y., Hori T., Ueda S., Kamiyama H., Miyano S.: *Tetrahedron Lett.* **38**, 3971 (1997).
- Lhoták P., Dedic M., Stibor I., Petříčková H., Sýkora J., Hodačová J.: *Chem. Commun.* **8**, 731 (2001).
- Mislin G., Graf E., Hosseini M. W., Cian A., Fischer J.: *Chem. Commun.* **13**, 1345 (1998).
- Katagiri H., Iki N., Hattori T., Kabuto C., Miyano S.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 779 (2001).

- Lhoták P., Svoboda J., Stibor I., Sýkora J., *Tetrahedron Lett.* **43**, 7413 (2002).
- Lhoták P., Šťastný V., Zlatušková P., Stibor I., Michlová V., Havlíček J., Sýkora J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **65**, 757 (2000).
- Yong Wu, Xiao-ping Shen, Chung-ying Duan, Yong-jiang Liu, Zheng Xu: *Tetrahedron Lett.* **40**, 5749 (1999).
- Iki N., Horiuchi T., Oka H., Koyama K., Morohashi N., Kabuto C., Miyano S.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* **11**, 2219 (2001).
- Pochini A. et al.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 878.

POLYMORFISMY V ABCG5 A ABCG8 TRANSPORTÉRECH A LIPIDY V PLAZMĚ

JANA ŠTEFKOVÁ, JAROSLAV HUBÁČEK a RUDOLF POLEDNE

*Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, Institut klinické a experimentální medicíny, Centrum experimentálního výzkumu chorob srdce a cév, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4
e-mail: jana.stefkova@mk.cvut.cz*

Kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou předčasného úmrtí ve všech vyspělých státech. Jedním z hlavních rizikových faktorů předčasného onemocnění kardiovaskulární chorobou je vysoká hladina lipidů v plazmě. Přispěvek genetických a environmentálních faktorů na hladinu lipidů v plazmě je přibližně stejný. ABCG5 a ABCG8 transportéry jsou zodpovědné za transport sterolů. Tyto proteiny mají nápadnou homologii v genové struktuře. Mutace v těchto genech způsobuje vzácnou formu onemocnění zvanou β -sitosterolemie.

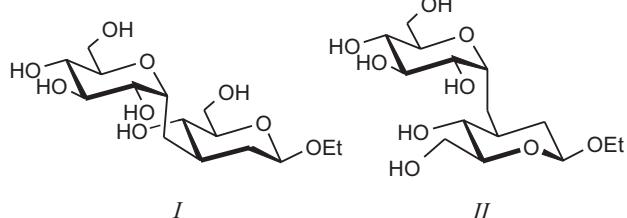
Naše práce se zabývá analýzou polymorfismů způsobující aminokyselinové záměny v ABCG5 (C1950→Gln604Glu) a ABCG8 (G145C→Asp19His, A251G→Tyr54Cys, C1289A→Thr400Lys a C1984T→Ala632Val) a jejich vlivem na hladinu lipidů v plazmě. Použitím PCR a restrikční analýzy jsme měřili polymorfismy ve dvou studovaných vzorcích. První vzorek zahrnuje dvě skupiny dětí, nízkcholesterolemickou (86 dětí) a vysokcholesterolemickou (82 dětí) skupinu, které byly vybrány z opačných částí distribuční křivky cholesterolemie 2000 dětí. Druhým studovaným vzorkem byla 8 letá cohorta 1 % reprezentativního vzorku české populace vybrané v roce 1988 ve věkové skupině 25–64 let. V roce 1996 byla tato skupina znova vyšetřena. Jedná se o 131 nepříbuzných mužů a 154 žen. Z našich výsledků je zřejmé, že tři polymorfismy mají spojitost s koncentrací lipidů v plazmě. U vysokocholesterolemických jedinců měli nositelé alely Asp19Asp vyšší cholesterol než jedinci nesoucí alelu s His ($5,55 \pm 0,65$ vs. $4,99 \pm 0,19$, $p < 0,001$). Dále bylo zjištěno, že pokles celkového a LDL cholesterolu mezi roky 1988 a 1996 je u mužů determinován jiným polymorfismem než u žen. U mužů se projevil vliv polymorfismu Thr400Lys, kdy u jedinců nesoucích alelu Thr400Thr byl pokles u celkového cholesterolu z $6,42 \pm 0,84$ na $5,51 \pm 0,57$, $p < 0,03$ a u LDL cholesterolu z $3,96 \pm 0,21$ na $3,34 \pm 0,16$, $p < 0,04$. U žen se projevil vliv polymorfismu Tyr54Cys. Největší pokles byl zaznamenán u jedinců nesoucích alelu Tyr54Tyr a to u celkového cholesterolu z $6,00 \pm 0,67$ na $5,53 \pm 0,62$, $p < 0,04$ a u LDL cholesterolu z $3,75 \pm 0,21$ na $3,21 \pm 0,14$, $p < 0,03$.

STEREOSELEKTIVNÍ PŘÍSTUP K SYNTÉZE α -(1→3)-C-DISACHARIDŮ OBSAHUJÍCÍCH DEOXYHEXOPYRANOSU

PETR ŠTĚPÁNEK a LADISLAV KNIEŽO

Ústav chemie přírodních láttek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: petr.stepanek@vscht.cz

Zjištění, že oligosacharidy hrají důležitou roli v mezibuněčné komunikaci, vyvolalo vlnu zájmu o sacharidy a jejich analogu. V poslední době se pozornost soustředila na jejich využití jako potencionálních inhibitory glykosidas, resp. glykosyltransferas, které patří k nejdůležitějším enzymům řídícím základní funkci organismu¹. Jednou ze skupin intenzivně studovaných láttek, které vykazují zajímavou biologickou aktivitu, jsou C-disacharidy, což jsou analogu O-disacharidů, ve kterých je glykosidický atom kyslíku nahrazen methylenovou skupinou, címž se tyto látky stávají odolné vůči glykosidasám.



Dosavadní způsoby přípravy C-disacharidů byly hlavně postaveny na vytvoření C-C vazby mezi dvěma monosacharidy, popř. na tvorbě C-C vazby mezi monosacharidem a bicyklickou sloučeninou^{1,2}.

Prezentovaný přístup je založen na postupném budování nové dideoxyhexopyranosy spojené s původním sacharidem -CH₂- skupinou. Umožňuje tedy za použití snadno dostupných syntonů připravit široké spektrum nových α -(1→3)-C-disacharidů, kde má nová dideoxyhexopyranosa konfiguraci D-, nebo L- (I, II).

Práce byla provedena v rámci řešení výzkumného zámeru MŠMT č. 223300006.

LITERATURA

1. Du Y., Linhardt P. J., Vlahov I. R.: Tetrahedron 54, 9913 (1998).
2. Chapleur Y., ed.: *Carbohydrate Mimics: Concepts and Methods*. Wiley, Weinheim 1998.

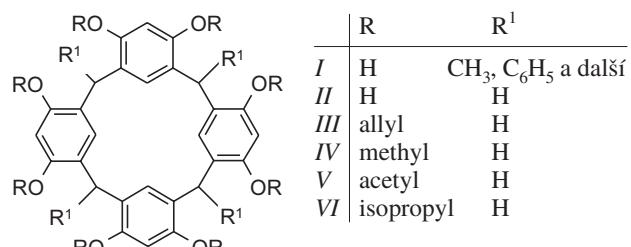
OKTA-O-ISOPROPYLCALIX[4]RESORCINAREN A PARCIÁLNÍ ODŠTĚPENÍ CHRÁNÍCÍH SKUPIN

JAN ŠTURSA, JITKA MORAVCOVÁ a HANA DVOŘÁKOVÁ

Ústav chemie přírodních láttek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Calix[4]resorcinareny typu I jsou velmi často studované látky využitelné jako stavební bloky v supramolekulární chemii¹. Resorcinaren II byl studován méně už z toho důvodu, že ho nelze připravit jednoduchou kysele katalyzovanou kondenzací formaldehydu a resorcinolu. Dopsud popsané práce využívají cestu přes oktaallylether III nebo oktamethylether IV, které byly připraveny ve výtěžku 54 a 34 % z příslušného 2,4-dialkoxybenzylalkololu za přítomnosti Sc(OTf)₃ po 5 hodinách². Pokud byla reakce katalyzována kyselinou trifluorocetovou, oktamethylether IV byl izolován ve výtěžku 95 % po 18 hodinách reakce. Chránící skupiny byly z methyletheru IV odstraněny pomocí BBr₃ a resorcinaren II byl izolován ve formě oktaacetátu V, přičemž výtěžek³ této dvou kroků byl 25 %.

My jsme jako výchozí látku zvolili dosud nepopsaný 2,4-diisopropoxybenzylalkohol, který jsme připravili alkylací 2,4-dihydroxybenzaldehydu a následnou hydrogenací v celkovém výtěžku 85 %. 2,4-Diisopropoxybenzylalkohol poškytl v přítomnosti (CH₃)₃SiCl během 1 hodiny za normální



teploty oktaisopropyletheru VI, který jsme izolovali krystalický ve výtěžku 94 % bez jakékoliv čistící operace.

Při odstraňování chránících skupin z oktaisopropyletheru VI pomocí BCl_3 jsme zjistili, že etherové vazby se štěpí postupně a vznikají tak parciálně alkylované resorcinareny. Jednotlivé produkty jsme izolovali a charakterizovali.

Práce byla podporována VZ 223300006.

LITERATURA

1. Timmerman P., Verboom M., Reinhoudt D. N.: Tetrahedron 52, 2663 (1996).
2. Konishi H., Sakakibara H., Kobayashi K., Morikawa O.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1999, 2583.
3. Olusegum M. F., Al-Farhan E., Keehn P. M., Stevenson R.: Tetrahedron Lett. 35, 65 (1994).

REKOMBINANTNÍ VIRUS VAKCÍNIE EXPRIMUJÍCÍ UPRAVENÝ PROTEIN E7 LIDSKEHO PAPILLOMAVIRU HPV-16 A INTERLEUKIN IL-12 JAKO MODELOVÁ VAKCÍNA PROTI NÁDORŮM VYVOLANÝM PAPILLOMAVIRY

**JANA ŠUBRTOVÁ, LUĎA KUTINOVÁ,
ŠÁRKA NĚMEČKOVÁ, PETR HAINZ,
VOJTĚCH ŠROLLER, PAVEL GABRIEL,
a PAVEL OTÁHAL**

Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 120 00 Praha 2

Souvislost mezi vznikem rakoviny děložního čípku člověka a infekcí vysokorizikovými typy papillomavirů (např. HPV-16, HPV-18) byla v minulých letech bez pochyb prokázána. Mnoho světových laboratoří se proto velmi intenzivně věnuje studiu jejich vzájemného vztahu a zejména vývoji účinné a zároveň bezpečné vakcíny pro prevenci a léčbu nádorů vyvolaných papillomaviry.

V naší laboratoři se zabýváme přípravou vakcín založených na rekombinantním viru vakcínie (rVV), který je vhodným vektorem zejména pro svou schopnost pojmut značné množství cizí DNA a účinně ji exprimovat v různých typech buněk. Dalším kladem je nepochyběně velká zkušenosť s použitím vakcín v očkovací praxi v minulosti.

Pro případné praktické využití je pochopitelně třeba použít vektor maximálně bezpečný, který by si zároveň zachoval schopnost účinně imunizovat. Proto k našim konstrukcím používáme vakcínový kmen MVA (Modified Virus Ankara), který má delece v celé řadě genů, takže se ve většině savčích buněk téměř nebo vůbec nereplikuje. Jeho imunizační schopnosti testujeme. Pracujeme též s kmenem Praha 13 (P13), který je virulentnější, ale má dobré imunizační vlastnosti.

Účinnost imunizace testujeme na myším modelu *in vivo* i *in vitro*. Po imunizaci virem myši čelenžujeme nádorovými buňkami TC-1 a sledujeme růst nádorů. *In vitro* testujeme buňčnou imunitu, a to dvěma testy, IFN-γ ELISPOT a „tetramer testem“.

Po odebrání slezin izolujeme lymfocyty, které používáme

pro testy imunity přímo nebo je *in vitro* restimulujeme peptidem HPV-16 E7(49–57). Testem ELISPOT detegujeme množství buněk produkcujících IFN-γ, „tetramer testem“ přímo zjistíme množství cytotoxických T-lymfocytů specifických pro peptid HPV-16 E7(49–57). Pracujeme s MHC-I tetramerem H-2Db/HPV-16 E7(49–57), který specificky fluorescenčně označí příslušné CTL, což pak změříme na průtokovém cytometraru.

Dobré imunizační vlastnosti po podání viru exprimujícího fúzní protein Sig E7 LAMP, u kterého je zajištěna lokalizace E7 v endozomálním a lyzozomálním kompartmentu¹, jsme již ověřili v minulosti. Snažíme se však nalézt imunizační agens ještě lepšími vlastnostmi. Zkonstruovali jsme dvojitě rekombinantní virus, který kromě Sig E7 LAMP exprimuje ještě obě podjednotky cytokinu interleukinu 12 (IL-12), který by měl pozitivně působit na regresi nádoru².

V imunizačních experimentech jsme pokusy *in vivo* a *in vitro* zjistili, že virus MVA Sig E7 LAMP vyvolává podstatně slabší imunitní odpověď než P13 Sig E7 LAMP. U dvojité rekombinanty MVA Sig E7 LAMP IL-12 se imunitní odpověď vzhledem k jednoduché rekombinantě MVA Sig E7 LAMP prakticky nezměnila. Vložení genů pro IL-12 do viru P13 SigE7LAMP výrazně snížilo jeho imunogennost, což je vyšetřitelné zjištěným značným omezením množení tohoto víru oproti rodičovské rekombinantě. Podání P13 Sig E7 LAMP IL-12 byla díky přítomnosti IL-12 výrazně inhibována.

Hledali jsme tedy jinou možnost jak uplatnit pozitivní vliv IL-12 na imunitní odpověď Th1 proti nádorovému antigenu E7. Možný způsob se nám projevil při jiném způsobu podání, a to po imunizaci myšími dendritickými buňkami (DB) infikovanými rVVvakcíni. Z pokusu *in vivo* vyplývá, že dendritické buňky mají adjuvantní účinek na obě jednoduché rekombinanty P13 SigE7LAMP a MVA SigE7LAMP, avšak koexpressie IL-12 u obou vírusů efekt DB významně snižuje.

LITERATURA

1. Lin K. Y., Guarneri F. G., Staveley-O'Carroll K. F., Levitsky H. I., August J. T., Pardoll D. M., Wu T. C.: Cancer Res. 56, 21 (1996).
2. Chen B., Timiryasova T. M., Andres M. L., Kajioka E. H., Dutta-Roy R., Gridley D. S., Fodor I.: Cancer Gene Ther. Nov. 7, 1437 (2000).

REDUKČNÍ LÁTKA DITHIOTHREITOL USNADŇUJE AKTIVACI VANILOIDNÍHO RECEPTORU TRPV1

**K. SUŠÁNKOVÁ, A. LYFENKO, V. VLACHOVÁ,
J. TEISINGER a L. VYKLICKÝ**

*Oddělení buněčné neurofyziologie, Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha
e-mail: susinka@biomed.cas.cz*

Vaniloidní receptor (TRPV1) je u savců specificky exprimován na membránách malých neuronů zadních kořenů mísňích, kde se podílí na přenosu bolestivých podnětů. TRPV1 je aktivován nejen chemicky, kapsaicinem (EC50 ~ 0,3 μM)

a slabými kyselinami (pH 5,0–5,5), ale také fyzikálně-bolestivým teplem (43–52 °C). Dosud není znám mechanismus, kterým bolestivé stimuly vyvolávají strukturální změny receptoru vedoucí k jeho aktivaci. Existence tří extracelulárních cysteinových zbytků v pozicích 616, 621 a 634 v oblasti kličky pórů TRPV1 nás přivedla k otázce, zda a do jaké míry je aktivita TRPV1 modulována změnou redox stavu SH skupin.

Zjistili jsme, že redukční látka DL-dithiothreitol výrazně zvyšuje membránovou odpověď vyvolanou bolestivým teplem a kapsaicinem (1 µM) jak u populace malých neuronů ganglií zadních kořenů mišních (<20 µm) izolovaných z potkaná, tak u buněk tkáňových kultur HEK293T transfekovaných genem TRPV1. Účinek DTT je koncentračně závislý a plně reverzibilní. Aktivita rekombinantního receptoru TRPV1 je v přítomnosti 2 mM DTT statisticky významně zvýšena (9,1±5,8x při 25 °C a 1,5±0,2x při 45 °C; n = 19).

Za účelem identifikace cysteinového zbytku, který se uplatňuje v tomto jevu, byly připraveny konstrukty genu TRPV1, kde je vždy jeden cysteinový zbytek nahrazen za neutrální zbytek glycinový.

Poměr volných –SH skupin a disulfidických můstků cysteinových zbytků TRPV1 významně ovlivňuje citlivost primárních nociceptorů k algogenům, a lze tedy předpokládat, že opačný účinek – oxidace TRPV1 – by mohl představovat možný terapeutický prostředek k léčbě některých bolestivých stavů u lidí.

Práce vznikla za podpory grantu GA ČR 305/03/082.

VÝVOJ ELISA TESTU PRO STANOVENÍ PROGESTERONU V MLÉCE

J. SWACZYNOVÁ, R. SIMERSKÝ a M. STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, ÚEB Akademie věd České republiky a Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc

Progesteron patří mezi pohlavní hormony steroidní povahy a je produkovaný cykujícím nebo gravidním žlutým těliskem. U krav se progesteron podílí na zachování březosti a zabraňuje předčasným děložním stahům. Pomocí určení koncentrace progesteronu v kravském mléce nebo krevním séru lze snadno určit, v jaké fázi pohlavního cyklu se plemenice nachází a upřesnit tak dobu nejhodnější k její inseminaci.

V naší laboratoři byly vyvinuty polyklonální protilátky (M1, M4, P3) proti progesteronu. Antisera byla získána imunizací králíků konjugátem 11 α -hydroxyprogesteron hemisukcinátu s hovězím sérovým albuminem (BSA). Tento konjugát byl připraven metodou směsných anhydridů. K přípravě enzymaticky značeného antigenu (11 α -hydroxyprogesteron hemisukcinát-peroxidasa) byla použita metoda aktivovaného esteru. Opakovou imunizací králíků byla získána pozitivní antisera, ze kterých byly vyizolovány aktivní protilátky srážením (NH₄)₂SO₄ a následnou dialýzou. Charakteristiky polyklonálních protilátek byly studovány na základě kompetitivní enzymové imunoanalyzy (ELISA). Specifita protilátek byla studována pomocí křížových reaktivit s příbuznými steroidními látkami. Hodnoty křížových reaktivit se pohybují v rozmezí 0,02–38,1 % (19 – norprogesteron).

ELISA testem s využitím protilátek M1 byly následně úspěšně studovány vzorky mléka (vzorky byly odebírány z tzv. celkového nádoje). Z výsledků vyplývá, že tento ELISA test je vhodný k popisu průběhu reprodukčního cyklu u krav (koncentrace progesteronu se pohybuje v rozmezí 15–40 ng.ml⁻¹ mléka). K popisu jednotlivých fází estrálního cyklu (koncentrace progesteronu se pohybuje mezi 0,5–20 ng.ml⁻¹ mléka) je sestavený ELISA test zatím málo citlivý. Zvýšení citlivosti testu předpokládáme zavedením zesilovacího systému, založeného na vazebné interakci mezi biotinilizovaným 11 α -hydroxyprogesteron hemisukcinátem a enzymaticky značeným avidinem. Na této problematice v současnosti usilovně pracujeme.

PŘÍSPĚVEK K NOVÝM ANORGANICKÝM HETEROCYKLICKÝM SLOUČENINÁM FOSFAZENOVÉHO TYPU

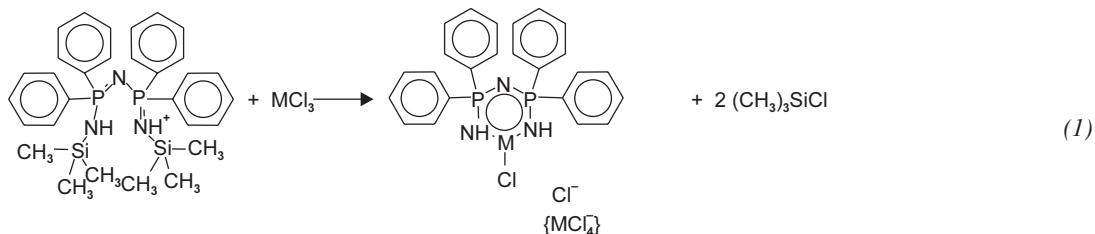
JAN TARABA a ZDIRAD ŽÁK

*Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: taraba@chemi.muni.cz*

Anorganickým heterocyklickým sloučeninám je zvláště pak v poslední době, věnována značná pozornost, nejen kvůli možnosti průzkumu vztahu vazebních možností a molekulové struktury, ale i stele častější využívání heterocyklických sloučenin, obsahujících kovy i nekovy, v praxi. Možnosti využití jsou např. pokovování ve vakuu, homogenní katalýza, využití biologické aktivity (zemědělské ochranné prostředky, léčiva, selektivní jedy) atd.

V odborné literatuře jsou uváděny obecné trendy přípravy 6-ti členných cyklických sloučenin fosfazenového typu obsahující ve své struktuře heteroatom. Na počátku připrav 6-ti členných heterocyklů byl objev látky „Imidobis(aminodifenylyfosforan) chlorid“ (Ph₂PNH₂)₂NCl (cit.¹). Z této publikace vychází celá řada prací zabývajících se syntézou a strukturou 6-ti členných heterocyklů. Za všechny uvedeme přípravu heterocyklů^{2,3} přechodných kovů (W, V, Re ...) všechny reakce v pracích popisované jsou reakce mezi halogenidy přechodných kovů a (Ph₂PNH₂)₂NCl (při reakci se uvolňuje HCl a reakce je většinou rovnovážná). Pokud jde o přípravu heterocyklů s nepřechodnými kovy i nekovy uvedeme práci⁴ (heterocyky s Al, Ga a In), ve které autoři volí postup přípravy přes sloučeniny typu MM₃ (M = Al, Ga, In) reakcí s HN(PR₂NHSiMe₃)₂ (R = Ph, NMe₂) a odštěpení molekuly methanu. Nevhodou tohoto postupu je obtížné získávání reaktantů a malá výtěžnost reakce.

V našem základním výzkumu této problematiky jsme zvolili pro přípravu nových heterocyklů reakci halogenidů nepřechodných kovů i nekovů s N,N'-bistrimethylsilyl-tetrafenyldifosfazan chloridem N(Ph₂PNHSiMe₃)₂Cl. Výhodou námi zvoleného syntetického postupu je vysoká výtěžnost reakcí a čistota získaných produktů. Z reakčního systému odpadá trimetylchlilosilan jako vedlejší produkt a zároveň zde slouží jako rozpouštědlo. Tento syntetický postup se nám jeví jako nejvhodnější a s jeho pomocí se nám podařilo připravit několik nových 6-ti členných anorganických heterocyklic-



kých sloučenin. Probíhající chemická reakce se dá zapsat obecnou rovnicií (I).

LITERATURA

1. Cox J. W.: Chem. Commun. 1969, 205.
2. Roesky H. W., Katti V.: Angew. Chem. 98, 447 (1986).
3. Katti V., Roesky H. W.: Inorg. Chem. 26, 4032 (1987).
4. Roesky H. W., Heine A.: Z. Naturforsch., B: Chem. Sci. 48, 43 (1993).

SYNTÉZA HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH HETEROCYKLŮ: NOVÝ ZPŮSOB PŘÍPRAVY NERACEMICKÝCH AZAHELICENŮ¹

FILIP TEPLÝ, IRENA G. STARÁ *,
IVO STARÝ * a DAVID ŠAMAN

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

Renesance zájmu o heliceny v posledních 10 letech souvisí s rozvojem jejich syntetické metodologie a se slibnými aplikacemi těchto látek v oblasti enantioselektivní katalýzy, molekulového rozpoznávání a materiálové chemie. Další možné využití naznačují teoretické studie, podle nichž by se heliceny měly chovat jako miniaturní pružiny a měly by vykazovat významné vodivostní vlastnosti. Vedle klasické fotochemické

přípravy helicenů, která je v řadě případů nevhodná, se v poslední době objevily dvě metody, jejichž potenciál dokumentuje řada úspěšných syntéz helicenů a jejich derivátů. Přes tento významný pokrok neexistovala až do nedávne doby spolehlivá metoda přípravy azahelicenů, kterých bylo s velkými obtížemi připraveno v minulosti jen několik derivátů v racemické formě^{2,3}. Koordinace tranzitních kovů k „pyridinovému“ dusíku spolu s možnou strukturní rozmanitostí azahelicenového skeletu předurčuje tyto látky k řadě aplikací v asymetrické syntéze a supramolekulární chemii.

Zjistili jsme, že námi vyvinutý způsob přípravy helicenů, který je založen na [2+2+2] cykloisomeraci aromatických trijnů za katalýzy tranzitními kovy^{4–6} lze s výhodou použít i při syntéze azahelicenů a jejich derivátů. Tímto postupem, který je modulární, konvergentní a poskytuje dobré preparativní výhody, byly připraveny látky I a II. Je-li zavedeno centrum chirality do molekuly trijnu, [2+2+2] cykloisomerace probíhá s vysokou diastereoselektivitou (III→IV). Otevírá se tak schůdný syntetický přístup k azahelicenům a jejich derivátům v neracemické formě.

LITERATURA

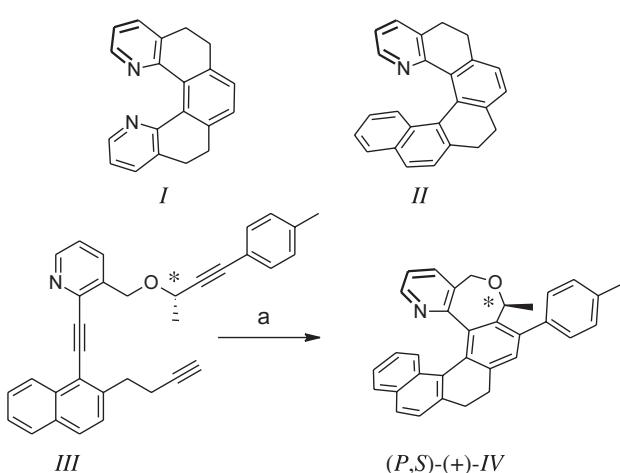
1. Podporováno GA ČR (reg. č. 203/02/0248) a ÚOCHB AV ČR (výzkumný projekt č. Z4 055 905).
2. Martin R. H., Deblecker M.: Tetrahedron Lett. 10, 3597 (1969).
3. Staab H. A., Diehm M., Krieger C.: Tetrahedron Lett. 35, 8357 (1994).
4. Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Teplý F., Šaman D., Tichý M.: J. Org. Chem. 63, 4046 (1998).
5. Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Teplý F., Vyskočil Š., Šaman D.: Tetrahedron Lett. 40, 1993 (1999).
6. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Rulíšek L., Fiedler P.: J. Am. Chem. Soc. 124, 9175 (2002).

EFFECT OF EXTRACTS FROM *Smallanthus sonchifolius* LEAVES ON RAT HEPATOCYTES AND HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS

KATEŘINA VALENTOVÁ

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
e-mail: kata.valentova@email.cz

Yacon, *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) is a native Andean plant, cultivated for its tubers throughout South Amer-



a: CpCo(CO)₂ (20 %), PPh₃ (40 %), dekan,
140°C, 1 h, halogenová lampa, 54 %

rica where they are commonly used by diabetics and persons suffering from digestive problems. 1,2- β -Oigofructans, its main saccharides, are used as prebiotics to correct the intestinal flora and absorption of elements such as calcium, magnesium and iron. Positive physiological properties have also been attributed to yacon leaves in Brazil in particular, where the dried leaves are used to prepare a medicinal tea. Recently, we have reported antioxidant activity of an extract from *S. sonchifolius* leaves in relation to its phenolic content¹. In this contribution, we describe:

1. The effect of organic (I, II) and aqueous (III, IV) extracts from *S. sonchifolius* leaves on rat hepatocytes isolated by two-step collagenase perfusion of the liver. Protective effect of the extracts against oxidative injury (*tert*-butylhydroperoxide, 0.5 mM, 1.5 h and allyl alcohol, 0.2 mM, 4 h) of hepatocyte primary cultures was assessed by: cell viability (MTT test), the level of released LDH (test of membrane integrity) and lipoperoxidation products reacting with thiobarbituric acid (TBARS). The effect on glucose production from different precursors (lactate/pyruvate, dihydroxyacetone and aspartate) was evaluated in suspensions of hepatocytes isolated from 24 h starved rats in comparison with metformin (1,1-dimethylbiguanide). We demonstrated a dose-dependent protective effect in concentrations ranging from 1 to 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and a significant reduction of gluconeogenesis in the presence of 1 mg.ml^{-1} of an aqueous extract IV. Ongoing studies to evaluate the effects of extracts on glycogenolysis *in vitro* as well as *in vivo* are in progress.

2. The effect of extracts (I–IV) on hydrogen peroxide (100 mM, 1 h) induced oxidative damage of human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC). The extracts I and II displayed protective effects against oxidative damage of the HUVEC at 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ on MTT test and on level of apoptosis related enzymes.

This work was supported by the grants GA CR 303/01/0171 and MSM 151100003.

REFERENCES

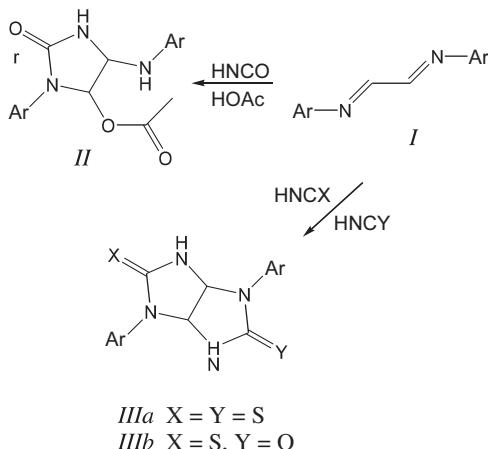
1. Valentová K., Cvák L., Muck A., Ulrichová J., Šimánek V.: Eur. J. Nutr. 42, (2003), in press.

CRISS-CROSS CYKLOADICE NA AROMATICKÝCH GLYOXALIMINECH

JIRÍ VERNER a MILAN POTÁČEK

Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: jverner@chemi.muni.cz

V současné době jsou celkem dobře popsány criss-cross cykloadice na 2,3-diazabuta-1,3-dienech (azinech). Cykloadice na 1,4-diazabuta-1,3-dienech (glyoxaliminech, I) jsou naproti tomu celkem vzácné. Sakamoto² a spol. popsali cykloadici aryl- a benzoylisokyanátů s 1,1'-biisochinolinoly a Takahashi³ studoval criss-cross cykloadice glyoxaliminů s trimethylsilylisothiokyanátem, kde produktem jsou perhy-



droimidazo[4,5-*d*]imidazol-2,5-dithiony (thioglykourily, IIIa).

Thioglykourily IIIa jsou klasickými metodami obtížně získatelné. Podle některých prací, lze získat jednoduché thioglykourily IIIa kondenzací 1,2-dikarbonylových sloučenin s thiomočvinou v alkalickém prostředí⁴. Některé práce ovšem uvádějí vznik diiminodithiadiazabicyklooctanu, jako produktu reakce thiomočvin s glyoxalem⁵. V každém případě jsou thioglykourily dostupné z glykourilů sulfurací Lawessonovým činidlem (P_2S_5) (cit.⁶).

Při studiu criss-cross cykloadicí na glyoxaliminech⁷ jsme pozorovali zvláštní chování aromatického glyoxalimu (4-methoxyfenyl) ve směsi KNCS a KNCO v kyselině octové. Zjistili jsme, že v tomto případě vzniká prakticky čistý nesymetrický 1,4-disubstituovaný 5-thioxoperhydroimidazo[4,5-*d*]imidazol-2-on (monothioglykouril, IIIb). Tento fakt nás přiměl k prozkoumání reaktivity a chování dalších aromatických glyoxaliminů, což je obsahem tohoto příspěvku. Zjistili jsme, že criss-cross cykloadice HNCS na aromatických glyoxaliminech vedou obecně k thioglykourilům IIIa a ve směsi HNCO a HNCS vznikají čisté nesymetrické criss-cross produkty monothioglykourily IIIb. Vojedinělém případě jsme pozorovali vznik adaktu meziproduktu s kyselinou octovou II, což potvrzuje představu o průběhu reakce jako sledu dvou bimolekulárních reakcí.

Metoda criss-cross cykloadice HCNS umožňuje levně a po hodlně připravovat substituované glykourily. Pro přípravu monothioglykourilů je tato nová metoda jediná známá.

LITERATURA

1. Bailey J. R., Moore N. H.: J. Am. Chem. Soc. 39, 279 (1917).
2. Sakamoto M., Tomimatsu Y., Miyazawa K., Tokoro K.: Yakugaku Zasshi. 92, 1462 (1972).
3. Takahashi M., Miyadai S.: Heterocycles 31, 883 (1990).
4. Broan C. J., Butler A. R., Reed D., Sadler I. H.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 7, 731 (1989).
5. Long Q., Hong G., Zuo G., Ding H.: Youji Huaxue 3, 170 (1982); Chem. Abstr. 96, 562876 (1982).
6. Cow C. C., Harrison P. H. M.: J. Org. Chem. 62, 8834 (1997).
7. Verner J., Taraba J., Potáček M.: Tetrahedron Lett. 43, 4833 (2002).

**DETERMINATION OF pKR^+ CONSTANTS
AND WATER-SOLUBILITY OF ALKALOIDS
SANGUINARINE AND CHELERYTHRINE
BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS**

**MARKÉTA VLČKOVÁ^{a,c}, PETR BARTÁK^b,
and RADIM VESPALEC^c**

^aDepartment of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemědělská 1, 613 00 Brno,

^bDepartment of Analytical Chemistry, Palacký University, Třída svobody 8, 771 46 Olomouc, ^cInstitute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Veveří 97, 611 42 Brno

Sanguinarine (SA) and chelerythrine (CHE) are quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids displaying a wide spectrum of biological activities. At present, plant extracts containing these alkaloids are used in toothpastes and oral rinses for their antiplaque effect. However, both alkaloids exhibit adverse side effects in addition to their desired pharmacological activity. The molecular basis of some of the negative effects has not been sufficiently explained so far. The investigation of interactions of these alkaloids with biological molecules at physiological conditions may considerably contribute to the sought explanation.

Both alkaloids occur at so called physiological pH 7.4 in two chemically different forms linked together by the protolytic equilibrium. However, published pKR^+ values¹ for this equilibrium vary in an unacceptably wide range indicating their dependence on experimental conditions. Moreover, the uncharged forms of both alkaloids are water-insoluble¹ but their solubility in aqueous solutions has not been determined yet. However, both pKR^+ values of SA and CHE relevant to the actual conditions and the solubility of their uncharged forms are necessary for the interpretation of any experiment with these alkaloids performed at physiological conditions.

Capillary zone electrophoresis as a technique chosen for the investigation of interactions of the alkaloids with biological molecules was used for the determination of pKR^+ constants of SA and CHE valid at conditions of interaction measurements and for the determination of the solubility of their uncharged forms. Moreover, the influence of the composition of the background electrolyte and of its ionic strength on pKR^+ values was investigated.

pKR^+ constants of SA and CHE valid at ionic strength of 30 mM are 8.14 ± 0.08 and 9.15 ± 0.09 , respectively. The constants were found to be dependent on the ionic strength of the background electrolyte but independent of its composition. The solubility of the uncharged form of SA and CHE is 1.76 ± 0.24 mM and 0.78 ± 0.06 mM, respectively. The total solubility of the alkaloids at any pH may be calculated using the solubility of the uncharged form and pKR^+ constants of SA and CHE because the total solubility is the sum of concentration of the dissolved uncharged form and of the charged form, which is in equilibrium with it.

The determination of the solubility using capillary zone electrophoresis is reported here for the first time.

REFERENCES

- Dostál J., Potáček M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 55, 2840 (1990).

**(2S)-2-CHLORO-2-FLUOROETHANOYL ISOKYANÁT
JAKO CHIRÁLNÍ DERIVATIZAČNÍ ČINIDLO**

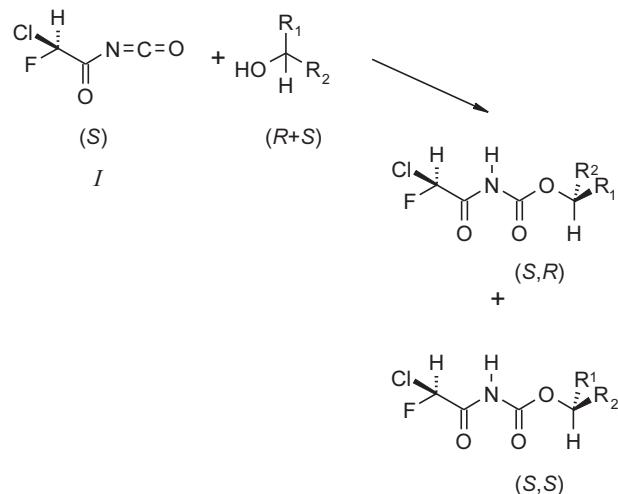
**PETR VODIČKA, LUDVÍK STREINZ,
MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ, BOHUMÍR KOUTEK
a JAN ONDRÁČEK**

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

Inspirování trichloroacetyl isokyanátem (TAI), který se široce používá při NMR analýzách alkoholů, jsme připravili (2S)-2-chloro-2-fluoroethanoyl isokyanát (*I*); jeho chirální analog.

Acylisokyanát *I*, rychlou reakcí s různými chirálními sekundárními alkoholy poskytuje diastereomerní karbamáty jejichž stereochemii jsme korelovali s $\Delta\delta$ hodnotami ^1H NMR spekter. Analýzou zjištěných $\Delta\delta$ v posunech NMR spekter ($\Delta\delta = \delta(R) - \delta(S)$) jsme odvodili pravděpodobnou konformaci vznikajících produktů, která lze využít k případnému určení absolutní konfigurace analyzovaného chirálního alkoholu. Planární konformace byla potvrzena X-Ray analýzou.

V případě směsi chirálních alkoholů je zastoupení jednotlivých složek snadno zjistitelné díky rozdílu posunu ($\Delta\delta$) na CHFCI vodíku, který má signál v oblasti 6–7 ppm, kde se většinou jiné signály neobjevují.



Nejlepších výsledků bylo dosaženo u aromatických alkoholů díky jejich silnému anisotropnímu efektu. Naopak, u jednoduchých alifatických alkoholů není patrný téměř žádných rozdílů. Do budoucího proto plánujeme přípravu nových chirálních derivátů acylisokyanátu *I*, které budou stabilnější a budou obsahovat skupinu způsobující silnější anisotropní efekt pro větší rozdíly v NMR spektrech.

**SANGUINARINE EFFECT ON OXIDATIVE BURST
IN DMSO-DIFFERENTIATED CELLS
PROCEEDS VIA AFFECTING
THE NADPH OXIDASE**

JIŘÍ VRBA and MARTIN MODRIANSKÝ

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

Sanguinarine (SA), a member of the benzophenanthridine isoquinoline alkaloids, has been shown to possess antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties. We examined the effects of SA on oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells, an excellent model for studying oxidative burst. SA inhibited both *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) and phorbol myristoyl acetate (PMA)-induced oxidative burst with very similar IC₅₀ of 1.5 µM and 1.8 µM, respectively. Although SA was shown to scavenge superoxide with IC₅₀ of 10 µM (ref.¹), in our view the inhibition of oxidative burst cannot be ascribed to antioxidant properties of SA. Here we demonstrate that the IC₅₀ for reactive oxygen species (ROS) scavenging by SA in a non-cellular generating system is greater than 100 µM. TROLOX, a water-soluble vitamin E analog, had IC₅₀ of 3 µM in the same system. Moreover, cyclic voltammetry measurements show that SA redox activity is poor, with peak anodic potential at 700 mV, as compared to TROLOX with peak anodic potential at 200 mV. On the other hand, TROLOX, when used in cell suspension, was much poorer inhibitor of oxidative burst than SA. In addition, the ability of SA to inhibit oxidative burst was impaired by 5 minute incubation of the alkaloid with 50-fold higher concentration of dithiotreitol. Therefore we hypothesized that SA affects the NADPH oxidase. Unfortunately, direct effect of SA on NADPH oxidase activity in the post-granular fraction of disrupted cells cannot be tested due to SDS interference with SA activity. The presence of SDS is required for spontaneous assembly of the NADPH oxidase complex in a non-cellular system. Consequently, we used a homologous enzyme, the NADPH:cytochrome P450 reductase from microsomes to estimate the ability of SA to inhibit electron transfer mediated by a flavocytochrome. SA inhibited NADPH:CYP reductase with IC₅₀ of 18 µM. We conclude the SA inhibition of oxidative burst is in part caused by SA affecting the activity of NADPH oxidase directly and in part by preventing the formation of NADPH oxidase protein complex.

This research was supported by MSMT grant MSM 115100003.

REFERENCES

- Ferrández M. L. Montesinos C., Ubeda A., Manez S., Payá M., Alcaraz M. J.: Planta Med. 57, A49 (1991).

VYHLEDÁVÁNÍ PROMOTORŮ *Corynebacterium glutamicum* REGULOVATELNÝCH VNĚJŠÍMI STRESOVÝMI FAKTOŘÍ

**MARTINA ZEMANOVÁ, MIROSLAV PÁTEK
a JAN NEŠVERA**

*Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: zemanovm@biomed.cas.cz*

Corynebacterium glutamicum je grampozitivní nesporující bakterie využívaná k průmyslové produkci aminokyselin. V posledních letech značně vzrostla znalost o uspořádání genů účastnících se biosyntézy různých aminokyselin, stále se však příliš mnoho neví o molekulárních signálech regulujících expresi těchto genů. Pro poznání mechanismů regulace exprese genů na transkripční úrovni má klíčový význam znalost struktury a funkce iniciačních signálů (promotorů). Promotory, které mohou být během fermentace snadno „zapnutý“ nebo „vypnutý“ působením vnějších faktorů, mohou zajistit regulované zvýšení exprese vybraných genů. Proto byly vyhledávány promotory *C. glutamicum*, které reagují na vnější stresové faktory (zvýšenou teplotu a snížené pH). chromozmová DNA kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 byla štěpena restrikční endonukleasou Sau3AI a byly izolovány vzniklé fragmenty ve velikostním rozmezí 150–500 bp. Směs těchto fragmentů byla klonována do podvojněho promoter-probe vektoru pET2, replikujícího se v *E. coli* a *C. glutamicum* a nesoucího reportérův gen cat, kódující enzym chloramfenikolacetyltransferasu. Směsí derivátů plasmidu pET2 obsahujících vložené fragmenty byly transformovány buňky *E. coli*. Tímto způsobem byla připravena knihovna potenciálních promotory *C. glutamicum* v *E. coli* tvorená zhruba 10 000 klonů. Kmen *C. glutamicum* R127, postrádající restrikčně-modifikační systém, byl transformován plazmidovou DNA izolovanou z této knihovny a transformanty byly selektovány na půdě s chloramfenikolem při různé teplotě (30 °C a 37 °C) a při různých hodnotách pH (4,5–6). Byly získány tři klony obsahující promotory *C. glutamicum* se zvýšenou aktivitou při vyšší teplotě (37 °C) a 2 klony s promotory se zvýšenou aktivitou při nižším pH (4,5–5). Jeden z promotorů aktivovaný zvýšenou teplotou byl po sekvenování přesně lokalizován na mapě chromozomu *C. glutamicum* před genem phoH, který kóduje ATPasu indukovanou hladověním na fosfát.

Dále byly na základě úplné sekvence chromozomu *C. glutamicum* metodou PCR připraveny fragmenty DNA obsahující promotory genů clpB a clpC, kódující heat shock proteiny s chaperonovou aktivitou a promotor genu sigE, kódujícího podjednotku RNA polymerasy sigmaE indukovanou působením vnějších stresových faktorů.

Lze předpokládat, že aktivita uvedených promotorů bude výrazně stimulována působením zvýšené teploty, případně i působením dalších stresových faktorů. Bude detailně analyzována struktura a funkce uvedených promotorů, případně budou jejich vlastnosti cíleně modifikovány metodami genového inženýrství.

**RECEPTORY ANIONŮ ZALOŽENÉ
NA DERIVÁTECH THIACALIX[4]ARENU**

**PETRA ZLATUŠKOVÁ, VERONIKA MICHLOVÁ,
IVAN STIBOR a PAVEL LHOTÁK**

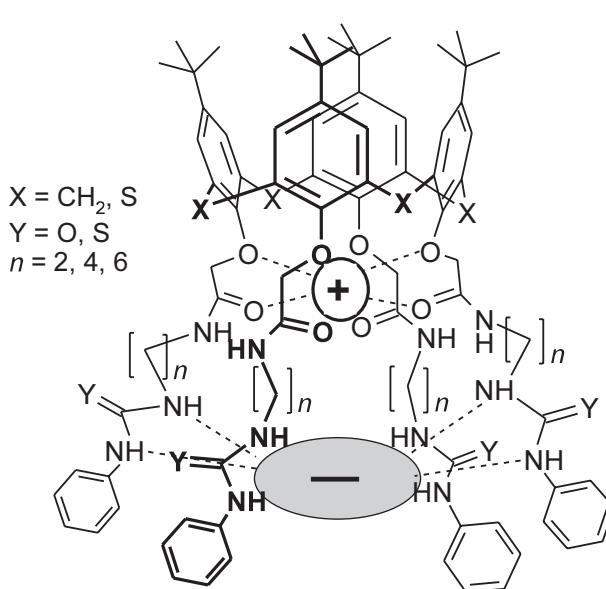
*Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Petra.Zlatuskova@vscht.cz*

Calixareny, makrocyclické ligandy vznikající bazickou kondenzací 4-*terc*-butylfenolu s formaldehydem, se v poslední době řadí mezi nejběžněji používané molekuly pro syntézu receptorů iontů i neutrálních molekul. Teprve před několika lety byl připraven thiocalix[4]aren, sloučenina lišící se od klasického calix[4]arenu nejen reaktivitou, ale i velikostí a tvarem kavity.

Předkládaná práce představuje první syntézu receptorů anionů založených na thiocalix[4]arenovém skeletu. Je zde popisována příprava série látek, ve kterých je modifikován tvar a druh vazebného místa pro anion. Tyto sloučeniny obsahují také vazebné místo pro kation a mohou tedy být receptorem celého iontového páru. Schopnost těchto látek vázat chloridový anion a vliv navázání kationtu na komplexaci aniontu byl zkoumán pomocí NMR spektroskopie.

LITERATURA

- Kumagai H., Hasegawa H., Miyanari S., Sugawa Y., Sato Y., Hori T., Ueda S., Kamiyama H., Miyano S.: Tetrahedron Lett. 38, 3971 (1997).



2. Lhoták P., Šťastný V., Zlatušková P., Stibor I., Michlová V., Tkadlecová M., Havlíček J., Sýkora J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 757 (2000).
3. Iki N., Morohashi N., Narumi F., Fujimoto T., Suzuki T., Miyano S.: Tetrahedron Lett. 40, 7337 (1999).
4. Jentgens C., Bienz S., Hesse M.: Helv. Chem. Acta 80, 1133 (1997).