

NETRADIČNÍ POUŽITÍ POLAROGRAFIE/VOLTAMETRIE

ROBERT KALVODA

UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Ustav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8

Došlo dne 6 V 1999

 Klíčová slova polarografie, voltametrie, aplikace

Obsah

1. Úvod
2. Biologické aplikace
 - 2.1. Měření *in vivo*
 - 1.1. DNA v toxikologické analýze a lékařské diagnostice
 - 2.3. Imunologická měření
 - 2.4. Sledování karcinogenity chemických látek
3. Analýza pevné fáze
 - 3.1. Polarografie nerozpustných látek
 - 3.2. Abrasivní stripping voltametrie
4. Voltametrie v plynné fázi
5. Tribodiagnostika
6. Závěr

1. Úvod

Cílem tohoto sdělení není zhodnocení stavajícího stavu a možností využití polarografie/voltametrie v chemické laboratoři - zejména v chemické analýze, což bylo předmětem různých článků věnovaných pětasedmdesátiletému jubileu polarografie, - ale spíše diskuse některých „speciálních možností“, které polarografie/voltametrie skýtá, případně vytyčení řady „netradičních“ použití této metody. A těch je vsuktu tolik, že životnost této elektrochemické metody je zajištěna ať již z důvodu určité nezastupitelnosti, originality měření a v neposlední řadě i ekonomické výhodnosti.

Na prvním místě budou uvedeny některé speciální aplikace v problematice týkající se lidského zdraví, což v podstatě zahrnuje oblast biologickou či biochemickou. Dále budou diskutovány aplikace voltametrie při analýze pevné fáze (zejména tzv. abrasivní stripping voltametrie), měření ve fázi plynné a konečně použití v tribodiagnostice. Všechny tyto aplikace se vymykají z rámce běžného, tedy tradičního použití polarografie a voltametrie v analytických laboratořích.

2. Biologické aplikace

Pomineme stanovení biologicky aktivních látek ať již endogenních nebo exogenních, různých léčiv či jejich metabolitů v tělních tekutinách a vůbec v biologickém materiálu, spočívá-

jící na standardních analytických postupech, tzn. předběžné úpravě vzorku, hlavně za použití extrakce sledované látky ze vzorku. Rovněž pomineme rozsáhlou plejádu biosenzorů pracujících na ampérometrickém principu - tyto tvoří dnes již v podstatě samostatný obor těšící se všeobecnému zájmu biochemiků.

2.1 Měření *in vivo*

Samostatnou disciplínu biologických aplikací tvoří tzv. „voltametrie *in vivo*“, sloužící k sledování fyziologicky účinných látek endogenního původu, tzn. produkovaných v živém organismu, hlavně jejich koncentračních změn v důsledku různých fyziologických pochodů, případně externího působení chemických látek na sledovaný organismus. Řadu biologicky významných látek lze tak sledovat prostřednictvím jejich signálů přímo v místech jejich působení, tzn. v živém organismu, neboli *in vivo*¹. Při tomto invazivním měření je čidlo vpraveno přímo do měřené tkáně, cévy nebo orgánu. Jedná se tedy o analytickou metodu použitelnou či používanou na malém povrchu vzorku řádu čtverečních mikrometrů. Jiné analytické metody skýtají víceméně celkový obraz toho co se v tkáni děje, měření s mikroelektrodami naopak dávají obraz o lokálních dějích a to při kontinuálním monitorování různých metabolitů a drog v neuronových tkáních nebo artériích. K usnadnění takových voltametrických měření byly některými firmami vyrobeny speciální typy polarografů (např. přístroj Biopulse fy Tacussel (Francie), voltametrický analyzátor CV 37 fy BAS (Bioanalytical Systems (USA)), pracující se semiderivací. Nejhojněji jsou tato měření používána v mozkovém systému, podrobné informace přináší²

Na prvním místě lze uvést aplikaci, kdy se v mozku pomocí implantovaných voltametrických mikroelektrod sleduje chování různých neurotransmiterů - přenašečů informací jako dopa, dopamin, serotonin, epinefrin, apod. - což jsou sloučeniny na elektrodě snadno oxidovatelné, jak poznal Adams³, který je v podstatě zakladatelem celého oboru elektrochemických měření *in vivo*. Tímto způsobem lze studovat pochody probíhající v mozku při aplikaci chemických sloučenin nebo různých léčiv. Předmětem výzkumu jsou též otázky spojené s drogovou závislostí, zřejmě s cílem nalezení optimálních látek k jejímu léčení. Lze zde zmínit, že po injekci amfetaminu narůstá v mozku koncentrace kyseliny askorbové.

Aplikace mikroelektrod umožňuje rovněž studium chemických procesů v cytoplazmě jednotlivých buněk. Stručný přehled podává⁴ Lákavou možností v tomto směru je sledování alergických reakcí na izolovaných buňkách vlivem různých chemikálií⁵. Jako alergen fungující antigen vede sensibilizaci k vytvoření protilátek. Při reakci antigenu s protilátkou se uvolní z mastocyту tzv. mediatory, což jsou sloučeniny jako histamin, prostaglandin apod., vázané zde v biologicky aktivní formě na heparin nebo bílkoviny. A právě tyto látky, uvolněné zmíněnou alergickou reakcí lze voltametricky sledovat.

Elektrochemie *in vivo* tedy může skýtat nové informace týkající se znalosti biochemických procesů na buněčné úrovni,

zejména jejich farmakologických aspektů a vůbec chemie fyziologických funkcí, což též přispívá k rozpoznání podstaty různých chorob, eventuálně jejich diagnostice a vůbec kontrole zdraví lidí

2 2 DNA v toxikologické analýze a lékařské diagnostice

Věnujme se nyní sledování vlivů na nositele genetických informací, zodpovědného v živém organismu za proteosyntézu, tj. deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) pro účely toxikologické, případně sledování specifických sekvencí nukleotidů (což jsou fosforečné estery nukleosidů na bázi purinové nebo pyrimidinové jako adenosin, guanosin, cytidin a thymidin) v DNA k lékařské diagnostice některých chorob

Elektrochemickým studiem nukleových kyselin se koncem padesátých let jako první začal zabývat E. Paleček, který objevil možnost rozlišení denaturované formy, tj. jednovláčkové, od formy nativní s dvojitou šroubovicí při teplotní denaturaci. Takovým otevřením šroubovice se stanou na rtuťové elektrodě adeninové a cytosinové zbytky nukleotidů dostupné redukci. Tato redukce je provazena vznikem píků na polarografické či voltametrické křivce, jejichž výška se tedy zvyšuje s množstvím adeninu a cytosinu dostupného elektrodové reakci na elektrodě a se stupněm porušení původní šroubovice nebo narušením vazby s cukernou a fosforečnanovou složkou. Tento významný efekt byl v průběhu let hlavně Palečkovou školou rozpracován do různých variant využitelných až již k základnímu výzkumu nebo - a to hlavně ke sledování toxických látek (případně i různých druhů záření) působících na DNA zhoubným způsobem. Takové poškození DNA může totiž vést k poruchám života buňky - mutacím, maligním přeměnám, apod. což v konečné fázi vede k narušení lidského zdraví. Z toho tedy vyplývá důležitost detekce rušivých látek a efektů na DNA.

Lze tak uvést vázání protirakovinného antibiotika na DNA (cit.⁶), studie změn nativní DNA v důsledku ozáření nízkými dávkami gama záření⁷ jakož i studia interakci nukleových kyselin s genotoxickými látkami⁸

DNA, zejména scDNA (supercoiled - scDNA) může být použita při zjišťování účinku škodlivých látek tím způsobem, že je imobilizovaná na elektrodě - rtuťové nebo uhlíkové⁹. Taková modifikovaná elektroda velmi citlivě reaguje na poškození DNA a předčí citlivosti jiné analytické metody jako gelovou elektroforézu apod. Tak např. rtuťová elektroda modifikovaná scDNA byla využita k sledování hydroxylových radikálů v roztoku, případně jiných škodlivin v průmyslových vodách. Zejména lze zmínit silné narušení imobilizované DNA vodami ze zatopených uranových dolů¹⁰

Ke studiu možnosti sledování některých virů a bakterií k účelům diagnostickým bylo využito hybridizačních postupů. Hned úvodem ale musí být zdůrazněno, že se jedná o předběžné laboratorní pokusy. V této souvislosti budtež uvedeny snahy o konstrukci senzorů specifických na sekvenci DNA a na detekci bakterií (např. *Mycobacterium tuberculosis*¹¹) a virů (např. HIV¹²). Detekce je založena na znalosti struktury tj. posloupnosti bází v DNA detegovaných patogenů a to tím způsobem, že na elektrodě je imobilizováno vlákno DNA (single stranded - ssDNA) mající takový sled bází, aby mohlo dojít hybridizaci ke spojení s bakteriální či virovou DNA přítomnou ve vzorku roztoku na základě komplementarity.

Deponované vlákno DNA (nebo vlákno peptidické nukleové kyseliny tzv. PNA, což je strukturální analog) je tedy jakýmsi selektivním cílem pro komplementární DNA přítomnou v roztoku. Spojení obou vláken hybridizací je doprovázeno změnou efektivní velikosti povrchu modifikované elektrody, což lze indikovat elektrochemicky. K indikaci lze rovněž použít interkalační reakce, kdy se elektrochemicky aktivní látka váže k dvoušroubovicové DNA vzniklé hybridizací¹³

Již v předchozím zmíněné mterkalace vhodných sloučenin do dvojité šroubovice DNA bylo dále využito k stanovení toxických aromatických aminů pomocí modifikované elektrody tvořené grafitovou pastou s adsorpcí nahromaděné komerčně dostupné nativní DNA z telecího brzlíku (cit.¹⁴). Elektrochemické signály odpovídaly oxidaci aromatického aminu naakumulovaného adsorpcí na elektrodě na kationtový radikál, výška píku pak byla úměrná koncentraci aminu. Metoda byla vyzkoušena na stanovení aromatických aminů ve vodách. Přehledně jsou zmíněné techniky popsány také v publikacích^{15,16}. Závěrem této kapitoly nutno opět zdůraznit, že se dosud často jedná o výzkumné práce na modelových látkách. Nicméně řada předběžných pokusů nasvědčuje možností praktických aplikací. Úsilí v tomto směru intenzivně pokračuje.

2 3. Imunologická měření

Ke zjišťování reakce antigenu s protilátkou byly vypracovány také četné elektrochemické metody včetně polarografických, jak o tom pojednává spis¹⁷ a také souhrnný článek v tomto časopise věnovaný imunosenzorům¹⁸.

První práci o polarografickém zkoumání reakce antigenu s protilátkou publikoval B. Breyer¹⁹, autor AC polarografie. Nejprve byl připraven polarograficky aktivní azo-protein. Imunizací králíka byla pak získána protilátka - antisérum. Po přidání tohoto specifického antiséra do roztoku antigenu, tedy azo-proteinu, došlo k silnému potlačení jeho polarografické vlny. Jestliže bylo do roztoku azo-proteinu přidáno nespecifické antisérum v stejných koncentračních podmínkách, došlo pouze k snížení vlny azo-proteinu úměrně zředění roztoku. Kvalitativní změnu do těchto měření přinesla adsorptivní stripping voltametrie (AdSV), při níž jsou antigen a protilátka, které se voltametricky často chovají zcela obdobně, nahromaděny adsorpcí na elektrodě a na výsledné křivce sledována jejich interakce. Jako jeden z příkladů lze uvést práci²⁰, popisující využití AdSV při sledování reakce myšního imunoglobulinu s myším anti-imunoglobulinem. obě tyto látky skýtají na voltametrické křivce dva píky (zřejmě tensametrického původu - poznámka autora). Přidává-li se do roztoku myšního IgG myši anti-IgG, dochází ke snižování píků IgG. Jestliže by se do původního roztoku přidávala nespecifická protilátka, došlo by naopak ke zvýšení píků jako u prostého zvýšení koncentrace povrchově aktivní látky. Obdobné práce budtež zde jen citovány²¹

Metody AdSV bylo využito i ke sledování reakce lymfocytických leukemických buněk s vypěstovanou monoklonální protilátkou²²

Zda polarografická metoda nalezne uplatnění v praxi, kde jsou již pro tato měření zavedeny standardní metody je otázkou. Nicméně měření pomocí AdSV jsou velmi citlivá a celkový vzhled voltametrické křivky může jistě poskytnout informace jinými metodami obtížně dostupné, případně i nedostupné.

2.4 Sledování karcinogenity chemických látek

Pracovníci Onkologického ústavu Slovenské akademie věd se již po dlouhou dobu pokoušejí o využití polarografie k ohodnocení chemických sloučenin na potenciální karcinogenitu. Z jejich posledních metod²³ lze uvést následující postup. Ke vzorku zkoumané látky, rozpuštěné v dimethylformamidu za přítomnosti $N(C_4H_9)_4ClO_4$ jako základního elektrolytu a při použití kapající rtuťové elektrody se postupně přidává fl//a-lipoová kyselina, která lineárně s její koncentrací v roztoku zvyšuje difúzní proud zkoumané látky. Směrnice lineární závislosti $i_d = f(C_{LA})$ (kde i_d je difúzní proud v mikroampérech a C_{LA} koncentrace lipoové kyseliny LA v mikromolech na l) může dle autorů sloužit jako index potenciální karcinogenity látky: Hodnoty tohoto indexu nad 0,4 mohou již indikovat potenciální nebezpečí. Autoři proměřili rozsáhlou řadu látek a svoje výsledky korelovali s údaji karcinogenity udávané WHO a dosahovali většinou shody, též dosahovaly výsledky shody s testem dle Ames. Přesto dovozují, že jejich metoda v žádném případě nemá nahrazovat metody odsouhlasené WHO, ale že má být příspěvkem k určitému rychlému prescreeningu potenciálně nebezpečných látek. Metoda zatím postrádá teoretický podklad, což je její určitou nevýhodou a zdrojem možných pochybností. Podle mínění autora tohoto referátu by snad tento efekt byl vysvětlitelný tím, že při redukcí autory zkoušených látek vznikají radikálové meziproducty způsobující v systému s lipoovou kyselinou katalytické zvýšení měřeného signálu.

3. Analýza pevné fáze

3.1. Polarografie nerozpustných sloučenin

V současné době se objevují stále častěji práce z oboru abrasivní stripping voltametrie (AbrSV), kde dochází k přímému přenosu elektronu z elektrody na pevnou fázi či opačně. V podstatě se jedná o oxidaci či redukcí látky (slitiny, rudy, organické sloučeniny), jejíž stopové množství je mechanicky nanášené přímo na povrch elektrody (např. otěrem). Než ale bude tato metoda AbrSV blíže diskutována, je nutné připomenout pionýrské práce K. Micky, jež popsal přímou polarografickou redukcí suspenzí nerozpustných látek na rtuťové kapající elektrodě, kdy se rovněž jedná o přechod elektronu z jedné pevné fáze do druhé. Zjistil, že řada ve vodě nerozpustných látek – zejména oxidů a siřičků těžkých kovů – poskytuje na rtuťové kapající elektrodě redukční proud, jehož maximální hodnoty se dosahuje při potenciálu charakteristickém pro tu kterou sloučeninu. Nutnou podmínkou redukce a získání dobře vyvinutých signálů na polarografické křivce (ve tvaru píky) je míchání základního elektrolytu s rozptýlenou suspenzí látky tak, aby byl zajištěn její dobrý styk s elektrodou. Při této redukcí např. nerozpustné siřičky na elektrodě skýtají příslušný kov a sulfanovy anion. Zatímco při redukcí oxidů a sulfidů těžkých kovů dochází k rozpouštění vy redukovaného kovu do rtuti, u siřičků železa, niklu a kobaltu dochází na částici suspenze při jejím dotyku s elektrodou ke katalytickému vylučování vodíku. Směsi látek mají většinou tendenci redukovat se při jediném potenciálu, nicméně byly zazname-

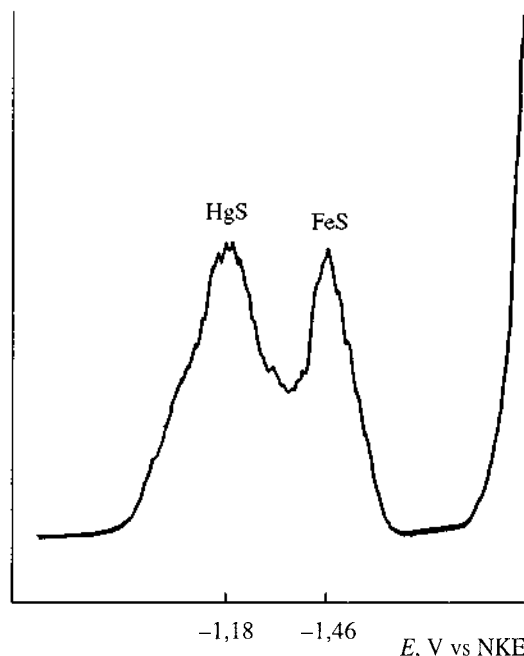
nány i křivky s dvěma „píky“, jak tomu je u směsi sulfidu rtuťnatého a olovnatého, sulfidu rtuťnatého a sulfidu železnatého (viz obr. 1)²⁴. Mezi neredukovatelné látky patří mezi jinými např. síran olovnatý, síran barnatý, sulfid kademnatý. Pozoruhodným zjištěním byl fakt, že sloučeniny stejného chemického složení ale rozdílné krystalografické struktury, se svým polarografickým chováním navzájem liší (např. různé modifikace MnO_2). Souhrnný přehled o redukcí suspenzí nerozpustných látek s obsahem tabulkou redukčních potenciálů těchto látek, je uveden v práci²⁵. Obdobné suspenze nerozpustných látek byly také zkoumány metodou oscilografické polarografie střídavým proudem²⁶.

O elektrochemickém chování nerozpustných depolarizátorů pojednává zevrubný přehledný referát²⁷.

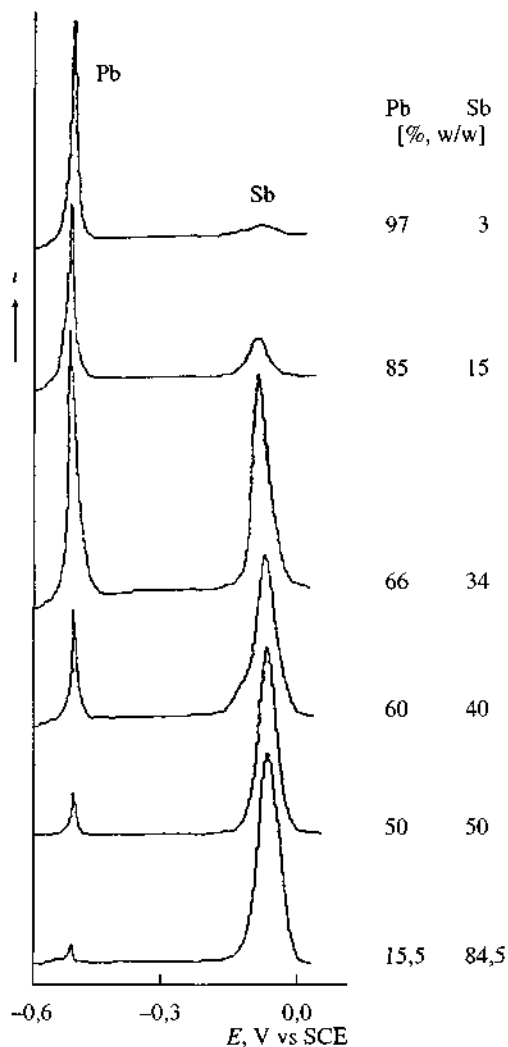
3.2. Abrasivní stripping voltametrie

Jak v předchozím zmíněná polarografie nerozpustných sloučenin, tak abrasivní stripping voltametrie (AbrSV) zapadá do širokého kontextu metod sloužících ke studiu elektrochemického chování pevných látek chemického charakteru a to až již z hlediska preparativního, korozního, teoretického nebo analytického. V dalším si budeme všimnout hlavně hlediska analytického. Při těchto měřeních může zkoumaná pevná fáze (za předpokladu její vodivosti) tvořit přímo materiál elektrody, čehož se např. využívá při analýze vměstků v kovových materiálech tvořících elektrodu, nebo může být pevná látka ve formě prášku smíšená s pojidem uhlíkové pastové elektrody, což je přístup Braninové²⁸, sloužící k analýze složitých materiálů voltametrickou cestou.

Další možnost spočívá v studiu chování elektrody na jejímž povrchu je imobilizována zkoumaná látka. tomu se blíží přístup Scholze a spolupracovníků, kteří jak uvádějí, in-



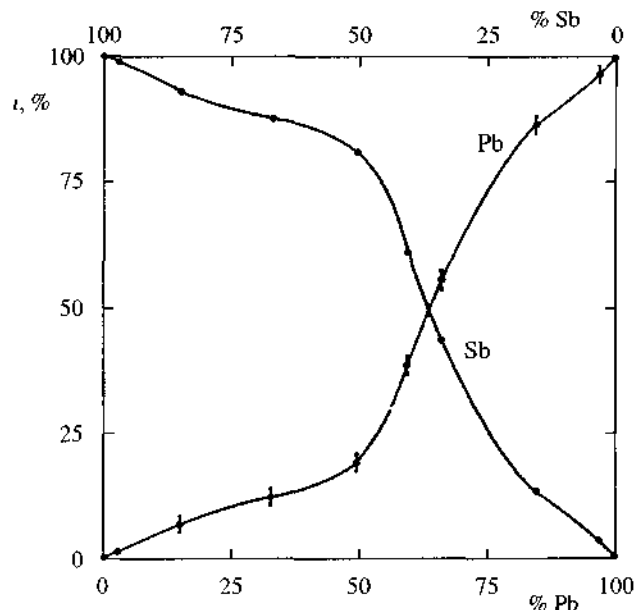
Obr. 1 Redukce směsi sulfidu rtuťnatého a železnatého na rtuťové kapající elektrodě v roztoku $0,5\text{ M-NH}_4\text{Cl}$, $2 \cdot 10^{-3}\text{ M-HgS}$ a $1 \cdot 10^{-4}\text{ M-FeS}$ Upraveno z publikace²⁴



Obr 2 Voltamogramy AbrSV po nanesení slitiny Pb-Sb proměnného složení na parafinem impregnovanou grafitovou elektrodu. Základní elektrolyt 0,1 M kyselina šťavelová. Reprodukce z publikace²⁹ se souhlasem vydavatele (Springer Verlag)

spirování zkouškami zlatých předmětů na prubířském kameni, vyvinuli svoji variantu analýzy pevné fáze a to mechanickým nanášením stop zkoumaného materiálu na povrch např. uhlíkové pastové elektrody impregnované parafinem. Množství nanášené látky na elektrodě, jak uvádějí autoři, obnáší 10^6 až 10^{10} molu, čímž tuto metodu zařazují mezi mikroanalytické metody. Způsob nanášení analyzované látky na elektrodu má řadu variant, závislých hlavně na charakteru vzorku.

Tak lze např. analyzovat různé slitiny prostě tím způsobem, že se elektrodou otírá povrch plátku slitiny a posléze se provede anodické rozpuštění depozitu anodickým záznamem²⁹. Takový voltamogram poskytuje do jisté míry jakýsi „otisk prstu“ zkoumané látky, což platí zejména pro rudy. Příklad záznamu křivky AbrSV anodického rozpouštění slitiny o měnícím se obsahu Sb a Pb je na obr. 2 a 3. Analyzovat lze i směsi práškových sloučenin³⁰. Příkladem je obr. 4 a 5, znázorňující křivku AbrSV redukce směsi HgS a HgO jakož



Obr 3 Výška voltametrických píků slitiny podle obr. 2. v závislosti na koncentraci jednotlivých komponent. Reprodukce z publikace²⁹ se souhlasem vydavatele (Springer Verlag)

i PbO a HgO. Pík HgO na obr. 4 je zhruba o 150 mV pozitivněji položený nežli pík HgS, podobnějak tomu je u polarografické redukce suspenze těchto látek dle Micky.

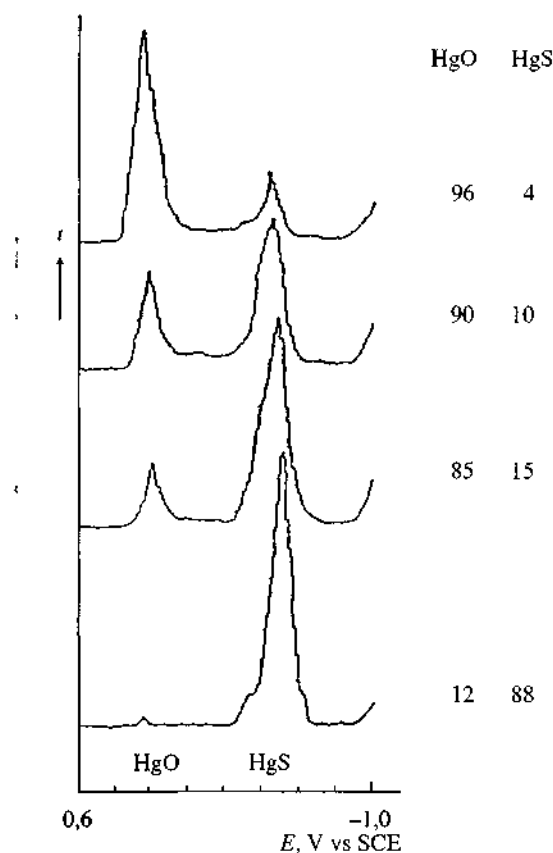
Metody AbrSV bylo např. také použito ke studiu vysoko-temperaturních supravodičů³¹ typu YBaCu, kdy bylo zjištěno, že u ortorhombické fáze může měď měnit svoje oxidační stavy mezi +1, +2 a +3. Studium oxidů železa a synteticky připravených hydroxy-oxidů železa - goethitů - používaných pro přípravu magnetických nosičů informace, je popsáno v práci³² a využití AbrSV při výpočtu termodynamických konstant málo rozpustných sloučenin uvádí práce³³.

Zajímavým příkladem použití AbrSV z oblasti analýzy organických sloučenin je jednoduchý a rychlý screening pesticidů³⁴ (zejména chlorothionu) přímo na rostlinném materiálu - v tomto případě na okurkách a hlávkovém salátu. Rostlinný materiál byl oťen grafitovou elektrodou impregnovanou parafinem a voltamogram zaznamenán v prostředí 0,1 M kyseliny chlorovodíkové. Touto technikou, při níž bylo možno vzorek zkoušet přímo na místě jeho výskytu, bylo dokázáno i minimální množství chlorothionu, až 0,1 ng na jednom cm^2 plochy zeleniny. V citované práci je podán i postup pro kvantitativní vyhodnocení.

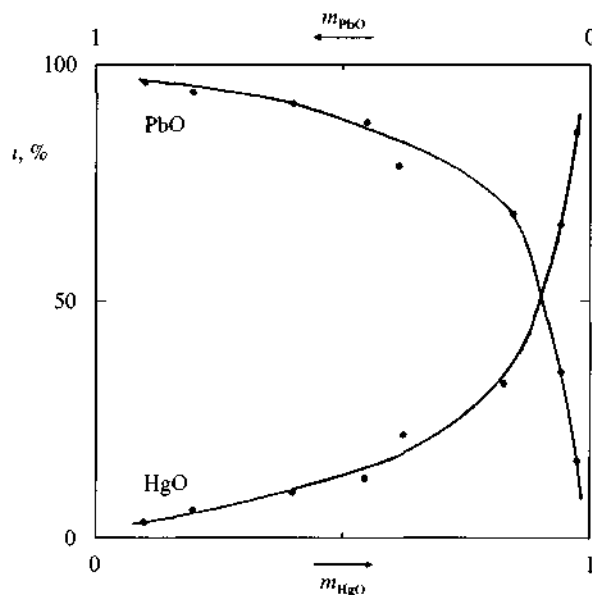
Souhrnné informace o metodě AbrSV lze nalézt např. v³⁵.

4. Voltametrie v plynné fázi

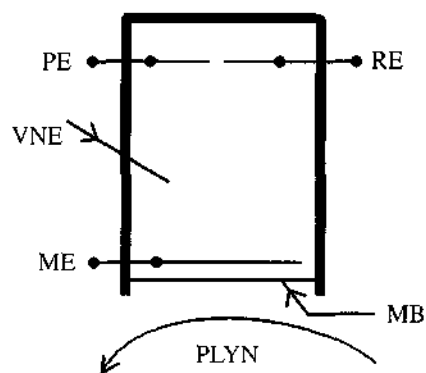
Polarografická či voltametrická analýza plynů se provádí hlavně tím způsobem, že se měřený plyn nebo vzduch obsahující sledovanou plynnou složku probublává v elektrolytické nádobce základním elektrolytem, v kterém se plyn buď rozpouští nebo reaguje s některou složkou elektrolytu a vytváří elektroaktivní sloučeninu. Měřený proud je pak funkcí koncentrace plynu v roztoku. Nejčastěji se však měření koncentrace plynů v ovzduší provádí pomocí amperometrických či-



Obr 4 Voltamogramy AbrSV po nanesení směsi HgS a HgO na parafinem impregnovanou grafitovou elektrodu. Základní elektrolyt 1 M kyselina šťavelová. Reprodukce 7 publikace³⁰ se souhlasem vydavatele (Springer Verlag)

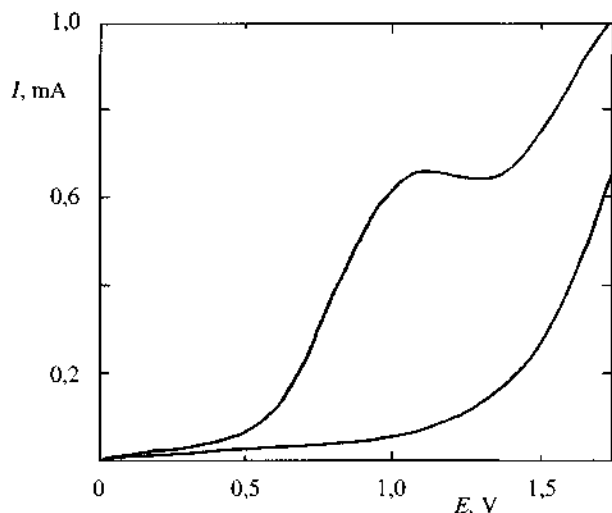


Obr 5 Výška voltametrických pík směsi prášků PbO a HgO v závislosti na koncentraci jednotlivých komponent. Reprodukce z publikace³⁰ se souhlasem vydavatele (Springer Verlag)



Obr 6 Schematické znázornění kompaktního plynového senzoru, MB - membrana, elektrody ME - pracovní, PE - pomocná, RE - referenční, VNE - vnitřní elektrolyt

del, která jsou součástí většiny typů monitorů plynů dodávaných komerčně (např. fy Sensidyne a Teledyne v USA, v NSR fy Draeger, aj.). Tyto senzory tvoří kompaktní uzavřený celek ve formě válečku s okénkem přikrytým membránou, kolem které proudí zkoumaný vzduch a difunduje membránou do kapalného elektrolytu vyplňující vnitřní část senzoru. V elektrolytu se nachází elektroda měrná, pomocná a referenční. Externí potenciostatický systém zabezpečuje konstantní napětí mezi měrnou a referenční elektrodou. Schematické znázornění je na obr. 6. Napětí vložené na elektrody, jakož i složení elektrolytu, v neposlední řadě i typ membrány zajišťují selektivitu čidla. Uvnitř čidel posléze dochází k elektrochemické reakci (redukci nebo oxidaci) sledovaného plynu, přičemž probíhající proud je úměrný parciálnímu tlaku plynu. Takové elektrochemické převodníky či detektory bývají nejčastěji používány pro stanovení SO_2 , NO a NO_2 , jsou však dodávána také čidla pro desítky jiných nejrůznějších plynů. Jsou nejčastěji řešena takovým způsobem, aby je bylo možno v monitorech snadno vyměnit, jestliže již došla jejich životnost. V monitorech také periodicky dochází k jejich kalibraci a kompenzaci různých rušivých vlivů, jako kolísání teploty, pokles aktivity čidla apod. Bližší informace o těchto čidlech lze čerpat z firemní literatury nebo z přehledných referátů o elektrochemických plynových čidlech, např. ... K monitorování elektroaktivních analytů dispergovaných v plynné fázi (ale také rozpuštěných v nevodivých rozpustidlech) byla navržena³⁹ také čidla s porézní pracovní elektrodou (Pt, Au, Hg nebo C), nanášenou na iontoměničovou membránu (Nafion 417), která je ve styku s roztokem elektrolytu ve speciální cele s pomocnou a referenční elektrodou, obdobně jak tomu bylo u čidel popsaných v předchozím odstavci. Tyto porézní elektrody nanášené na Nafionu mohou sloužit jak pro redukci, tak i oxidace. Jejich pomocí byly zaznamenány voltamogramy vodíku, kyslíku, amoniaku, bromu a triethylaminu, dispergovaných v dusíku jakožto nosném plynu. Voltametrické chování většiny látek analyzovaných v plynném a kapalném prostředí je obdobné voltamogram triethylaminu dispergovaných v dusíkové atmosféře (obr. 7) skýtá při použití kompozitního čidla grafit/Nafion s náplní 0,1 M kyseliny chlonsté obdobnou voltametrickou křivku jako triethylamin rozpuštěný ve stejném elektrolytu při použití uhlíkové elektrody. (Triethylamin sloužil autorům jako testovací látka pro čidla tohoto typu, určených pro detekci v plynové chro-



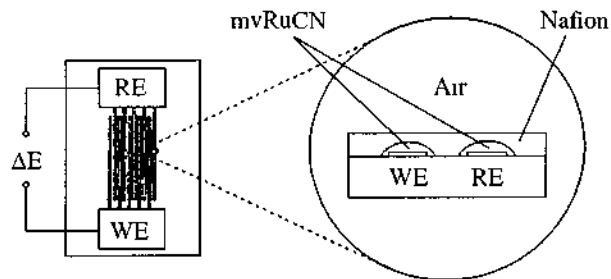
Obr 7 Voltamogram 2.10^{-3} M triethylaminu v dusíkové atmosféře. Kompaktní čidlo s porézní pracovní elektrodou grafit/Nafion s vnitřním elektrolytem $0,1$ M- HClO_4 . Rychlost změny potenciálu $0,1$ V/s. Spodní křivka v čistém dusíku. Upraveno z publikace¹⁹ se souhlasem vydavatele (Elsevier Science)

matografii, kdy bylo pracováno při $1,2$ V v. Ag/AgCl). Navržená čidla jsou vhodná i pro kontinuální ampérometrický monitoring. Na obdobném principu pracují čidla navržená v práci⁴⁰.

Pro přímou voltametričnou analýzu plyných sloučenin v atmosféře se jeví lákavé použití kompaktního zařízení obsahujícího na nevodivém nosiči vrstvu iontově vodivého polymeru se zabudovaným elektrodovým systémem, na který se nanaší buď přímo roztok vzorku, nebo v kterém se plynná látka z ovzduší absorbuje. Takový systém může navíc skýtat proudové signály úměrné době, jakou byl systém vystaven měřené atmosféře - jde tedy o určitý druh, řekněme absorpční stripping voltametrie (AbsSV). Na takovou možnost práce bez roztoku elektrolytu (jak tomu bylo v předchozích případech) upozorňují např.⁴¹, kteří litografickou technikou vyrobili tříelektrodový systém z mikroelektrod v mikronadobce na společném čipu přikrytém filmem polyethylenoxidu obsahujícím jako elektrolyt LiCF_3SO_3 pracuje se buď s kapkou roztoku naneseného na čip (tedy roztoková voltametrie), nebo je systém vystaven plynné fázi. Analytické aplikace čipu s mikroelektrodovým systémem pokrytým Nafionem (obr. 8), jsou popsány v práci⁴². Ke sledování organických sloučenin obtížně oxidovatelných, jako jsou např. N-nitrosaminy, aminofenylethan, cystein-glycin aj., byly do Nafionu, kterým byl přikryt elektrodový systém, přidány ruthemové soli RuCl_3 a $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$ jako katalytický systém. Bylo tak vytvořeno zařízení, umožňující provádět prekoncentrace organických sloučenin přímo z ovzduší.

V podrobnostech je znovu odkazováno na obšírný referát Opekara³⁸, věnovaný zejména ampérometrickým detektorům s tuhým polymerním elektrolytem.

Významnou, stále populárnější kategorií plyných čidel tvoří v současnosti čidla odporová na bázi vodivých polymerů, nalézající uplatnění zejména v analyzátoch směsí plynů, par a vůbec vůní - proto jsou často nazývána „elektronickým nosem“. Tento obor chemické analýzy, v současné době bouř-



Obr 8 Mikroelektrodový voltametričnou systém s integrovanou pracovní (WE) a referenční (RE) elektrodou pokrytou a směsí katalyzátorů RuCl_3 a $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$. Nafionový film pokrývá obě elektrody. Reprodukce z publikace⁴² se souhlasem vydavatele (American Chemical Society)

livě se rozvíjející v samostatnou disciplínu, slouží zejména pro rychlou kontrolu kvality výrobků, hlavně nápojů a potravin, ale také pro posouzení čistoty chemikálií. Ústřední část těchto zařízení se skládá z arraye - tedy skupiny sdružených čidel z vodivých polymerů o různé citlivosti a selektivitě. Elektrické signály jednotlivých čidel se pak vyhodnocují chemometricky, např. metodou pattern recognition (srovnávání obrazů). Získaný výsledek se porovnává se vzorkem o známém složení nebo vzorkem požadované kvality. Přístroje pro tento druh analýzy vyrábí např. firma Neotromcs Technology (Hertfordshire, UK), AlphaMos (Toulouse, Francie), AromaScan (Manchester, UK), aj.

Podrobnější informace o „elektronickém nose“ lze nalézt např. ve spisech^{43, 46}, o elektronickém „nosu a jazyku“ je připravován i článek do tohoto časopisu⁴⁷.

5. Tribodiagnostika

Z tradičního pole působnosti polarografie se vymyká také její použití pro tribodiagnostiku. Uživatelé těžké dopravní techniky, ať již civilní nebo vojenské, požadují totiž často možnost provádění rychlé diagnostiky opotřebených jejich strojů a to bez předchozí demontáže přímo v terenu nebo jen v provizorně vybavených laboratořích. Jedním z parametrů indikujících zmíněné opotřebení motorů a podobných zařízení je totiž rozsah otěru kovových částí jejich třecích mechanismů v podobě množství kovů uvolňovaných do maziv. Ze zvýšené koncentrace jednotlivých kovů či skupin kovů v mazivech nebo její časové změny lze vyvozovat diagnostické závěry o stavu stroje nebo jeho jednotlivých součástí a odhadnout termín nutné údržby či zevrubné opravy.

Pro tuto diagnostiku se běžně používají spektrální metody jako AAS, AES a ICP (např.^{48, 49}) v centralizovaných laboratořích, zřizovaných speciálně pro tyto účely.

K zjišťování obsahu kovů v mazivech byla navržena též řada polarografických postupů, spočívajících v jejich stanovení po zpopelnění vzorku oleje⁵⁰, nebo po extrakci kovů z olejové fáze poměrně komplikovaným a časově náročným způsobem⁵¹. Z požadavku praxe mít k dispozici jednoduchou, snadno proveditelnou a v neposlední řadě finančně nenáročnou metodu, vyplynul způsob tribopolarografické analýzy⁵² pracující s extrakcí do prostředí kyseliny chlorovodíkové za přítomnosti trichlorethylenu (pomocí extraktoru fy Polaro

Sensors, Praha) Vodní fáze, hromadící se v průběhu extrakce ve sběrné nádobce extraktorů se podrobí polarografickému stanovení (Např. stanovení stop Cu, Pb a Zn se provede metodou anodické rozpouštěcí voltametrie) Ze zjištěných obsahů kovů v olejích se posléze provede diagnóza opotřebení Data mohou také sloužit ke konstrukci diagramů znázorňujících menící se obsah kovů v oleji v závislosti na ujetých kilometrech vozidla Rovněž jsou uvedeny výsledky polarografických analýz olejů z různých typů vozidel a provedeno porovnání s výsledky dosaženými metodou AAS

Když tribodiagnostiku provádějí specializované centrály zvané a přístrojově dokonale vybavené laboratoře, dovede polarografie docílit obdobných výsledků přímo v terenu nebo ve spore vybavených laboratořích

6. Závěr

Vybrané příklady víceméně netypického použití polarografie mimo rámec běžné analytiky snad dostatečně demonstrují jistou všestrannost metody při aplikacích dosti neobvyklých, nicméně ale zcela reálných

A co říci závěrem snad jen to, že žádná metoda není univerzální a když v prvním období po jejím objevení či zavedení do praxe často panuje jista optimistická euforie Časem se ale většinou ukáže jakési „těžiště využití“ metody, které ji pak přisoudí místo mezi metodami klasickými Tak tomu bylo se všemi metodami analytické chemie, z nichž snad žádná úplně nezapadla do zapomnění, nybrž našla uplatnění při řešení - řekneme - „speciálních problémů“ A tak tomu asi bude i s polarografií, jejíž doménou zřejmě zůstane oblast stanovení stopových koncentrací toxických kovů, sledování organických sloučenin vyznačujících se fyziologickou účinností a řešení problematiky oxidoredukčních reakcí vůbec Její univerzálnost setrva v tom, že při nedostatečném vybavení laboratoře jinými aparaturami, umožní polarograf - být někdy i složitě - uspokojit co nejširší požadavky na chemickou analýzu Tím se přece jen může pochlubit málo analytických metod

Nazvoslovná poznámka k terminům polarografie a voltametrie Podle návrhu elektroanalytické komise IUPAC je název polarografie omezen pro metodu pracující s elektrodou s obnovovaným povrchem Při použití tuhých elektrod jde o voltametrii Polarografie je tedy voltametrická metoda pracující s elektrodami s obnovovaným povrchem Avšak i tato definice by měla být upravena ve smyslu návrhu pracovníků Ústavu fyzikální chemie J Heyrovského ČSAV, který podali organizaci IUPAC v roce 1981 Podle této nové definice je polarografie metoda, která používá potenciostatickou kontrolu polarizace pracovní elektrody za podmínek konvektivní difuze Přitom se měří proudová odezva (I) elektrodového systému v závislosti na polanačném napětí (E), jehož časová změna (dE/dt) je zanedbatelná s ohledem na časovou konstantu přisunu depolarizátoru k elektrodě To znamená, že veličina I nezávisí na rychlosti změny polarizačního napětí

LITERATURA

- 1 Wightman R M , v knize *Electrochemistry in Research and Development* (Kalvoda R , Parsons R , ed) , str 189 Plenum Press, New York 1985

- 2 Boulton A A , Baker G B , Adams R N *Voltammetric Methods in Brain Systems* Humana Press, Totowa 1995
- 3 Adams R N *Anal Chem* 48, 1126A (1976)
- 4 O'Neil R D *Analyst* 119,767 (1994)
- 5 Pihel K , Heleh S , Jorgenson J W , Wightman R N *Anal Chem* 67 4514(1995)
- 6 Plambeck J H Lown J W J *Electrochem Soc* 131, 2256 (1986)
- 7 Sequans J M , Valenta P , Nurnberg H W *Int Z Radiat Biol* 42,407(1982)
- 8 Sequaris J M , v knize *Electrochemistry Sensors and Analysis* (Smyth M R , Vos J G , ed) , str 191 Elsevier, Amsterdam 1986
- 9 Fojta M , Paleček E *Anal Chim Acta* 342, 1 (1987)
- 10 Fojta M , Stankova V , Paleček E , Koscielniak P , Mitaš J *Talanta* 46, 155(1998)
- 11 Wang J , Rivas G , Cai X , Dontha N , Shiraishi H , Luo D , Valera F S *Anal Chim Acta* 337, 41 (1997)
- 12 Wang J , Cai X , Rivas G , Shiraishi H , Farias P A M , Dontha N *Anal Chem* 68, 2629 (1996)
- 13 Liu S , Le J , He P , Fang Y *Anal Chim Acta* 335, 239 (1996)
- 14 Wang J , Rivas G , Luo D , Cai X , Valera F S , Dontha N *Anal Chem* 68, 4365 (1996)
- 15 Paleček E *Electroanalysis* 8, 1 (1996)
- 16 Wang J , Paleček E , Nielsen P E , Rivas G X , Cai X , Shiraishi H , Dontha N , Luo D , Farias P A M *J Am Chem Soc* 118,1661 (1996)
- 17 Ngo T T (Ed) *Electrochemical Sensor in Immunological Analysis* Plenum Press, New York 1987
- 18 Kalab T *Chem Listy* 89,363 (1995)
- 19 Breyer B Redcliff F J *Nature* 767, 79 (1951)
- 20 Smyth M R , Buckley E , Flores J R , O'Kennedy R *Analyst* 113, 31 (1988)
- 21 Flores J R , Smyth M R *J Electroanal Chem* 233, 317 (1987)
- 22 Lannon B , O'Kennedy R , Flores J R , Fennelly J J , Smyth M R *Electroanalysis* 1, 431 (1989)
- 23 Novotný L , Vachalkova A , Piskala A *Collect Czech Chem Commun* 59, 1691 (1994) a 60, 1469 (1995)
- 24 Micka K *Collect Czech Chem Commun* 22, 1400 (1957)
- 25 Micka K , v knize *Advances in Polarography* (Longmuir I S , ed) , str 1182 Pergamon Press, Oxford 1960
- 26 Kalvoda R , v knize *Advances in Polarography* (Longmuir I S , ed) str 1172 Pergamon Press, Oxford 1960
- 27 Micka K *Chem Listy* 55, 852 (1961)
- 28 Branina Kh Z *Stripping Voltammetry in Chemical Analysis* Wiley, New York 1974
- 29 Scholz F , Nitschke L , Hennon G *Naturwissenschaften* 76, 71 (1989)
- 30 Scholz F , Lange B , Jaworski A , Pelzer J Fresemus' J *Anal Chem* 340, 140(1991)
- 31 Scheurell S , Scholz F , Olesch T , Kemnitz E *Supercond Sci Technol* 5, 303 (1992)
- 32 Grygar T , Šubrt J , Boháček J *Collect Czech Chem Commun* 60, 950 (1995)
- 33 Bond A M , Scholz F *J Phys Chem* 95, 7460 (1991)
- 34 Reddy J , Hermes M , Scholz F *Electroanalysis* 8, 955 (1996)
- 35 Scholz F , Lange B *Trends Anal Chem* 11, 359 (1992)

- 36 Tenygl J , v knize *Elektroanalyticka chemie životního prostředí* (Kalvoda R , ed), str 109 SNTL, Praha 1985
- 37 Opekar F , v knize *Electrochemistry for Environmental Protection* (Štulík K, Kalvoda R, ed), str 123 UNESCO Venice Office, Venice 1996
- 38 Opekar F Chem Listy 90, 916 (1996)
- 39 Schiavon G , Zotti G , Bontempelli G Anal Chim Acta 227,27(1989)
- 40 Kaaret T W , Evans D H Anal Chem 60, 657 (1988)
- 41 Monta M , Longmire M L , Murray R W Anal Chem (56,2770(1988)
- 42 Cox J A , Alber K S , Brockway C A , Tess M A , Gorski W Anal Chem 67, 993 (1995)
- 43 Breer H , v knize *Handbook of Biosensors and Electronic Noses* (Kress Rogers E , ed), str 521 CRC Press New York 1997
- 44 Mills G, Walsh F, Whyte I Chem Technol Europe, (July/August) str 26, 1996
- 45 Slater J M , Paynter J , Watt E J Analyst 118, 379 (1993)
- 46 Pearce T C , Gardner J W , Friel S , Bartlett P N , Blair N Analyst 118, 371(1993)
- 47 Kalvoda R Chem Listy, připraveno k publikaci
- 48 Mckenzie T Mc *AAS Spectrometry for the Analysis of Wear Metals in Oil Samples* (Publication No AA-10) Varian Techtron Pty, Mulgrave 1981
- 49 Lippay J Ropa Uhlie 31, 454 (1989)
- 50 Krotky J , Kozakova V Zpravodaj Vyzkumneho a zkušebního leteckého ústavu 1960, 39
- 51 Valdman V L Zavod Lab 11, 651 (1945)
- 52 Novak V , Šestakova I , Novotny L , Kalvoda R , Jakubetzova A Ropa Uhlie 33, 559 (1991)

R. Kalvoda (*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, J Heyrovsky Institute of Physical Chemistry Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*)
Non-traditional Use of Polarography and Voltammetry

The paper discusses some rather non traditional uses of polarography and voltammetry which are beyond common polarographic routine in analytical laboratories. Some potentials of polarography in the biological and biochemical fields are treated spanning from *in vivo* measurements to sensors for diagnostic purposes in medicine and toxicology. Examples are given of analyses in the solid and gas phases as well as the use in tribodiagnostics in determination of machine wear.

VYUŽITIE CYKLODEXTRÍNOV AKO STACIONÁRNYCH FÁZ NA SEPARÁCIU ENANTIOMÉROV KAPILÁRNOU PLYNOVOU CHROMATOGRAFIU

IVAN ŠPÁNIK a JÁN KRUPČÍK

Katedra analytickej chémie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, e-mail: spanik@cvt.stuba.sk

Došlo dňa 1.III. 1999

Kľúčové slová: α -, (β -, γ -)cyklodextríny, plynová chromatografia, separácia enantiomérov, stacionárne fázy

Obsah

1. Úvod
2. Využitie cyklodextrínov a ich derivátov v plynovej chromatografii
 - 2.1. Cyklodextríny
 - 2.2. Deriváty cyklodextrínov
 - 2.2.1. Alkyl- a acyl- deriváty cyklodextrínov
 - 2.2.2. Cyklodextrínové deriváty obsahujúce tercbutyldimetylsilylovú skupinu
 - 2.2.3. Iné deriváty cyklodextrínov
3. Záver

1. Úvod

Cyklodextríny sú cyklické glukózové oligoméry s glukózovými jednotkami v D(+) konfigurácii a stoličkovej konformácii¹⁻⁴. Tvarom cyklodextríny pripomínajú torus so špeciickými rozmermi dutiny a s voľnými hydroxylovými skupinami viazanými na uhlíkových atómoch v polohách 2, 3 a 6

(obr. 1). Hydroxylové skupiny viazané na uhlíkových atómoch v polohách 6 môžu rotovať a spôsobujú čiastočné uzavretie užšieho konca dutiny. Hydroxylové skupiny naviazané na uhlíkových atómoch v polohách 2 a 3 sú umiestnené na širšom konci dutiny. Hydroxylové skupiny na 2 uhlíkovom atóme sú orientované v smere osi cyklodextrínu, zatiaľ čo hydroxylové skupiny na 3 uhlíkovom atóme sú orientované smerom do vnútra dutiny. Obalovú konformáciu tvoria glukózové jednotky spojené cez atómy kyslíka viazané na prvom a štvrtom uhlíkovom atóme. Konformácia je stabilizovaná vodíkovou väzbou medzi hydroxylovými skupinami na druhom a treťom uhlíkovom atóme. Dutina má hydrofóbny charakter, na rozdiel od hydrofilného povrchu cyklodextrínu.

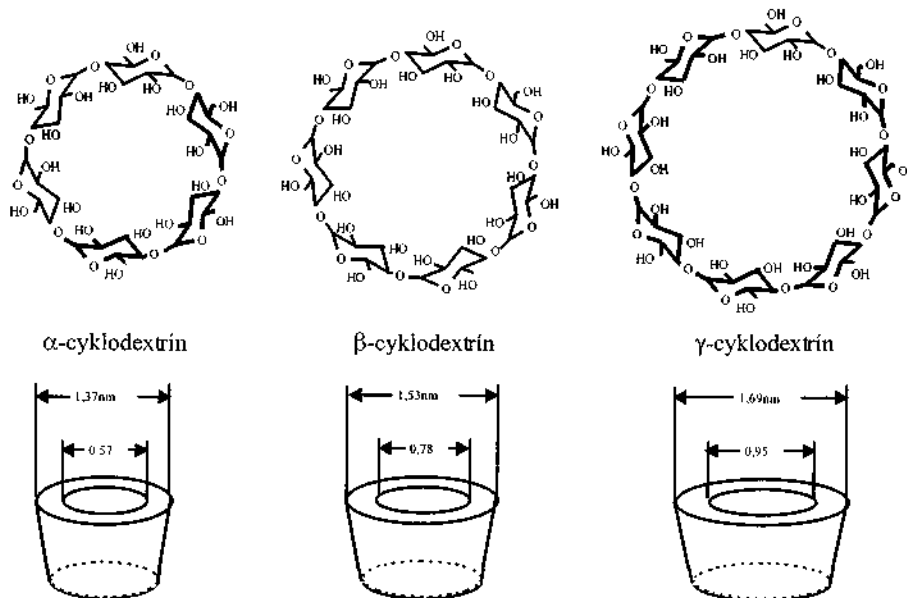
V praxi sa najčastejšie využívajú cyklodextríny so 6 (α -

Tabuľka I

Základné charakteristiky cyklodextrínov

Charakteristika	α -CD	β -CD	γ -CD
Počet glukózových jednotiek	6	7	8
Objem dutiny [10^6 pm^3]	174	262	427
Relatívna molekulová hmotnosť [Da]	973	1135	1297
Optická otáčavosť [α] ^a	153 ^b	162 ^b	176,1 ^b
Vnútrotný priemer dutiny [nm]	0,57	0,78	0,95
Vonkajší priemer dutiny [nm]	1,37	1,53	1,69
Výška torusu [nm]	0,78	0,78	0,78
Rozpustnosť vo vode [M]	0,114	0,016	0,179

^a Ako rozpúšťadlo bola použitá voda, $T = 22^\circ \text{C}$, $\lambda = \text{D}$, ^b prebraté z lit.¹⁰



Obr. 1. Schéma α -, (β - a γ -)cyklodextrínov. Horný obrázok zobrazuje pohľad zhora. Spodný pohľad z boku

-CD), 7 (β -CD) a 8 (γ -CD) glukózovými jednotkami, aj keď sa podarilo vyrobiť cyklodextríny s 9 (5-CD), 10 (e-CD), 11 (ϕ -CD) (cit.³⁶) a 12 (η -CD) (cit.⁷) glukózovými jednotkami. Z výpočtov o rozložení energie v molekule cyklodextrínov vyplynulo, že cyklodextríny s menším počtom glukózových jednotiek ako 6 sú energeticky nevýhodné⁸. Nakagawa a kol. však v roku 1994 publikovali syntézu 5 členného cyklodextrínu⁹ (pre- α -CD) a podľa no všetkých počítačových štúdií je pravdepodobná aj syntéza cyklodextrínov s menším počtom glukózových jednotiek¹⁰.

Cyklodextríny sa priemyselne vyrábajú enzymatickým štiepením škrobu cyklodextrín-glukonyltransferázou¹¹. Podarilo sa ich vyrobiť aj chemicky, avšak s veľmi malými výťažkami¹². Niektoré základné charakteristiky o α -, β - a γ -cyklodextrínoch su uvedené v tab. I.

2. Využitie cyklodextrínov a ich derivátov v plynovej chromatografii

2.1 Cyklodextríny

Cyklodextríny sa začali používať ako stacionárne fázy v plynovej chromatografii začiatkom 80-tych rokov. Využili sa najmä na separáciu izomérov halogén uhlíkových a izomerov aromatických zlúčenín^{13,14}. Cyklodextríny majú vysoké teploty topenia (nad 200 °C), preto sa v plynovej chromatografii používajú najmä ako tuhé fázy pre GSC. Za týmto účelom boli vyvinuté viaceré polymerne materiály na báze polyuretánov obsahujúce cyklodextrín^{15,16}, alebo sa cyklodextrín naviazal na inertný nosič (silikagél) chemickou väzbou čím sa získali stacionárne fázy použiteľné tak v HPLC (cit.¹⁷⁻¹⁹), ako aj v GSC (cit.^{20,21}).

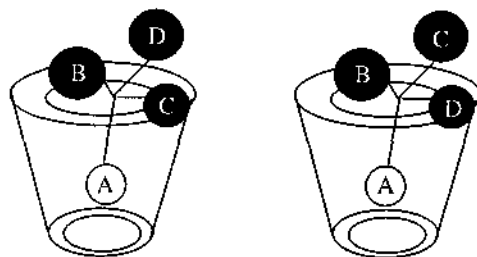
Prvá separácia optických antipódov metódou GLC na cyklodextrínových stacionárnych fázach bola publikovaná v roku 1983 (cit.²²). Predstava o princípe enantiomérovej separácie na cyklodextrínových fázach sa prebrała z röntgenových spektier. Predpokladá sa, že nepolárna časť enantiomérov (A na obr. 2) sa zasunie do dutiny cyklodextrínu a ostatné substituenty viazané na asymetrickom centre (B, C a D na obr. 2) interagujú stereospecificky s atómami cyklodextrínu.

Pretože separačná účinnosť chromatografických kolón tak s tuhými cyklodextrínmi (GSC), ako aj ich roztokmi v polárnych rozpúšťadlách (GLC) bola veľmi nízka a píky boli nesympetrické²³, čisté cyklodextríny sa v súčasnosti v plynovej chromatografii ako stacionárne fázy prakticky nepoužívajú.

2.2 Deriváty cyklodextrínov

2.2.1. Alkyl- a acyl- deriváty cyklodextrínov

Najjednoduchšie sa vyrábajú deriváty, v ktorých sa vodíkové atómy všetkých troch hydroxylových skupín nahradia rovnakým substituentom. Vzniknuté (2,3,6-tri-O-alkyl-, resp. 2,3,6-tri-O-acyl)- α -, β - a γ -CD sú pri laboratórnej teplote tuhé látky, alebo kvapaliny a možno ich používať do 180 °C. Peracyl-deriváty (2,3,6-tri-O-acetyl)- β -CD, (2,3,6-tri-O-benzyl)-P-CD a (2,3,6-tri-O-fluoroacetyl)- β -CD sú značne polárne zlúčeniny, ktoré sa ako stacionárne fázy v plynovej chromatografii nepoužívajú. Predpokladá sa, že polarita substituentov je príčinou asymetrie píkov²⁴ a nízkej enantioselektivity²⁵. Naproti tomu peralkyl-deriváty cyklodextrínov patria pri enantioselektívnych separáciách plynovou chromatografiou k najčastejšie používaným stacionárnym fázam. Aj pri derivátoch



Obr. 2 Znáznornenie interakcie enantiomérov s cyklodextrínom²³

cyklodextrínov sa predpokladá že princípom separácie je inklúzia nepolárnej časti enantiomérov a interakcie ostatných častí so substituentami cyklodextrínu. Najpoužívanejšími stacionárnymi fázami sú (2,3,6-tri-O-metyl)- β -CD, ktorý zaviedol do kapilárnej plynovej chromatografie v roku 1987 Juvancz so spol.²⁷ a (2,3,6-tri-O-pentyl)- α -, β - a γ -CD, ktoré použil ako prvý Kong²⁸. Substitúcia atómov vodíka v metylových skupinách permetylovaného cyklodextrínu atómami deutéria enantioselektivitu prakticky neovplyvňuje²⁹. Všetky peralkylované cyklodextríny vykazujú približne rovnakú enantioselektivitu. Výnimkou je (2,3,6-tri-O-etyl)- β -CD, na ktorom sa separujú enantioméry zlúčenín, ktoré nebolo možné separovať na tých peralkylovaných derivátoch^{24,30}. Zámenou metylu za etyl sa však pozorovalo pre niektoré enantioméry zhoršenie separácie²⁴. Okrem už spomínaných alkyl derivátov, sa študovali aj vlastnosti alkyl derivátov s počtom uhlíkových atómov väčším ako 5. Zistilo sa, že vyššie uhlíkaté alkyl deriváty (2,3,6-tri-O-heptyl)- α -CD (cit.²⁴), (2,3,6-tri-O-oktyl)-P-CD (cit.^{31,32}) a (2,3,6-tri-O-nonyl)- α -CD (cit.²⁴) vykazujú menšiu enantioselektivitu ako im korešpondujúce nižšie uhlíkaté deriváty. Zistilo sa, že retencia viacerých analytov závisí aj od dĺžky uhlíkového reťazca alkyl substituentov. Najmenšia retencia sa zistila na (2,3,6-tri-O-oktyl)- β -CD a najväčšia na (2,3,6-tri-O-metyl)- β -CD deviate.

Rozdielna reaktivita vodíkových atómov v hydroxylových skupinách umožňuje substituovať vodíkové atómy rôznymi funkčnými skupinami. Z rôznych alkylovaných cyklodextrínov sa v GC ako stacionárne fázy používajú najmä (2,6-di-O-pentyl-3-O-metyl)- β -CD (cit.³³) a (2,6-di-O-metyl-3-O-pentyl)-P-CD (cit.^{3,35}). Selektívna substitúcia vodíkového atómu v polohe 3 acylovou skupinou výrazne zlepšuje enantioselektivitu stacionárnej fázy. Táto acylová skupina umožňuje cyklodextrínovým derivátom selektívnu retenciu polárnych zlúčenín účinkom vodíkových väzieb a dipól-dipól interakcií. Takto vyrobené deriváty možno rozdeliť do dvoch skupín.

1 Do prvej skupiny patria deriváty s pentylmi v polohe 2,6. Doteraz sa prešudovávajú chromatografické vlastnosti (2,6-di-O-pentyl-3-O-acetyl)- β -CD (cit.³⁶), (2,6-di-O-pentyl-3-O-butyryl)- γ -CD (cit.³⁷), (2,6-di-O-pentyl-3-O-trifluoroacetyl)- α -, P-, γ -CD (cit.³⁸) a (2,6-di-O-pentyl-3-O-propionyl)- γ -CD (cit.³⁹) derivátov.

2 Do druhej skupiny patria deriváty s metylmi v polohe 2 a 6. Z tejto skupiny boli preskúmané chromatografické vlastnosti (2,6-di-O-metyl-3-O-acetyl)- β -CD (cit.²⁵), (2,6-di-O-metyl-3-O-trifluoroacetyl)- β -CD a (2,6-di-O-metyl-3-O-heptafluorobutyryl)- β -CD (cit.⁴⁰).

Maximálna pracovná teplota kolón so stacionárnymi fázami oboch skupín je 180 °C. Pri vyšších teplotách sa fáza rozkladá a film stacionárnej fázy na povrchu kapiláry sa trhá³⁸.

Spomínané 3-O-acyl deriváty vykazujú rozdielnu enantioselektivitu, ktorá závisí nielen od veľkosti acylovej skupiny, ale aj od jej štruktúry a elektronegativity atómov viazaných v tejto skupine. Vigh so spol. vyrobili (2,6-di-O-pentyl-3-O-chlór-acetyl)- β -CD, (2,6-di-O-Pe-3-O-dichlór-acetyl)- β -CD a (2,6-di-O-Pe-3-O-trichlór-acetyl)- β -CD deriváty a preskúmali ich chromatografické vlastnosti⁴¹. Zistilo sa, že enantioselektivita uvedených derivátov vzrastá s počtom atómov chlóru v acyle⁴¹. Do tejto skupiny derivátov treba ešte zaradiť (2,6-di-O-butyl-3-O-trifluoroacetyl)- β - γ -CD (cit^{42,43}), čo sú viskózne kvapaliny. Tieto stacionárne fázy boli použité na separáciu rôznych enantiomérov⁴². Najlepšie výsledky sa získali separáciou enantiomérov derivatizovaných aminokyselín⁴³. Deriváty (2,6-di-O-acyl-3-O-alkyl) a (2,6-di-O-acyl₁-3-O-acyl₂ kde acyl₁ a acyl₂ sú rôzne acylové skupiny) sa doteraz nevyužili ako stacionárne fázy v plynovej chromatografii.

Vzhľadom na rozdielnu reaktivitu vodíkových atómov v hydroxylových skupinách je možné selektívne substituovať vodíkové atómy v polohe 2 alebo 6. Cyklodextríny substituované v polohe 2 a 3 objemnejšími substituentami ako v polohe 6 sú známe ako inverzne substituované deriváty cyklodextrínov. Príprava inverzne substituovaných cyklodextrínov je veľmi komplikovaná⁴⁴. Inverzne substituované deriváty cyklodextrínov sa zaviedli do plynovej chromatografie ako stacionárne fázy v roku 1990 (cit.⁴⁵). Doteraz sa preskúmah chromatografické vlastnosti tak (2,3-di-O-pentyl-6-O-acyl)- α -, β - γ -CD ako aj (2,3-di-O-pentyl-6-O-metyl)- α -, β - γ -CD derivátov. Deriváty s acyl skupinami v polohe 6, na rozdiel od derivátov s acylovou skupinou v polohe 3, však nevykazovali požadované vlastnosti pre väčšinu študovaných analytov. Deriváty (2,3-di-O-pentyl-6-O-metyl)- α -, β - γ -CD separovali enantioméry väčšiny študovaných opticky aktívnych zlúčenín^{45,46}. Z týchto štúdií vyplynul záver, že enantioselektivita cyklodextrínových derivátov závisí od veľkosti alkylových substituentov a vzrastá substitúciou vodíkových atómov hydroxylových skupín na 3 uhlíkovom atóme objemným a na 6 uhlíkovom atóme menej objemným substituentom⁴⁷. Štúdiom vlastností cyklodextrínových derivátov v ktorých sa hydroxylové skupiny viazané na 6 uhlíkovom atóme nahradili atómami vodíka (2,3-di-O-pentyl-6-H)- α -, β - a γ -CD) sa zistilo, že enantioselektivita klesá v poradí $\gamma > \beta > \alpha$, čo je v kontraste s pozorovaniami pre deriváty cyklodextrínov, v ktorých boli substituované vodíkové atómy všetkých hydroxylových skupín⁴⁸. Veľmi malú enantioselektivitu vykazovali aj deriváty (2,3-di-O-metyl-6-H)- β -CD a (2,3-di-O-acetyl-6-H)- β -CD (cit.⁴⁹). Deriváty (2,3-di-O-acyl-6-O-alkyl)-CD a (2,3-di-O-acyl-6-O-acyl)-CD sa v plynovej chromatografii doteraz nepoužili ako stacionárne fázy.

Príprava (2-O-alkyl-3,6-di-O-alkyl) je experimentálne veľmi náročná^{49,52}. Z doteraz pripravených derivátov sa v plynovej chromatografii využil (2-O-metyl-O-3,6-di-O-pentyl)- γ -CD na separáciu opticky aktívnych zlúčenín v esenciálnych olejoch⁵¹ a (2-O-metyl-3,6-di-O-pentyl)- β -CD na enantiomérnu separáciu pesticídov a herbicídov⁵². Okrem týchto dvoch fáz sa v plynovej chromatografii ešte využil (2-O-metyl-3,6-di-anhydro)- β -CD (cit.⁴⁹).

2.2.2. Cyklodextrínové deriváty obsahujúce tercbutyl-dimetylsilylovú skupinu

Zvláštna pozornosť sa v literatúre venuje cyklodextrínovým derivátom obsahujúcim tercbutyl-dimetylsilylovú skupinu

(TBDMS), ktoré zaviedol do plynovej chromatografie Blum a kol.⁵³ v roku 1990. Z týchto cyklodextrínových derivátov sa v plynovej chromatografii používajú najmä typy (6-O-TBDMS-2,3-di-O-alkyl)-CD (cit^{54,55}), (6-O-TBDMS-2,3-di-O-acyl)-CD (cit^{54,55}) a (2,6-di-O-TBDMS)-CD. Deriváty s TBDMS skupinou v 6 polohe vykazujú veľmi dobrú enantioselektivitu, čo je v rozpore s predpokladom, že substitúcia v polohe 6 objemným substituentom by mala zapríčiniť zhoršenie enantioselektivity⁴⁷. Substitúciou H atómov v OH skupinách viazaných na užšom otvore cyklodextrínovej dutiny objemným substituentom (napr. TBDMS) sa zablokuje otvor dutiny. Objemná skupina spôsobí výrazné rozšírenie užšieho konca otvoru, čím sa torus zmení na valec⁵⁶. Všetky TBDMS cyklodextríny sú dobre rozpustné v nepolárnych polysiloxánoch, čo má značný význam pri príprave kolón so zmesnými fázami.

Príprava (6-O-TBDMS-2,3-di-O-alkyl)-CD a (6-O-TBDMS-2,3-di-O-acyl)-CD derivátov je relatívne jednoduchá^{45,7}. Porovnaním vlastností rôzne acylovaných derivátov sa zistilo, že zmena acylovej skupiny z (6-O-TBDMS-2,3-di-O-acetyl)- γ -CD na (6-O-TBDMS-2,3-di-O-butyl)- γ -CD významne neovplyvňuje separáciu enantiomérov. Značne rozdielnu enantioselektivitu však vykazujú rovnako substituované deriváty P-CD a γ -CD. Štúdiom vlastností derivátov (6-O-TBDMS-2,3-di-O-alkyl)- γ -CD sa zistilo, že enantioselektivitu významne ovplyvňuje dĺžka alkylového reťazca. Enantioselektivita (6-O-TBDMS-2,3-di-O-metyl)- γ -CD bola pre väčšinu opticky aktívnych zlúčenín s rozdielnymi funkčnými skupinami väčšia než (6-O-TBDMS-2,3-di-O-butyl)- γ -CD (cit.⁵⁸). Štúdiom vlastností derivátov (6-O-TBDMS-2,3-di-O-alkyl)- β a γ -CD, v ktorých sa ako substituenty použili metyl, etyl a propyl, sa zistilo, že najlepšie enantioselektívne vlastnosti vykazovali deriváty (6-O-TBDMS-2,3-di-O-etyl)- β a γ -CD rozpustené v slabopolárnom polysiloxáne SE-54. Kolóny s takouto zmesnou fázou však vykazovali nízke separačné účinnosti. Zmenšenie dutiny z P-CD na α -CD významne ovplyvnilo enantioselektivitu^{59,60}. Predĺžením uhlíkového reťazca alkylových substituentov na pentyl (2,3-di-O-pentyl-6-O-TBDMS)- β - a γ -CD sa však enantioselektivita významne znížila⁶¹.

Zistilo sa, že enantioselektivita derivátov cyklodextrínov, ktoré obsahujú tri alkylsilylové skupiny, závisí od počtu uhlíkových atómov v týchto alkyloch. Porovnaním vlastností derivátov (6-O-izopropyl-dimetylsilyl-2,3-di-O-etyl)- β -CD, (6-O-thexyl-dimethyl-silyl-2,3-di-O-etyl)- β -CD, (6-O-cyklo-hexyl-dimetylsilyl-2,3-di-O-etyl)- β -CD a (6-O-TBDMS-2,3-di-O-etyl)- β -CD sa zistilo, že cyklohexylový derivát vykazuje najnižšiu enantioselektivitu. Výmenou tercbutylu izopropylom sa znížila enantioselektivita cyklodextrínového derivátu, čo môže byť zapríčinené menšou hydrofóbnosťou izopropylovej skupiny⁶². Zo študovaných derivátov vykazoval najvyššiu enantioselektivitu (6-O-thexyl-dimethyl-silyl-2,3-di-O-ethyl)- β -CD (cit.⁶²).

(2,6-di-O-TBDMS)- γ -CD sa použil ako stacionárna fáza v plynovej chromatografii až v roku 1993 (cit⁶³). V súčasnosti sa ako stacionárne fázy používajú (2,6-di-O-TBDMS)- β - a γ -CD, (2,6-di-O-TBDMS-3-O-alkyl)- β - a γ -CD v ktorých sa ako alkylové substituenty využili metyl, etyl, propyl a acyl^{64,65}.

2.2.3. Iné deriváty cyklodextrínov

V roku 1995 Bicchi so spol. použili v plynovej chromatografii ako stacionárne fázy deriváty cyklodextrínov, ktoré mali v polohe 3,4-oxopentyllovú skupinu. Tieto deriváty (2,6-di-O-metyl-3-O-(4-oxopentyl))- β - a γ -CD a (2,6-di-O-pentyl-1-3-0-

-(4-oxopentyl)) (3 a γ CD, na rozdiel od (2,6-di-O-metyl-3-O-pentyl)- β - a γ -CD alebo (2,3,6-tri-O-pentyl)-P a γ -CD, vykazovali veľmi slabú enantioselektivitu⁶⁶ Opat sa potvrdilo, že štruktúra substituenta viazaného v polohe 3 významne ovplyvňuje enantioselektivitu CD derivátov

Medzi ďalšie deriváty, ktoré sa iba nedavno začali používať v plynovej chromatografii ako stacionárne fázy patria karbamátové deriváty cyklodextrínov Prvý raz boli použité v roku 1993 (cit⁶⁷) Ako substituenty sa použili fenylizokyanat, naftylizokyanat, izopropylizokyanat a propylizokyanat (Carb) v derivátoch (2,3,6-tri-O-Carb)-P-CD resp (2,6-di-O-metyl-3-O-Carb) β CD Karbamátové deriváty cyklodextrínov študovali v roku 1995 Takeichi so spol⁶⁸ Spolu s týmito derivátmi sa študovali aj vlastnosti (2,6-di-O-pentyl-3-O-Carb)- α -, β - a γ CD derivátov Štúdiom vplyvu substituenta v karbamátovej skupine na enantioselektivitu sa zistilo, že vplyv alkylov bol prakticky rovnaký, tento sa však výrazne odlišoval od vplyvu fenylvej skupiny⁶⁸ Na karbamátových derivátoch cyklodextrínov sa separujú najmä enantiomery opticky aktívnych zlúčenín, ktoré sú schopné tvoriť vodíkovú väzbu s izokyanátovou skupinou Separovali sa na nich aj enantiomery, ktoré sa neseperovali na alkylovaných alebo alkyl/acylovaných derivátoch cyklodextrínov Karbamáty cyklodextrínov sú tepelne stály Kolony s týmto typom stacionárnych fáz možno použiť do 200 °C

Cyklodextríny s aromatickými substituentami, sa využili v plynovej chromatografii ako stacionárne fázy iba nedavno Tak napríklad (2,6-di-O-benzyl-3-O-metyl)-P CD, (2,6-di-O-benzyl-3-O-pentyl) β CD, (2,6-di-O-benzyl-3-O-acetyl) β CD sa zatiaľ použili iba na separáciu enantiomerov polohových izomerov aromatických zlúčenín, pre ktoré vykazovali veľmi dobrú enantioselektivitu⁶⁹ Tieto fázy, sú polarnejšie ako im korešpondujúce alkyl deriváty napríklad (2,3,6-tri-O-metyl)-P CD alebo (2,3,6-tri-O-pentyl)- β -CD a sú vhodné najmä na separáciu enantiomerov schopných interagovať so stacionárnou fázou predovšetkým *n*, *n*, alebo van der Waalsovskými disperznými interakciami

Medzi deriváty používané v plynovej chromatografii ako stacionárne fázy treba zaradiť aj deriváty obsahujúce hydroxypropylovú skupinu (O-S-2-hydroxypropyl-2,3,6-tri-O-metyl) α -, β - a γ -CD Tieto deriváty sú viskózne kvapaliny a v plynovej chromatografii ich prvý raz použil Armstrong^{70,71} S hydroxypropylovou skupinou sa do cyklodextrínového derivátu zabudovalo ďalšie chirálne centrum Zmenou konfigurácie hydroxypropylovej skupiny (S namiesto R) sa významne zmenila enantiomerná selektivita stacionárnej fázy⁷¹

Na separáciu enantiomerov niektorých aromatických zlúčenín sa využili aj deriváty cyklodextrínov s heterocyklickými substituentami⁷²

3. Záver

V článku sú zhrnuté poznatky o α -, β - a γ -cyklodextrínoch a ich derivátoch, ktoré sa využili ako stacionárne fázy v kapilárnej plynovej chromatografii na separáciu enantiomerov organických opticky aktívnych zlúčenín Z článku vyplýva, že výhodné separácie vlastnosti vykazujú alkyl-, acyl- a nalkylsilylove (z nich najmä 6-O-TBDMS) CD deriváty Najpodrobnejšie sa preštudovali enantioselektívne vlastnosti alkyl-derivátov, z ktorých je najvhodnejší permetylovaný P-CD, na ktorom sa úspešne separovali enantiomery väčšiny študova-

ných opticky aktívnych zlúčenín Na separáciu enantiomerov polárnych opticky aktívnych zlúčenín sa osvedčili deriváty (6-O-TBDMS-2,3-di-O-acetyl) β - a γ -CD Na separáciu enantiomerov nepolárnych opticky aktívnych zlúčenín deriváty (6-O-TBDMS-2,3-di-O-alkyl) β - a γ -CD a (2,6-di-O-TBDMS-3-di-O-alkyl) β - a γ -CD Väčšina cyklodextrínových derivátov sa použila na separáciu enantiomerov vybraných opticky aktívnych zlúčenín a preto je veľmi obtiažne klasifikovať ich všeobecne použitie ako stacionárnych fáz na separáciu enantiomerov opticky aktívnych zlúčenín kapilárnou plynovou chromatografiou Na separáciu enantiomerov doteraz neštudovaných opticky aktívnych zlúčenín kapilárnou plynovou chromatografiou sa preto odporúča ako prvé stacionárne fázy použiť permetylovaný β -cyklodextrín a (6-O-tercetyl) β -cyklodextrín

LITERATURA

- Villiers A Compt Rend 772, 536 (1891)
- Schradinger F Z Untersuch Nahr Genussm 6, 865 (1903)
- Freudenberg K, Blomquist G, Ewald L, Soff K Ber Deutsch Chem Ges 69, 1258 (1936)
- Freudenberg K, Cramer F Z Naturforsch Teil B 3, 464 (1948)
- Pulley A O, French D Biochem Biophys Res Commun 5, 11 (1961)
- Koizumi K, Utamura T, Soto M, Nagai Y Carbohydr Res 153, 55 (1986)
- Endo T, Ueda H, Kobayashi S, Nagai T Carbohydr Res 269, 369 (1995)
- Sandararajan P R, Rao V S Carbohydr Res 139, 351 (1970)
- Nakagawa T, Ueno K, Kashiwa M, Watanabe J Tetrahedron Lett 35, 1921 (1994)
- Atwood J, Davies J E D, MacNicol B D, Vogtle F Comprehensive Supramolecular Chemistry (Lehn J M, ed), sv 3 Pergamon, Londyn 1996
- Takahashi Y, Ogawa T Carbohydr Res 164, 277 (1987)
- Angibeaud P, Utile J P Synthesis 9, 737 (1991)
- Smolkova-Keulemansova E, Kralova H, Krysl S, Feltl L J Chromatogr 241, 3 (1982)
- Smolkova-Keulemansova E, Neumannova E, Feltl L J Chromatogr 365, 279 (1986)
- Mizobuchi Y, Tanaka M, Shono T J Chromatogr 194, 153 (1981)
- Mizobuchi Y, Tanaka M, Shono T J Chromatogr 208, 35 (1981)
- Armstrong D W US 4 539 399
- Armstrong D W, DeMond W J Chromatogr Sci 22, 411 (1984)
- Hinze W L, Reil T E, Armstrong D W, DeMond W, Alak A, Ward T Anal Chem 57, 237 (1985)
- Reid G L, Wall W T, Armstrong D W J Chromatogr 633, 143 (1993)
- Reid G L, Monge C A, Wall W T, Armstrong D W J Chromatogr 633, 135 (1993)
- Koscielski T, Sybilska D, Jurczak J J Chromatogr 280, 131 (1983)
- Kong W A Chromatographic Enantiomer Separations with Modified Cyclodextrin Huthig, Heidelberg 1992
- Keim W, Kohnes A, Meltzow W, Rohner H J High Resolut Chromatogr 14, 507 (1991)

- 25 Nowotny H P , Schmalzing D , Wistuba D , Schurig V J High Resolut Chromatogr 72,383(1989)
- 26 Schomburg G , Deege A , Hindrichs H , Hubner E , Husmann H J High Resolut Chromatogr 75,579(1992)
- 27 Juvancz Z , Alexander G , Szjetli T J High Resolut Chromatogr Commun 10, 105 (1987)
- 28 König W , Lutz S , Wenz G Angew Chem Int Ed Engl 27,979(1988)
- 29 Jung M , Schmalzing D , Schung V J Chromatogr 552, 43(1991)
- 30 Askari C , Hener V , Schmarr H G , Rapp A , Mosandl A Fresenius' J Anal Chem 540,768(1991)
- 31 Bates P S , Parker B , Patti A F J Chem Soc Perkin Trans II 7994, 657
- 32 Jing P , Fu R N , Dai R J , Gu J L Chromatographia 43, 628 (1996)
- 33 Bicchi C , Artuffo G , D'Amato A , Manzini V , Galii A , Galii M J High Resolut Chromatogr 75,710(1992)
- 34 Kong W A , Gehrcke B J High Resolut Chromatogr 16, 175 (1993)
- 35 Bicchi C , D'Amato A , Manzini V , Galii A , Galii M J Chromatogr A 666, 137 (1994)
- 36 Kong W A , Lutz S , Wenz G , Bey E J High Resolut Chromatogr 77, 506 (1988)
- 37 Kong W A , Krebber R , Mischick P J High Resolut Chromatogr 72, 732 (1989)
- 38 Li W Y , Jin H L , Armstrong D A J Chromatogr 509, 303 (1993)
- 39 Jin Z , Jin H L Chromatographia 38, 22 (1994)
- 40 Schung V , Jung M , Schmalzing D , Schleimer M , Duvokot J , Buyten J C , Peene J A , Mussche P J High Resolut Chromatogr 13, 470 (1990)
- 41 Vigh G , Shtangkoon A J Microcolumn Sep 7,493 (1995)
- 42 Liu Y , Lou X , Guo F , Huan H , Shen Y , Zhou L , v knihe *Proceedings of the 15th Symposium on Capillary Gas Chromatography* (Sandra P , ed), str 201 Huthig, Heidelberg 1993
- 43 Wan H , Zhou X , Ou O J Chromatogr A 673, 107 (1994)
- 44 Takeo M , Mitoh M , Uemura K Carbohydr Res 187, 203 (1989)
- 45 Kong W A , Icheln D , Runge T , Pforr I , Krebs A J High Resolut Chromatogr 13, 702 (1990)
- 46 Kong W A , Kruger A , Icheln D , Runge T J High Resolut Chromatogr 75, 184 (1992)
- 47 Venema A , Hendrichs H , Geest R J High Resolut Chromatogr 14, 676 (1991)
- 48 Runge T , Lange M , Kong W A , v knihe *Proceedings of the 15th Symposium on Capillary Gas Chromatography*, (Sandra P , ed), str 279 Huthig, Heidelberg 1993
- 49 Burger D V , Cargamco R J F , Spies H S C , Burger J W G , v knihe *Proceedings of the 18th Symposium on Capillary Gas Chromatography* (Sandra P , Devos G , ed) 7996, 2183
- 50 Jindrich J , Pitha J , Lindberg B , Seffers P , Harata K Carbohydr Res 266, 75 (1995)
- 51 Kong W A , Gehrcke B , Icheln D , Evers P , Donecke J , Wang W J High Resolut Chromatogr 75,367(1992)
- 52 Kong W A , Icheln D , Runge T , Pfaffenberger B , Ludwig P , Huhnerfuss H J High Resolut Chromatogr 74,530(1991)
- 53 Blum W , Aichholz R J High Resolut Chromatogr 13, 515 (1990)
- 54 Dietrich A , Maas B , Karl V , Kreis P , Lehmann D , Weber B Mosandl A J High Resolut Chromatogr 75, 176(1992)
- 55 Dietrich A , Maas B , Messer W , Bruche G , Karl V , Kauzinger A , Mosandl A J High Resolut Chromatogr 75, 530 (1992)
- 56 Kobor F , Angermund K , Schomburg G J High Resolut Chromatogr 16, 299 (1993)
- 57 Fugedi P Carbohydr Res 792, 366 (1989)
- 58 Maas B , Dietrich A , Mosandl A J Microcolumn Sep 8, 47 (1996)
- 59 Bicchi C , D'Amato A , Manzini V , Galii A , Galii M , v knihe *Proceedings of the 18th Symposium on Capillary Gas Chromatography* (Sandra P , Devos G , ed) 7996, 450
- 60 Kim B E , Lee S H , Park K S , Lee K P , Park J H J High Resolut Chromatogr 20,208(1997)
- 61 Bicchi C , D'Amato A , Manzini V , Galii A , Galii M J Chromatogr A 742, 161 (1996)
- 62 Kim B E , Lee K P , Park K S , Lee S H , Park J H J High Resolut Chromatogr 20,437(1997)
- 63 Maas B , Dietrich A , Karl V , Kauzinger A , Lehmann R , Kopke T , Mosandl A J Microcolumn Sep 5,421 (1993)
- 64 Maas B , Dietrich A , Beck T , Borner S , Mosandl A J Microcolumn Sep 7,65(1995)
- 65 Icheln D , Gehrcke B , Piprek Y , Mischick P , Kong W A , Dessoy M , Morel A F Carbohydr Res 280,237(1996)
- 66 Bicchi C , D'Amato A , Manzini V , Galii A , Galii M J High Resolut Chromatogr 78,295(1995)
- 67 Stoev G , Gancheva M , v knihe *Proceedings of the 15th Symposium on Capillary Gas Chromatography* (Sandra P , ed), str 290 Huthig, Heidelberg 1993
- 68 Takeichi T , Toriyama H , Shimura S , Takayama Y , Monkawa M J High Resolut Chromatogr 78,179(1995)
- 69 Xiao D Q , Che B Q , Fu R N , Gu J L , Wen Y X , Ling Y , Zhang H B Chromatographia 44, 393 (1997)
- 70 Armstrong D W , Li W Pitha J Anal Chem 762,214(1990)
- 71 Armstrong D W , Li W , Chang C D , Pitha J Anal Chem 762,914(1990)
- 72 Xiao D Q , Ling Y , Fu R N , Gu J L , Luo A Q Chromatographia 46, 85 (1997)

I. Špánik and J. Krupčík (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University Bratislava Slovak Republic*) **The Use of Cyclodextrin and Their Derivatives as Stationary Phases for Separation of Enantiomers by Capillary Gas Chromatography**

The review deals with the use of cyclodextrins (CD) and their derivatives as stationary phases in gas chromatography for separation of enantiomers of organic substances. Unlike the native cyclodextrins, their alkyl, acyl and tert-butyl(trimethyl)silyl derivatives are successfully used as stationary phases in capillary gas chromatography. The enantioselectivity of the CD derivatives can be changed both by the nature of silyl substituents and by the type of CDs. α -, β - and γ -CD derivatives with bulkier substituents in positions 2 and 3 than in position 6 exhibit a specific enantioselectivity compared with those containing equal substituents.

NOVĚJŠÍ POZNATKY O SANGUINARINU A PŘÍBUZNÝCH ALKALOIDECH*

JIRÍ DOSTÁL a JIRÍ SLAVÍK

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

Došlo dne 28 I 1999

Klíčová slova sanguinarin, alkaloidy

Obsah

- 1 Úvod
- 2 Výskyt
- 3 Objev alkaloidů
- 4 Izolace
- 5 Chemické přeměny
- 6 Struktura volných bází
- 7 Biologická aktivita

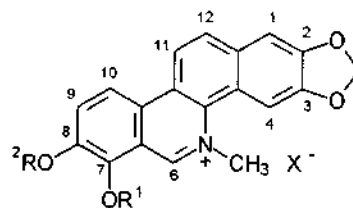
1. Úvod

Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA) jsou poměrně malou skupinou přirodních látek, které jsou na první pohled napadné svým výrazným zbarvením. Dosud je jich známo 15 kromě artefaktů a syntetických derivátů. Na základním tetracyklickém skeletu se nalézají různé kombinace methoxylové, methylenoxidové nebo hydroxylové skupiny. Podle typu substituce rozlišujeme čtyři podskupiny KBA: 1) 2,3,7,8-tetrasubstituované alkaloidy jsou sanguinarin (I), chelerythrin (II), fagaridin (III) a isofagaridin (IV), 2) 2,3,8,9-tetrasubstituované nitidin (V), avicin (VI) a fagaronin (VII); 3) pentasubstituované sanguilutin (VIII), sanguirubin (IX), chelirubin (X), chelilutin (XI), 10-hydroxysanguinarin (XII) a 10-hydroxychelerythrin (XIII), 4) hexasubstituované makarpin (XIV) a 12-hydroxychelirubin (XV).

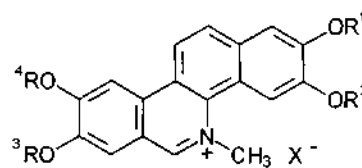
2. Výskyt

Kvartérní benzofenanthridinové alkaloidy se vyskytují v řadě rostlinných druhů čeledi makovitých (*Papaveraceae*), zemědýmovitých (*Fumariaceae*) a routovitých (*Rutaceae*)^{1,2}. Jejich zastoupení v rostlinách kolísá od dominantních alkaloidů až po minoritní. Pravděpodobně nejbohatším zdrojem sanguinarinu (I) je severoamerická bylina *Sanguinaria canadensis* L. Při poranění roní intenzivně červený latex a proto je lidově nazývána krvavý kořen (bloodroot). Obsah KBA

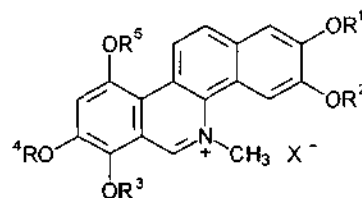
v oddencích dosahuje až 6 % sušiny^{3,4}. Jediným našim (a evropským) druhem produkujícím sanguinarin ve větším množství



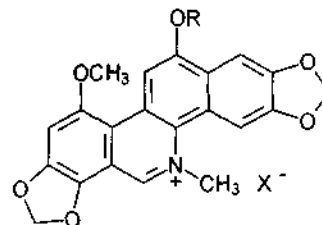
- I. $R^1 + R^2 = CH_2$
 II. $R^1 = R^2 = CH_3$
 III. $R^1 = H, R^2 = CH_3$
 IV. $R^1 = CH_3, R^2 = H$



- V. $R^1 + R^2 = CH_2, R^3 = R^4 = CH_3$
 VI. $R^1 + R^2 = R^3 + R^4 = CH_2$
 VII. $R^1 = H, R^2 = R^3 = R^4 = CH_3$



- VIII. $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = CH_3$
 IX. $R^1 = R^2 = R^5 = CH_3, R^3 + R^4 = CH_2$
 X. $R^1 + R^2 = R^3 + R^4 = CH_2, R^5 = CH_3$
 XI. $R^1 + R^2 = CH_2, R^3 = R^4 = R^5 = CH_3$
 XII. $R^1 + R^2 = R^3 + R^4 = CH_2, R^5 = H$
 XIII. $R^1 + R^2 = CH_2, R^3 = R^4 = CH_3, R^5 = H$



- XIV. $R = CH_3$
 XV. $R = H$

* Předneseno na konferenci Pokroky v organické, biorganické a farmaceutické chemii, Liblice (16 - 18. 11. 1998)

ství je známá bylina vlašovičník větší (*Chelidonium majus* L.)^{5,6}. Celá rostlina je bohatě prostoupena mléčnicemi a při poranění roní hustý oranžový latex. Barva latexu je výsledkem kompozice červeného sangumarinu, žlutého chelerythnu a dvou protoberbenových alkaloidů, oranžového koptisinu a žlutého berberinu. Obsah KBA v kořeni vlašovičníku je kolem 0,6 % sušiny^{7,8}, v latexu je až 10x vyšší⁹. Dalším významným zdrojem KBA je himalájská bylina *Dicranostigma lactucoides* Hook f et Thoms obsahující až 4 % KBA v suchém kořeni¹⁰⁻¹², oba druhy rodu *Macleaya*, tj. *M. microcarpa* (Maxim.) Fedde a *M. cordata* (Willd.) R. Br rostoucí na Dálném Východě^{13,14} a u nás často pěstované jako dekorativní rostliny, a některé druhy rodu *Bocconia* Střední a Jižní Ameriky. Obecně platí, že obsah KBA v kořenech je podstatně vyšší (až o několik řádů) než v nadzemních částech rostliny. Alkaloidy typu nitidinu (V-VII) se nalézají pouze v čeledi *Rutaceae*¹.

3. Objev alkaloidů

Sangumarin (I) a chelerythn (II), jediné dva komerčně dostupné KBA, byly objeveny v minulém století (tabulka I). Sangumann poprvé popsal James Dana roku 1827 jako hlavní barevnou složku *S. canadensis*¹⁶. Čistý sangumarin připravil poprvé Gadamer¹⁷. Strukturu obou alkaloidů objasnili v roce 1931 rakouští chemici Ernst Spath a Fritz Kuffner na základě chemické degradace^{18,19}. V letech 1954-1960 izolovali Slavík a Slavíková několik minoritních KBA: chelirubin (X) a chelilutin (XI) z *Chelidonium majus*²⁰ a ze *Sanguinaria canadensis*³ a kromě nich sanguilutin (VIII) a sanguirubin (IX) ze *S. canadensis*³. První polovina názvu odkazuje na rostlinný druh, druhá polovina je odvozena z latinského výrazu pro příslušnou barvu (*luteus* žlutý, *ruber* červený). Tři nové hydroxylované deriváty XII, XIII a XV získali Tana-

Tabulka I
Chronologický přehled objevů KBA⁴

Alkaloid	Objev	Rostlinný druh
Sangumarin	1827 Dana	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Chelerythn	1839 Probst	<i>Chelidonium majus</i>
Chelirubin	1954 Slavík	<i>Chelidonium majus</i>
Chelilutin	1954 Slavík	<i>Chelidonium majus</i>
Makarpin	1955 Slavík	<i>Macleaya microcarpa</i>
Avicin	1959 Arthur	<i>Zanthoxylum avicennae</i>
Nitidin	1959 Arthur	<i>Zanthoxylum nitidum</i>
Sanguirubin	1960 Slavík	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Sanguilutin	1960 Slavík	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Fagaromin	1972 Messmer et al	<i>Fagara zanthoxyloides</i>
Fagaridin	1973 Torto et al	<i>Fagara zanthoxyloides</i>
10(12)-Hydroxy-sangumarin chelerythn chelirubin	1990 Tanahashi, Zenk ²¹	<i>Eschscholtzia californica</i>
Isofagaridin	1993 Fang et al ²⁴	<i>Zanthoxylum nitidum</i>

^a Původní literatura do roku 1989 je uvedena v práci⁵

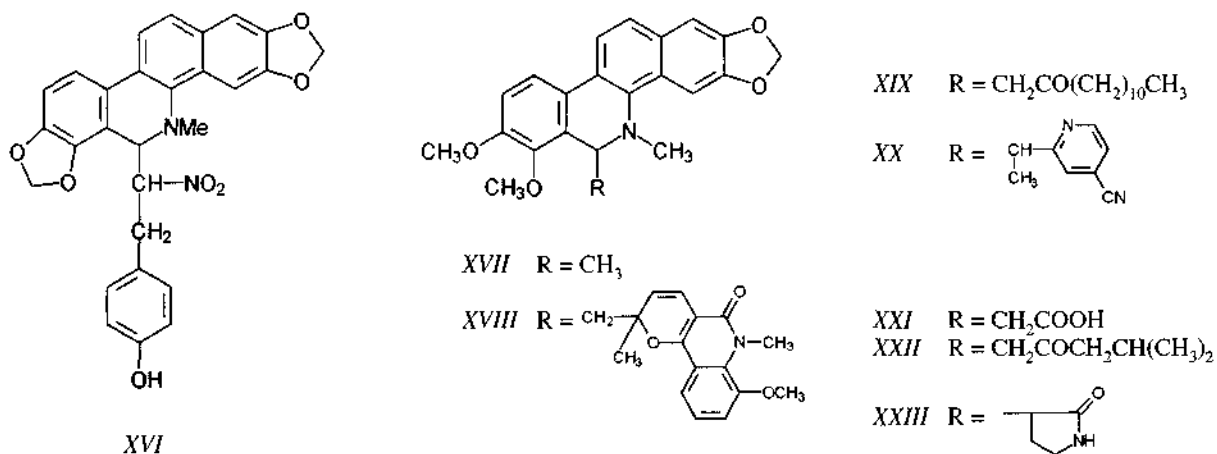
hashi a Zenk z buněčných kultur *Eschscholtzia californica* po aplikaci kvasinkového elicitoru²¹, patogenního faktoru, který vyvolává obrannou reakci rostlinných buněk spojenou se zvýšenou biosyntézou KBA. Zcela nedávno zjistili Nakanishi a Suzuki²² na základě důkladných studií UV a NMR, že fagaridin²³ (III) má ve skutečnosti strukturu isofagaridinu²⁴ (IV). Latka III není považována za přírodní produkt.

4. Izolace

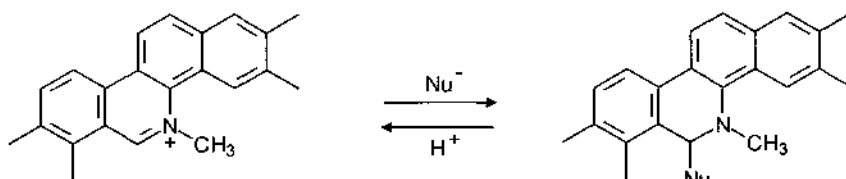
Obecný izolační postup k získání frakce KBA může být popsán následujícím způsobem. Je typicky platný pro druhy s dominantním zastoupením KBA (např. *D. lactucoides*, *S. canadensis*). Rostlinný materiál je extrahován methanolem za horka, surový extrakt je po zahuštění rozpuštěn ve zředěné sírové kyselině. Kyselý filtrát je alkalizován roztokem Na_2CO_3 . Nelze použít NaOH, protože by došlo ke kontaminaci podílu bázemi kvartérních protoberberinů. Vzniklá sraženina volných bází alkaloidů je extrahována etherem. Organická fáze je oddělena, odpařena a krystalována ze zředěné HCl. Chloridy KBA jsou v kyselé prostředí méně rozpustné než hydrochloridy ostatních, hlavně protopimových alkaloidů. Oddělená směs kvartérních chloridů je dále dělena kolonovou chromatografií na kyselém Al_2O_3 buď jako směs acetatů³ nebo chloridů¹¹. Alternativním způsobem dělení KBA je preparativní chromatografie s nepolárním sorbentem a vodnou mobilní fází²¹. Tento postup nelze použít tam, kde jsou ve značné převaze alkaloidy tvořící téměř nerozpustný hydrochlorid, např. chelidonin v *Ch. majus* Tam, i všude jinde kde jsou KBA v malém množství, je nezbytné k jejich oddělení použít např. selektivní vysrážení kyanidovým anionem^{3,17}.

5. Chemické přeměny

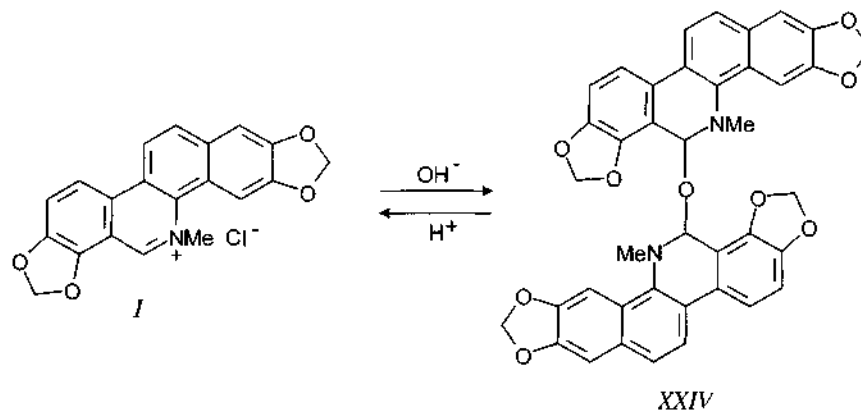
Základním chemickým rysem KBA je citlivost k nukleofilnímu útoku na iminiovou vazbu $\text{C}=\text{N}^+$ (schéma 1, Nu = nukleofil). Tento proces je spojen s řadou nápadných změn. Kvartérní kation alkaloidu je barevný a ve vodě rozpustný, vzniklý adukt s trojvazným atomem dusíku je bezbarvý a ve vodě nerozpustný. V případě derivátů s charakterem aminoacetátů a aminaů (schéma 1, Nu = OR, NHR) je reakce v zásadě reverzibilní, tzn. působením kyseliny na adukt vzniká opět barevná kvartérní sůl. Jiné deriváty, např. 6-kyanidihydrobenzofenanthridiny (schéma 1, Nu = CN), jsou naopak značně odolné vůči kyselinám. V literatuře je řada informací o těchto derivátech a okolnostech jejich vzniku, zejména o přeměnách s C-nukleofily (CN^- , Gngnardova činidla, nitromethan, aceton, butanon, acetaldehyd)¹⁵. Naproti tomu jsou minimální údaje o reakcích s kyslíkatými, siričnými a dusíkatými nukleofily. Některé C-adeny byly izolovány z rostlin a představují zajímavé přírodní produkty. Alkaloid nitrotyrasangumarin (XVI) izolovaný z *Hypecoum imberbe* je jednou z mála přírodních mtrosloučem²⁵. Předpokládá se, že vzniká oxygenací tyraminu a následnou adicí α -nitrokarbamiontu na iminiovou vazbu sangumarinu (I). Z druhů *Zanthoxylum* bylo izolováno několik neobvyklých derivátů chelerythnu s různou uhlíkatou funkcí v poloze 6. Alkaloidy 6-methylidihydrochelerythrin (XVII) a simulanochinolin



Schema 1



Schema 2



(XVIII) obsahující 2-chmohnon byly nalezeny v *Z simu lans*^{26,27} Tridekanonchelerythrin (XIX) byl izolován ze *Z in te grifolium*²⁸ Ailanthoidin (XX) ze *Z ailanthoides* obsahuje 4-kyanpyridin²⁹ Zpracováním kůry *Z spinosum* byly objeveny 6-karboxymethyl-dihydrochelerythrin (XXI), 6-(4-methyl-2-oxopentyl)-dihydrochelerythrin (XXII) a chelelaktam (XXIII) s navazaným 2-pyrrohdonem³⁰ Kromě toho byl získán dimer alkaloid kajmandimerin, v němž jsou dvě jednotky dihydrochelerythrinu spojeny formylmetylenovou skupinou³⁰

6. Struktura volných bází

Specifickou kapitolou v chemii KBA je tvorba volných bází. Pojem volná báze (free base) je v chemii alkaloidů univerzálně používán na označení produktu bazického charakteru, který vznikl alkalizací soli alkaloidu a v kyselém prostředí poskytuje opět sůl. Citlivost na míru alkalizace je dána hodnotou pK_A amoniové soli a závisí na chemické pova-

ze alkaloidní struktury. Volné báze alkaloidů se nemohou vyskytovat v rostlinných tkáních pro jejich více či méně kyselou reakci a proto je můžeme považovat za svého druhu artefakty.

Existují dva způsoby, jak připravit volné báze KBA: 1) Sůl KBA je rozpuštěna ve vodě a roztok je zalkalizován Na₂CO₃. Bílá sraženina báze je oddělena, promyta vodou a sušena. Tato metoda zaručuje velmi dobrý výtěžek s minimálními ztrátami, poskytuje však amorfni produkt. Předpokladem je vysoce čistá kvarterní sůl alkaloidu. 2) Elegantnější alternativou je extrakce sraženiny báze do nepolárního rozpouštědla. Používali jsme přednostně diethylether, možno použít i benzen či jina uhlovodíková rozpouštědla. Nevhodný je chloroform (zbytky kyselin rozkládají bázi) či vyšší alkoholy (riziko chemických přeměn). Organická fáze je oddělena a zahuštěna ke krystalizaci. V tomto případě jsou báze KBA získány jako bezbarvé krystaly s vyšší a ostřejší teplotou tání, ale výtěžek je zpravidla nižší než v první metodě. V některých případech jsme pozorovali vznik vedlejších produktů dosud nezjištěné konstituce.

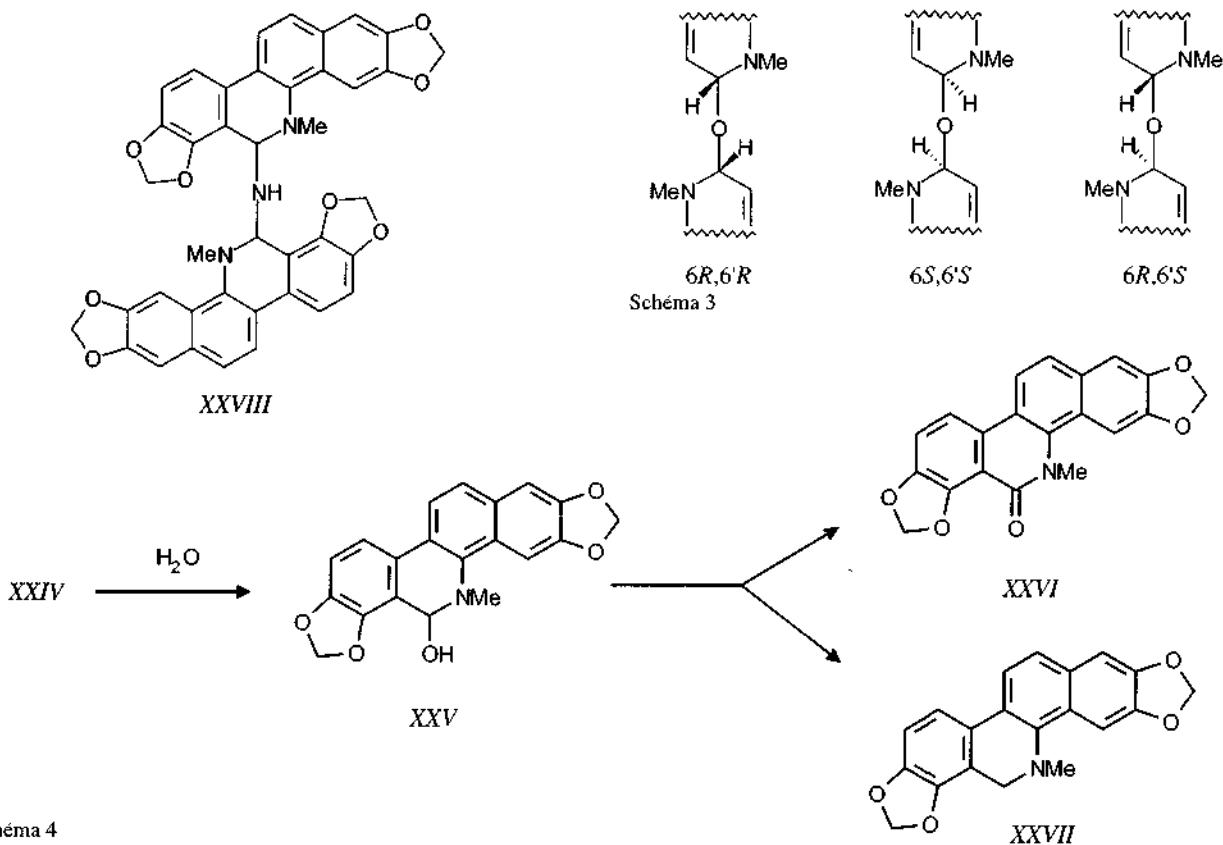


Schéma 4

Předpokládalo se, že volné báze KBA mají hydroxylovou skupinu kovalentně vázanou na atom 6 (schéma 1, Nu = OH), přestože experimentálně její přítomnost nebyla prokázána. Jde o cyklický semiaminoacetal, často nazývaný historickým termínem pseudobáze. Zjistili jsme, že báze sanguinarinu má konstituci bis(dihydrosanguinarinyl)etheru (XXIV) (schéma 2)³¹. V alkalickém prostředí dochází ke kondenzaci dvou molekul pseudobáze za uvolnění molekuly vody. Konstituce báze byla určena na základě hmotnostních spekter, elementární analýzy a NMR spektroskopie. NMR spektrum báze sanguinarinu ale poskytlo mnohem komplexnější obraz, neboť ve spektru bylo identifikováno 5 sloučenin: 1) majoritní stereoizomer dimerní báze XXIV, pravděpodobně racemát 6*R*,6'*R* + 6*S*,6'*S*, který je podle výpočtů AM1 termodynamicky preferován³² a 2) minoritní izomer báze XXIV, *meso*-forma 6*R*,6'*S* vzhledem k symetrické struktuře identická s 6*S*,6'*R*-izomerem (schéma 3). Další tři deriváty byly vedlejší produkty vzniklé v roztoku CDCl₃: 3) 6-hydroxydihydrosanguinarin (XXV) jako důsledek hydrolyzy dimerního aminoacetalu XXIV vlivem zbytkové vody v CDCl₃, 4) Oxosanguinarin (XXVI) a 5) dihydrosanguinarin (XXVII) byly produkty částečné disproportionace pseudobáze XXV (schéma 4). Tvorba oxosanguinarinu a dihydrosanguinarinu byla prokázána v nezávislém experimentu³¹, při kterém bylo složení alkalické reakční směsi monitorováno pomocí HPLC. Protože deriváty XXVI (laktam) a XXVII (substituovaný naftylamin) jsou nebazické alkaloidy, jsou snadno detegovatelné v silně kyselé mobilní fázi³¹. Disproportionace heterocyklických pseudobází je jev obecně známý, popsán i u jiných systémů^{33,34}.

6-Hydroxydihydrosanguinarin (XXV) byl nedávno popsán jako nový alkaloid z *Dactylicapnos torulosa*³⁵. Autoři látku popisují jako amorfni prášek žluté barvy a uvádějí spektrální charakteristiky. Srovnání ¹H a ¹³C NMR spekter s našimi údaji^{31,36} ukazuje zřetelnou diskrepanci. Navíc se zdá nepravděpodobné, že by semiaminoacetal XXV mohl být izolován v intaktním stavu, když byla při izolaci použita 5 % HCl (cit.^{35,37}).

Podobná konstituce volné báze jako u sanguinarinu byla zjištěna také u chelerythrinu³⁸, chelirubinu a chelilutinu³⁹. V případě sanguilitinu (VIII), pentamethoxysubstituovaného alkaloidu, byla jako báze prokázána skutečná heterocyklická pseudobáze. Hydroxylová skupina byla potvrzena v IČ a ¹H NMR spektru⁴⁰. Krystalizací této pseudobáze z benzenu byl získán monokrystal vhodný pro rentgenostrukturní analýzu. Po provedené analýze bylo zjištěno, že krystal byl racemický bis(dihydrosanguilutiny)ether⁴⁰. Nepolární prostředí tedy podporuje vznik méně polárního derivátu.

Studovali jsme také reakci sanguinarinu s koncentrovaným vodným amoniakem³¹. Vzniklá sraženina obsahuje směs dimerní báze XXIV a jejího dusíkatého analogu, bis(dihydrosanguinarinyl)aminu (XXVIII) v poměru cca 1:3 jako výsledek kompetice obou nukleofilů přítomných ve vodném NH₃. Krystalizace reakční směsi z etheru poskytla dimerní amin XXVIII. Elementární analýza potvrdila přítomnost tří atomů dusíku a skupina NH vykazovala diagnostický pás při 3372 cm⁻¹ v IČ spektru³¹. Podobně reagovaly s vodným NH₃ i další studované KBA. Dimerní aminy (aminaly), stejně jako dimerní báze (aminoacetal), poskytují se zředěnými

kyselinami okamžitě barevnou kvarternu sůl ve smyslu schématu 2

7. Biologická aktivita

Biologická aktivita KBA je velmi různorodá. Je třeba rozlišit skupinu sangumarinu a skupinu nitidinu. Sangumarin (7) a chelerythrin (77) vykazují zřetelně antimikrobiální, antimykotické, antiplakové a protizánětlivé účinky⁴¹⁻⁴³. Kombinace těchto aktivit je výhodná zejména pro stomatologické aplikace v léčbě a prevenci zánětlivých onemocnění parodontu⁴⁴⁻⁴⁵. Originální český výrobek SANTOIN (zubní pasta, ústní voda) obsahuje směs sangumarinu a chelerythrinu z *Macleaya cordata* a je patentově chráněn⁴⁶. V Rusku je podobná směs pod názvem SANGUIRITRIN užívána zevně jako antimikrobiální přípravek a vnitřně při myopatiích a následcích obrny (inhibice acetylcholinesterasy)⁴⁷. Vhodnost perorální aplikace těchto alkaloidů je problematická vzhledem k prokázané hepatotoxické sangumarinu⁴⁸. Podrobný přehled o interakcích sangumaru s enzymy a různými typy buněk publikovaly Vavřecková a Ulínchová⁴⁹. Chelerythrin je v současné době studován jako selektivní inhibitor protein kvasy C (cit⁵⁰⁻⁵²). Alkaloidy nitidinu (V) a fagaromnu (VII) vykazují naproti tomu určité antileukemické aktivity a nemají účinky sangumarinu⁴¹⁻⁵³⁻⁵⁴.

LITERATURA

- Krane B D, Fagbule M O, Shamma M, Gozler B J Nat Prod 47, 1 (1984)
- Šímanek V, v knize *The Alkaloids* (Brossi A, ed), sv 26, str 185 Academic Press, New York 1985
- Slavík J, Slavíkova L Collect Czech Chem Commun 25, 1667 (1960)
- Thorne E M, Boulware R T, Harkrader R J, Southard G L J Soc Cosmet Chem 37, 279 (1986)
- Taborská E, Bochořáková H, Paulová H, Dostal J Planta Med 60, 380 (1994)
- Taborská E, Bochořáková H, Dostal J, Paulová H Cesk Farm 44, 71 (1995)
- Slavík J Cesk Farm 4, 15 (1955)
- Bugatti C, Colombo M L, Tome F J Chromatogr 393, 312 (1987)
- Tome F, Colombo M L Phytochemistry 40, 37 (1995)
- Slavík J, Slavíkova L Collect Czech Chem Commun 26, 1839 (1961)
- Dostal J, Taborská E, Slavík J Fitoterapia 63, 61 (1992)
- Bochořáková H, Paulová H, Dostal J, Musil P, Taborská E Poster na 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research Viden 31 srpen - 4 září 1998
- Slavík J, Slavíkova L Chem Listy 49, 106 (1955)
- Slavík J, Slavíkova L, Appelt J Collect Czech Chem Commun 30, 887 (1965)
- Dostal J, Potaček M Collect Czech Chem Commun 55, 2840 (1990)
- Dana J F NY Med Phys J 6, 218 (1827)
- Gadamer J, Stichel A Arch Pharm 262, 488 (1924)
- Spath E, Kuffner F Ber Dtsch Chem Ges 64, 370 (1931)
- Spath E, Kuffner F Ber Dtsch Chem Ges 64, 1123 (1931)
- Slavík J, Slavíkova L Chem Listy 48, 1382 (1954)
- Tanahashi T, Zenk M H J Nat Prod 53, 579 (1990)
- Nakamishi T, Suzuki M J Nat Prod 61, 1263 (1998)
- Torto F G, Mensah I A, Baxter I Phytochemistry 12, 2315 (1973)
- Fang S D, Wang L K, Hecht S M J Org Chem 58, 5025 (1993)
- Pabuççuoğlu V, Arar G, Gozler T, Freyer A J, Shamma M J Nat Prod 52, 716 (1989)
- Chen I S, Wu S J, Tsai I L, Wu T S, Pezzuto J M, Lu M C, Chai H, Suh N, Teng C M J Nat Prod 57, 1206 (1994)
- Wu S J, Chen I S Phytochemistry 34, 1659 (1993)
- Jen C M, Tsai I L, Horng D J, Chen I S J Nat Prod 56, 2019 (1993)
- Ishii H, Ishikawa T, Takeda S, Mihara M, Koyama K, Ogata K, Harayama T Chem Pharm Bull 39, 1340 (1991)
- Ng K M, Gray A I, Waterman P G Phytochemistry 26, 3251 (1987)
- Dostal J, Bochořáková H, Taborská E, Slavík J, Potaček M, Budešmský M, de Hoffmann E J Nat Prod 59, 599 (1996)
- Marek R, Tousek J, Kralík L, Dostal J, Sklenar V Chem Lett 7997, 369
- Bunting J W Adv Heterocycl Chem 25, 1 (1979)
- Dostal J, Potaček M, Nechvatal M Collect Czech Chem Commun 58, 395 (1993)
- Zhang G L, Rucker G, Breitmaier E, Nieger M, Mayer R, Steinbeck Ch Phytochemistry 40, 299 (1995)
- Dostal J, Marek R, Slavík J, Taborská E, Potaček M, Sklenar V Magn Reson Chem 36, 869 (1998)
- Rucker G, Breitmaier E, Zhang G L, Mayer R Phytochemistry 36, 519 (1994)
- Dostal J, Taborská E, Slavík J, Potaček M, de Hoffmann E J Nat Prod 58, 723 (1995)
- Dostal J, Slavík J, Potaček M, Marek R, Humpa O, Sklenar V, Tousek J, de Hoffmann E, Rozenberg R Collect Czech Chem Commun 63, 1045 (1998)
- Dostal J, Slavík J, Potaček M, Marek R, Sklenar V, de Hoffmann E, Rozenberg R, Tinant B, Declercq J P Phytochemistry 47, 879 (1998)
- Simeon S, Rios J L, Villar A Pharmazie 44, 593 (1989)
- Lenfeld J, Kroutil M, Maršálek E, Slavík J, Premlinger V, Šímanek V Planta Med 43, 161 (1981)
- Sanguinarin Research New Perspectives (Symposium Report) J Can Dent Assoc 56(7), 1990, Supplement
- Černa H, Vičar J, Eber M, Šímanek V LKS Cas Ces Stom Kom č 3, 24 (1994)
- Walterová D, Ulínchová J, Valka I, Vičar J, Vavřecková C, Taborská E, Harkrader R J, Meyer D L, Černa H, Šímanek V Acta Univ Palacki Olomuc, Fac Med 759, 7 (1995)
- Šímanek V, Černa H, Vičar J, Jezdinsky J, Valka I CZ 279327

47. Maškovskij M. D., v knize: *Lekarstvennyje sredstva*, sv. 2, str. 420. Medicína, Moskva 1988.
48. Ulrichová J., Walterová D., Vavrečková C., Kamarád V., Šimánek V.: *Phytother. Res.* 10, 220 (1996).
49. Vavrečková C., Ulrichová J.: *Chem. Listy* 88, 238 (1994).
50. Reshef A., Sperling O., Zorefshani E.: *Neurosci. Lett.* 238, 37 (1997).
51. Lasley R. D., Noble M. A., Mentzer R. M.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 3345 (1997).
52. Qiu Y. M., Ping P. P., Tang X. L., Manchikalapudi S., Rizvi A., Zhang J., Takano H., Wu W. J., Teschner S., Bolli R.: *J. Clin. Invest.* 101, 2182 (1998).
53. Barret Y., Sauvaire Y.: *Phytother. Res.* 6, 59 (1992).
54. Olugbade T. A., Waigh R. D.: *Pharm. Sci.* 2, 259 (1996).

J. Dostál and J. Slavík (*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno*): **Recent Knowledge on Sanguinarine and Related Alkaloids**

Sanguinarine is a red quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloid. The review covers basic information and recent facts on occurrence, isolation, chemical transformations, free base formation, and biological activities of sanguinarine and related alkaloids.

Rektor Vysoké školy chemicko-technologické v Praze

vyhlašuje přijímací řízení

pro školní rok 2000-2001 do následujících oborů doktorských studijních programů ve smyslu § 49 odst. 5 a § 98 odst. 1c) Zákona 111/1998 Sb., uskutečňovaných na fakultách VŠCHT Praha:

Fakulta chemické technologie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Anorganická chemie
Organická chemie
Makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie a chemická technologie

Studijní obor: Anorganická technologie
Organická technologie

Studijní program: Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: Technologie makromolekulárních látek
Fyzikální metalurgie a mezní stavy materiálů
Chemická metalurgie
Chemie a technologie anorganických materiálů
Materiálové inženýrství

Fakulta technologie ochrany prostředí

Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Studijní obor: Aplikovaná a krajinná ekologie

Studijní program: Chemie a technologie paliv a prostředí

Studijní obor: Energetika v chemicko-technologických procesech
Chemické a energetické zpracování paliv

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Organická chemie
Biochemie

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie

Studijní program: Biochemie a biotechnologie

Studijní obor: Biotechnologie

Studijní program: Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Chemie a analýza potravin
Technologie potravin

Fakulta chemicko-inženýrská

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie
Fyzikální chemie

Studijní program: Chemické a procesní inženýrství

Studijní obor: Chemické inženýrství
Měřicí technika
Technická kybernetika
Řízení a ekonomika podniku

Všechny doktorské studijní programy jsou uskutečňovány formou presenční, distanční nebo kombinací presenční a distanční formy.

Standardní doba studia u všech doktorských studijních programů je tři roky.

Žádosti doložené životopisem, doklady o dosaženém vzdělání a dosavadní praxi, soupisem publikovaných prací a ostatních výsledků odborné činnosti, podávejte nejpozději do 31.3.2000 na děkanáty příslušných fakult, Technická 5, 166 28 Praha 6.

ANTIFUNGÁLNE METABOLITY PRODUKOVANÉ MIKROMYCÉTAMI

KATARÍNA LEŠOVÁ a MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

Došlo dňa 16.II.1999

Kľúčové slová antifungálne metabolity, antibiotiká, mikromycéty

Obsah

1. Úvod
2. Glykozidové antibiotiká
3. Peptidy a netyrické aminokyseliny
4. Heterocyklické antibiotiká
5. Alicyklické antibiotiká
6. Aromatické antibiotiká
7. Alifatické antibiotiká
8. Záver

1. Úvod

Hľadanie a výskum nových antifungálnych terapeutík pokračuje rýchlym tempom vzhľadom na výrazné a rastúce potreby humánnej a veterinárnej medicíny. I keď systematické mykózy sú menej významné ako bakteriálne infekcie, počet fungálnych ochorení ohrozujúcich život v poslednom desaťročí ostro vzrástol vzhľadom na stúpajúci počet pacientov s oslabeným imunitným systémom. Fungálne infekcie sa stávajú čoraz viac bežnými v dôsledku rozšírenia AIDS, transplantácie orgánov a chemoterapie pacientov postihnutých rakovinovými ochoreniami¹. Stúpol počet infekcií spôsobených druhmi *Candida sp.*, *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus sp.* Tiež dimorfické huby ako *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* a *Sporothrix schenckii* spôsobujú ochorenia ohrozujúce život.

Modifikácia existujúcich, objavenie a syntéza nových antifungálnych zlúčenín v pokusoch o produkciu účinných látok na liečbu množstva ľudských mykóz viedla k podstatnému nárastu v počte patentových aplikácií v poslednom období. Zahŕňajú výber procesov a aplikácií pre prírodné aj semisyntetické deriváty². Ako uvádza Moehle³, predpokladá sa, že v nasledujúcich štyroch rokoch bude výskum a aplikácia antifungálnych látok najrýchlejšie sa rozvíjajúcim odvetvám farmaceutického priemyslu.

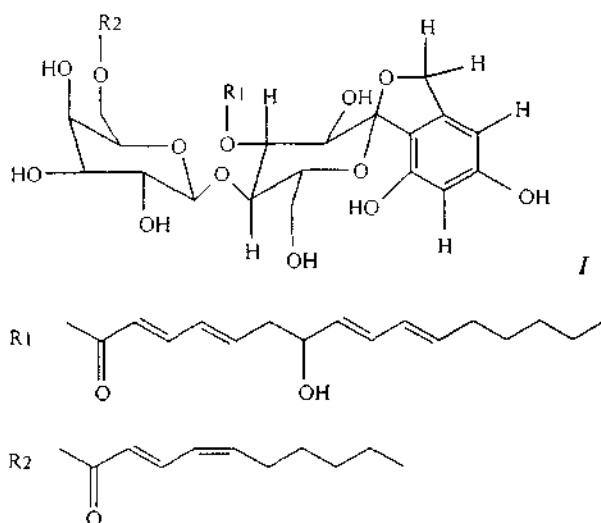
Mikroorganizmy sa osvedčili ako vynikajúci zdroj terapeuticky využiteľných látok pri rôznych humánnych a živočíšnych ochoreniach. Produkujú metabolity rozmanitých štruktúr a účinkov. Mnohé mikroorganizmy tvoria sekundárne metabolity v relatívne vysokom nadbytku, čo sa využíva na ich priemyselnú prípravu biotechnologickými postupmi

Práca tvorí prehľad fungicídov izolovaných z mikromycét od roku 1994. Metabolity sú usporiadané podľa Bérdyho systému chemickej klasifikácie antibiotík.

2. Glykozidové antibiotiká

Vyskytujú sa ako čisté sacharidy, alebo ako pseudodri-, resp. insachandy, u ktorých sa uplatňujú kombinácie streptomínu, deoxystreptomínu a ich derivátov prírodných aminohe- xóz. Modifikácie základnej štruktúry sacharidov majú za následok zmenu antibiotických účinkov.

BE-29602 (*I*) produkovaný kmeňom F29602, patriacim do rodu *Fusarium* je členom triedy papulakandínov. BE-29602 vykazuje inhibičnú aktivitu voči niekoľkým kvasin- kám ako *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans* (MIC 1,56 resp. 0,39 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Tiež čiastočne inhibuje rast *Staphylo- coccus aureus* a *Trichophyton mentagrophytes* v koncentrácii 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Účinok BE-29602, tak ako aj ostatných papu- lakandínov, je založený na inhibícii syntézy P-1,3-glukánu⁴.



Corynecandin, antifungálny glykolipid kultúry *Coryneum modonum* sa zaraďuje sa do triedy papulakandínov. Ma podobnú antifungálnu aktivitu ako ostatné metabolity tejto triedy. Jeho účinok je tiež založený na inhibícii syntézy bun- kovej steny. Obsahuje esterový reťazec v polohe C3, ktorý sa u iných glykolipidov nenachádza. Je to najmenší známy člen triedy papulakandínov s antifungálnou aktivitou, ktorý inhi- buje aktivitu glukánsyntázy⁵.

Furanocandin, antifungálne antibiotikum z triedy papulakandínov bolo izolované z kmeňa *Trichothecium sp.* Jeho MIC hodnoty pre *Candida albicans* (0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sú nižšie ako MIC hodnoty amfotericínu B (0,78 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (cit.⁶).

Fuskandín A a B sú antifungálne látky triedy papulakandínov produkované kmeňom *Fusarium sambuci- num*. Fuskandíny inhibujú rast *Candida albicans* prostrednic-

tvom inhibície *beta*-1,3-glukan syntazy Fuskandin A je omnoho aktívnejší ako fuskandin B (MIC 3,12 $\mu\text{g ml}^{-1}$), je však menej aktívny ako amphotericin B a papulakandin B. Nevykazuje významnú antibakteriálnu aktivitu⁷. Fuskandin A je na dvoch miestach esterifikovaný dlhým retazcom nenasýtených mastných kyselín, na rozdiel od fuskandinu B, ktorý obsahuje len jedno takéto miesto⁸.

3. Peptidy a netypické aminokyseliny

Antibiotiká tejto skupiny metabolitov sú produkované baktériami, aktinomycétami a hubami. Peptidové antibiotiká reprezentujú veľkú skupinu metabolitov produkovaných najmä streptomycétami. Sú všeobecne menšie ako proteíny a často sa v nich vyskytujú aminokyseliny, ktoré nenachádzame v proteínoch.

Aciculitín A-C sú tri príbuzné peptidy produkované hubou *Aciculites orientalis*. Sú tvorené bicyklickým peptidom, ktorý obsahuje nezvyčajný histidín tyrozinový mostík. Lišia sa len v dĺžke alkylého retazca dihydroxydienenovej kyseliny. *Aciculitíny* sú prvé glykopeptidolipidy získané z morského zdroja. Inhibujú rast *C. albicans* a pôsobia cytotoxicky na ľudske nádorové bunky HCT-116. Pre ich biologickú aktivitu je dôležitý histidínový zvyšok⁹.

AFP je antifungálny proteín zložený z 51 aminokyselinových zvyškov, produkovaný hubou *Aspergillus giganteus*. Pre jeho aktivitu je dôležitý tyrozinový zvyšok. Je účinný na vláknité huby, avšak nevykazuje žiadnu aktivitu na baktérie a kvasinky. Minimálne inhibičné koncentrácie sa pohybujú v rozmedzí 6 až 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit¹⁰).

Aureobazidíny sú skupinou antifungálnych antibiotík produkovaných čiernou kvasinkou *Aureobasidium pullulans*. Okrem hlavného produktu, aureobazidínu A, ju tvorí viac ako 20 štruktúrne príbuzných látok a ich štruktúra je charakterizovaná ako cyklický depsi-peptid, tvorený ôsmimi aminokyselinami, z ktorých sú tri, alebo štyri metylované a jedna je hydroxykyselina. Bolo objavených šesť nových kongenerov, označených ako AbT1-4, AbU1 a AbU2. Hodnoty MIC pre *C. albicans* sa pohybujú v rozmedzí 0,0125 až 0,39 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Metabolity sú tiež účinné voči *C. glabrata*, *C. kefyr*, *Cryptococcus neoformans* a *Saccharomyces cerevisiae*¹¹.

Bergofungín je produkovaný kultúrou *Emencellosis donezku* HKI 0059. Okrem neho kultúra produkuje aj malé množstvo jeho homologu, v lišiacich sa v zložení aminokyselín. Je to lineárny peptid obsahujúci 15 aminokyselín. Antimikrobiálna aktivita bola stanovená voči niektorým baktériam a hubám platňovou difúznou metódou (priemer inhibičnej zóny [mm]: *Bacillus subtilis* 18, *Sporobolomyces salmonicolor* 23, *Penicillium notatum* 13)¹².

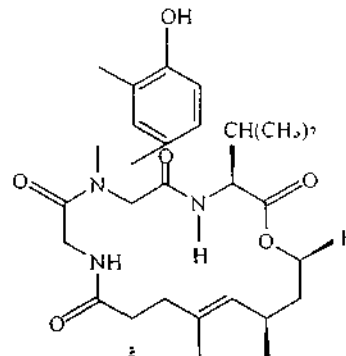
Gigantín je 17-kDa nbnukleáza produkovaná kultúrou *Aspergillus giganteus* IFO 5818. Je zložená z deviatich aminokyselín, podobne ako a sarcin, rbozom inaktivujúci proteín izolovaný z *A. giganteus* MDH 18894 (cit¹³).

Helioferín A a *B* sú aminolipopeptidové antibiotiká produkované kultúrou *Mycogone rosea* DSM 8822. Sú to mediatory prenosu heliantatových (metyloranz) anionov z vodnej do organickej fázy. Zmes helioferínov A a B 7:3 má silnú antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu. Inhibuje rast *Candida albicans* (MIC 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$), *Fusarium culmorum* (MIC 6,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$), *Penicillium notatum* (MIC 1,56 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a *Rho-*

dotorula rubra (MIC 0,78 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Antibakteriálne pôsobí hlavne na G⁺ baktérie a mykobaktérie. Podobne ako u leucinostatínov, je ich účinok založený na porušení bunkového prenosu iónov a energetického metabolizmu¹⁴.

Leucinostatín A je peptid produkovaný kultúrou *Acremonium sp.*, izolovanou ako endofytická huba *Taxus baccata*. Leucinostatín má antifungálne, tytotoxické a protinádorové vlastnosti. Metabolit vyvoláva rôzne nekrotické symptómy u nehostiteľských organizmov, avšak na *T. baccata* nepôsobí. To je spôsobené jeho glykozyláciou na leucinostatín A di-O-glukozid, ktorý má výrazne nižšiu bioaktivitu ako pôvodný metabolit. Z výsledkov vyplýva, že glykozylácia môže hrať významnú rolu v obrane rastlín, najmä pri ochoreniach spôsobených toxínmi¹⁵.

Neosiphoniamolida (II), cyklodepsi-peptid s antifungálnou aktivitou, bol izolovaný z morskej huby *Neosiphonia superstes*. Obsahuje 12 uhlikatu hydroxykyselinu, glycin, valín a halogenovaný tyrozinový zvyšok v 18-člennom kruhu. Je štruktúrne príbuzný s jaspamidom a geodiamolidmi. Inhibuje rast *Pyricularia oryzae* a *Helminthosporium gramineum*¹⁶.

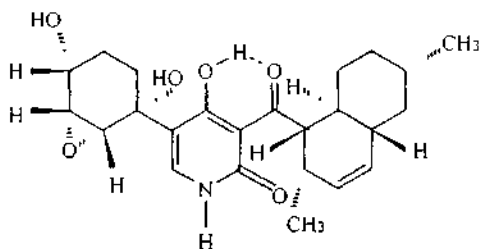


WF11899A, B a C sú antifungálne lipopeptidové antibiotiká izolované z kultivačného mediá *Coleophomaempetri* F-11899. Metabolity patria do skupiny echmokandmov. Zlúčeniny sú aktívne voči *Candida albicans* (IC₅₀ 0,0004-0,03 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Tiež mierne inhibujú rast *Aspergillus fumigatus* a *A. niger*. 1,3 *beta* glukansyntáza je inhibovaná týmito metabolitmi s IC₅₀ 0,7-18 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) (cit¹⁷).

4. Heterocyklické antibiotiká

Metabolity patriace k tejto skupine antibiotík tvoria pomerne heterogénne spektrum zlúčenín obsahujúcich dusík, alebo kyslík. Ide najmä o sekundárne metabolity hub a aktinomycét. Najznámejšie spomedzi nich sú nukleozidové antibiotiká.

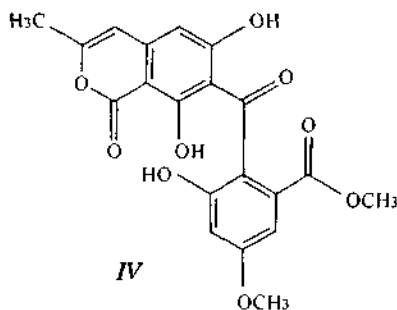
Apiosporamid (III) je antifungálny metabolit koprofilnej huby *Apiozpora montagnei* izolovaný spolu so známym dihydroxykumarinom *cis* (3*R*, 4*R*)-4-hydroxymelleinom. Má antifungálnu aktivitu voči koprofilnej hube *Asco-bolus furfuraceus*, vykazujúc 58 % inhibíciu rastu v množstve 200 $\mu\text{g/disk}$. Tvorí tiež inhibičné zóny pri *Bacillus subtilis* (32 mm) a *Staphylococcus aureus* (21 mm) v koncentrácii 200 $\mu\text{g/disk}$. Apiosporamid sa podobá na tenellín, metabolit patogénnej huby *Beauveria tenella*¹⁸.



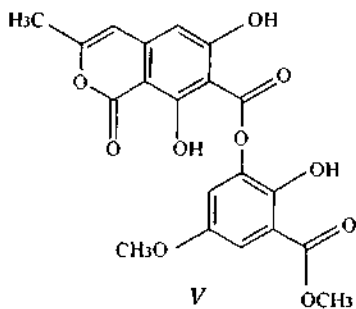
III

Benesudon - prvý sekundárny metabolit izolovaný z kultúry *Mollisia benesuada* má antibakteriálnu, antifungálnu, cytotoxickú a fytotoxickú aktivitu. Citlivé sú ako G⁺, tak i G⁻ baktérie (MIC v rozsahu 2,5-10 µg ml⁻¹). Najvyššia antifungálna aktivita bola zistená proti *Peecilomyces variotii* (MIC 1 µg ml⁻¹). Metabolit pôsobí inhibične aj na rast *Mucor miehei*, *Penicillium notatum*, *Rhodotorula glutinis* a *Nematospora coryli* (MIC 2,5-10 µg ml⁻¹). Štruktúra obsahuje reaktívnu α-metylenketónovú štruktúru, ktorá je pravdepodobne zodpovedná za jeho biologickú aktivitu¹⁹.

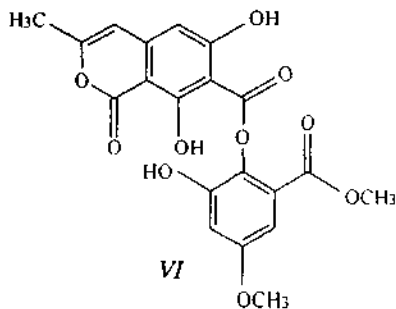
Cercophorin A-C (IV, V, VI) - tri izokumarínové deriváty s antifungálnou a cytotoxickou aktivitou boli izolované z koprofilnej huby *Cercophora areolata* UAMH 7495,



IV



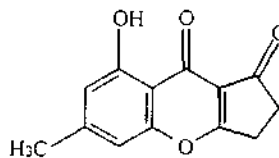
V



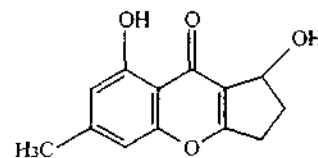
VI

tvoriacej kolónie na dikobrazom hnoji. Z tohto kmeňa boli izolované aj ďalšie dva nové izokumaríny, dekarboxycitrinon a 4-acetyl-8-hydroxy-6-metoxi-5-metylizokumarín, a známy mykotoxín roridin E. Cercophoríny A-C inhibujú rast *Sordaria fumicola* a *Ascoibolus furfuraceus* v koncentráciách 200 µg/disk (cit²⁰).

Coniochaeton A a B (VII, VIII) sú dva cyklopentabenzopyrán-4-óny boli izolované z koprofilnej huby *Coniochaeta saccardoii* JS 223. Sú to prvé prírodné zlúčeniny s touto štruktúrou a tiež prvé sekundárne metabolity z kmeňov rodu *Coniochaeta*. Coniochaeton A tvorí 27 mm inhibičnú zónu rastu *Candida albicans* v koncentracii 200 µg/disk (coniochaeton B 13 mm). Tiež 100 % redukuje rast koprofilných húb *Sordaria fumicola* a *Ascoibolus furfuraceus* v koncentracii 200 µg/disk (cit²¹).

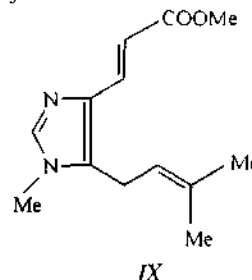


VII



VIII

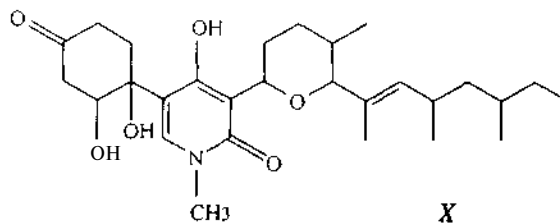
Fungerin (IX) je nový antifungálny alkaloid produkovaný kmeňom *Fusarium sp.*, ktorý bol získaný z pňa *Miscanthus sacchariflorus*. Fungerin vykazuje antifungálnu, ale nie antibakteriálnu aktivitu. MIC hodnoty pre *Penicillium chrysogenum*, *Colletotrichum langenarium*, *Alternaria mali* a *Pynularia oryzae* sú 12, 5, 25, 50, respektíve 50 µg ml⁻¹. Na základe meraní bolo zistené, že ide o nový alkaloid 3-[1-metyl-5-(3-metyl-2-butenyl)-1H-imidazol-4-yl]2-metylexerky-seliny propánovej²².



IX

GR135402 - metabolit kultúry *Graphium putrendis*, ktorý inhibuje proteosyntézu u *Candida albicans* (IC₅₀ 0,028 µg ml⁻¹). Spektrum aktivity zahŕňa okrem *Candida albicans* (MIC 0,008-0,03 µg ml⁻¹) aj *Cryptococcus neoformans* (MIC 1 µg ml⁻¹), avšak žiadne iné druhy rodu *Candida* ani *Aspergillus*²³.

Oxysporidinon (X), nový 3,5-disubstituovaný N-metyl-4-hydroxy-2-pyrdón bol izolovaný z kultivačného média *Fusarium oxysporum*. Štruktúrne je príbuzný s antifungálnym metabolitom funikulozínom, produkovaným kultúrou



X

Penicillium funiculosum patria do skupiny fungálnych sekundárných metabolitov, obsahujúcich 4-hydroxy-2-pyridónový chromofór. Do tejto skupiny patria tennelin a bassianin z *Beauveria tenella* a *B. bassiana*, ilicicolin H z *Cylindrocladum ilicicola*, harzianopyridon z *Trichoderma harzianum*, leponn A z *Aspergillus leporis*, fischerin z *Neosartorya fischeria* a apiosporamid z *Apiozpora montagnei*. Oxysporidinon inhibuje rast fytopatogénnych húb *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* a *Venturia inaequalis* (MIC 10, 1, 50 resp. 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). V koncentrácii 1 mg. ml^{-1} bol neúčinný proti kvasinám a baktériam.²⁴

Pre-nisatin - metabolit izolovaný zo submerznej kultivácie kultúry *Chaetomium globosum*. Štruktúra bola určená ako 5-(3-metyl-2-butenyl)-indol-2,3-dión. Prenisatin *in vitro* podmienkach inhibuje rast *Botrytis cinerea*.²⁵

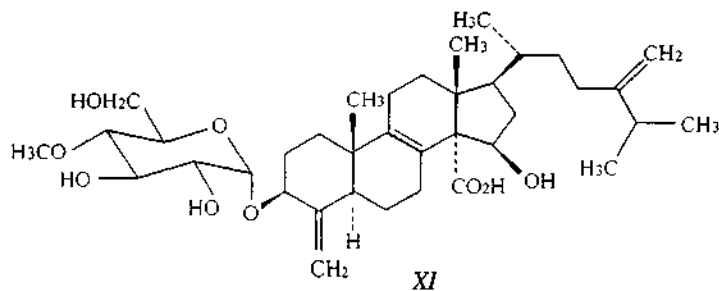
Pterulon je spolu s kyselinou pterulonovou produkovaný kultúrou *Pterula sp.* 82168. Obidve zlúčeniny majú výraznú antifungálnu a slabú, resp. žiadnu cytotoxickú aktivitu. Kyselina pterulonová je asi 10 krát aktívnejšia ako pterulon. Jej hodnoty MIC sa pohybujú v rozmedzí 25-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pre *Fusarium oxysporum*, *Mucor miehei*, *Peecilomyces variotii*, *Penicillium notatum*, *Rhodotorula glutinis* a *Nadsonia fulvescens*. Ich účinok je založený na inhibícii NADH ubiquinon oxidoreduktázy.²⁶

Squalenol a **squalenol** sú tri štrukturalne príbuzné selektívne inhibítory squalénsyntázy produkované kultúrou *Phoma sp.* C2932. Metabolity inhibujú ako fungálnu, tak aj cicavčiu squalénsyntázu. Majú široké spektrum antifungálnej aktivity.²⁷ Ide o 4,6,7-trihydroxy-2,8-dioxybicyklo-oktan-3,4,5-trikarboxylové kyseliny.²⁸ Štúdie ukazujú, že základ molekuly je vytvorený z dvoch polyketidových reťazcov, zložených z acetátových jednotiek.²⁹

5. Alicyklické antibiotiká

Najznámejšou skupinou cykloalkanových derivátov sú glutarimidové antibiotiká. Charakteristickou črtou týchto metabolitov je glutarimidový kruh. Sú produkované hlavne streptomycetami. Ich mechanizmus účinku je zvyčajne založený na inhibícii proteosyntézy.

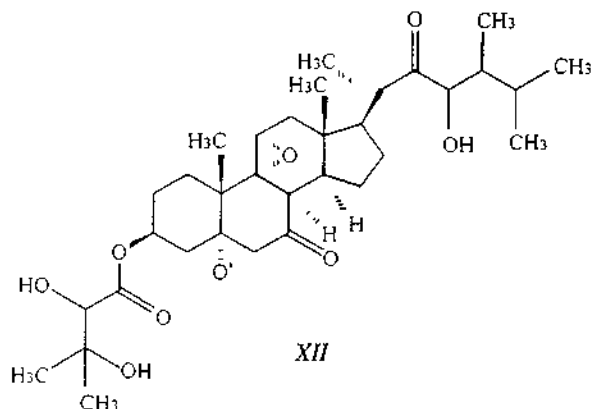
Ascosteroid (XI) - nová antifungálna zlúčenina izolovaná z kultivačného média *Ascomcha amphitricha*. Inhibuje rast kvasiniek a vlákňitých húb (*Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Trichophyton mentagrophytes* MIC 14-21 $\mu\text{g ml}^{-1}$), avšak nemá vplyv na rast baktérií. Na cicavčie bunky nepôsobí cytotoxicky do koncentrácie 150 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.³⁰). Štúdie štruktúry ukázali, že ide o glykozylovaný C_{30} tetracyklický triterpén s lanostano-



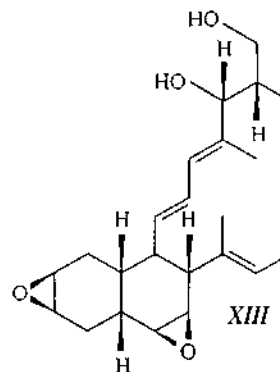
vým jadrom. Metylester ascosteroidu mal omnoho nižšiu antifungálnu aktivitu oproti pôvodnému metabolitu, z čoho možno usudzovať, že pre antibiotickú aktivitu je dôležitá karboxylová skupina.³¹

Australifungin - metabolit s antifungálnou aktivitou bol izolovaný z kultivačného média kultúry *Sporomium australe* spolu s príbuzným derivátom s nižšou aktivitou. Štruktúra obsahuje nezvyčajnú kombináciu α -diketónovej a β -ketoaldehydickej funkčnej skupiny. Latka má široké spektrum antifungálnej aktivity. Pôsobí proti viacerým patogénnym hubám ako *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus spp.* (MIC 0,015-1 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Predpokladaný spôsob účinku je interferencia s fungálnym metabolizmom lipidov, konkrétne inhibícia premeny sfinganínu na ceramid v syntéze sfingolipidu.³²

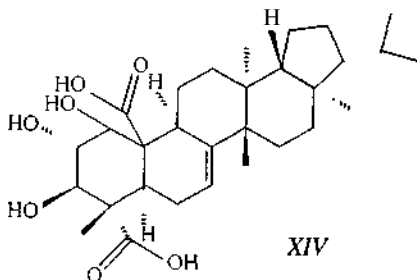
Favolon (XII) je nový antifungálny triterpenoid izolovaný z etiópskej huby *Favolaschia sp.* Táto je tiež producentom už skoršie izolovaných metabolitov s antifungálnou aktivitou, a to oudemansmu, strobilurinu A a B a ich derivátov. Favolon bol detegovaný len v myceliu. Vykazuje inhibičnú aktivitu voči askomycétam, bazidiomycétam, oomycétam a zygomycétam, avšak nebola detegovaná žiadna antibakteriálna ani cytotoxická aktivita.³³



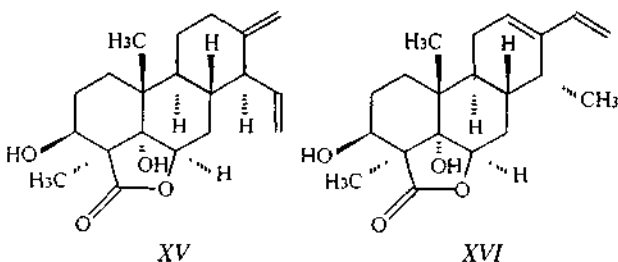
Fusarielin A (XIII) spolu s tromi príbuznými zlúčeninami fusarielinom B, C a D bol získaný z kmeňa *Fusarium sp.* Biogeneticky je to pentametylovaný dekaketid. Vykazuje antifungálnu aktivitu voči *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria kikuchiana*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium nivale* a *Penicillium oryzae* s MIC hodnotami v rozmedzí 3,1 až 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Účinok týchto látok je založený na interferencii s funkciou mikrotubulov.³⁴



Polytolypin (XIV) - pentacyklický triterpenoid vykazujúci antifungálnu a antibiotickú aktivitu bol izolovaný z kultúry *Polytolypa hystricus*, huby rastúcej na dikobrazom truse. Metaboht vykazuje antifungálnu aktivitu voči koprofilnej hube *Ascobolus furfuraceus*. Je tiež aktívny voči *Candida albicans*. Štruktúra je veľmi podobná kyselíne retigerovej, metabolitu izolovanému z *Lobariaretergera*³⁵.



Sonomolid A a B (XV, XVI) - nové širokospektrálne antifungálne metabolity neidentifikovanej koprofilnej huby. Obe zlúčeniny sú aktívne proti viacerým fungálnym patogénom ako *Candida albicans* (MIC 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$), *Cryptococcus neoformans* (MIC 0,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a *Aspergillus fumigatus* (MIC 8 resp 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Ani jeden z metabolitov nemá antibakteriálnu aktivitu. Sonomolidy sú prvé známe diterpény s antifungálnou aktivitou³⁶.

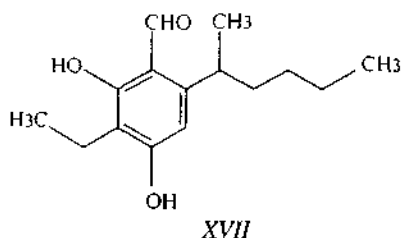


6. Aromatické antibiotiká

Aromatické sekundárne metabolity tvoria skupinu látok s veľmi pestrú štruktúrou. Patria sem monocyklické deriváty benzénu, alebo kondenzované aromatické zlúčeniny s postrannými reťazcami, prevažne alifatickými.

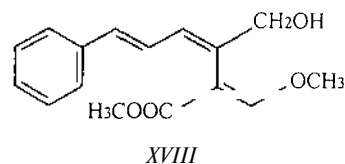
Anguillosporal (XVII), antifungálny a antibakteriálny metabolit bol izolovaný zo sladkovodnej huby *Anguillospora longissima*. Je to 2,4-dihydroxy-3-etyl-6-(1-metylpen-tyl)-benzaldehyd polyketidového pôvodu. Hodnoty MIC sú 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pre *S. aureus* a 58 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pre *C. albicans*?

Antafumicín A a B - dva antimikrobiálne meta-



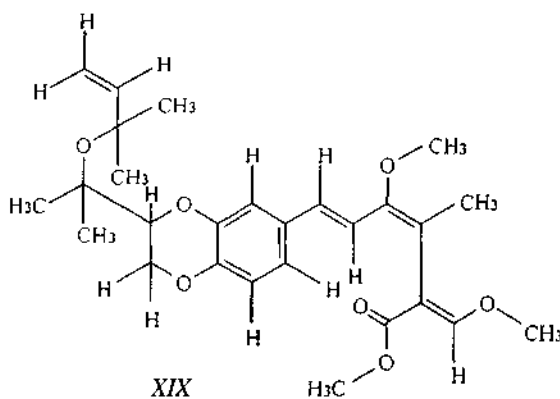
bohty kultúry *Aspergillus niger*, *trans*- resp *cis*-4-(3-acetyl-2,6-dihydroxyfenyl)-2-metoxi-4-butanolid. Zmes antafumicínov A a B v pomere 1:1 pridaná do kultivačného média v koncentrácii 100 ppm úplne inhibuje germináciu spór *Colletotrichum lagenarium*, *Pyricularia oryzae*, *Fusarium oxysporum* a *Botrytis cinerea*. V koncentrácii 50 p.p.m. zmes inhibuje na 50 % tiež rast *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Aeromonas liquefaciens*³⁸.

Hydroxystrobilurin A (XVIII), antifungálny E- β -metoxyakrylát bol izolovaný z kultúry *Pterula sp.* Ten istý kmeň produkuje aj strobilurin A a oudemansin A. V porovnaní so strobilurinom A vykazuje hydroxystrobilurin A nižšiu antifungálnu aktivitu. Hydroxystrobilurin A inhibuje väčšinu vlaknitých húb a kvasiniek v množstve 1 až 10 $\mu\text{g/disk}$. Nekompetentné inhibičné zóny boli pozorované pri *Saccharomyces cerevisiae* iných hubách. Zatiaľ čo povrchovo aeróbný rast bol kompletne inhibovaný, slabší anaeróbný rast bol stále možný. Hydroxystrobilurin A nevykazuje žiadnu antibakteriálnu aktivitu³⁹.

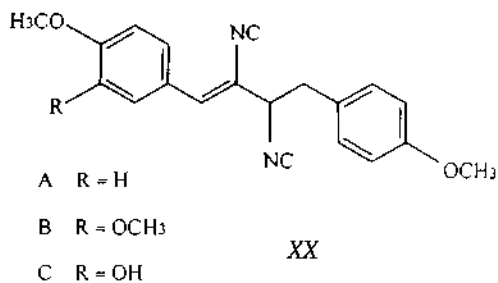


Kladosporín biseoxid je nový metabolit kultúry, charakterizovanej na základe tvorby piknidí ako coelomycéta. Vykazuje selektívnu antibiotickú aktivitu proti viacerým baktériám (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas aeruginosa*), hubám (*Mucor mellei*, *Penicillium oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*) a inhibuje germináciu *Lepidium sativum* vo veľmi nízkych koncentráciách⁴⁰.

9-Metoxystrobilurin L (XIX), nový derivát metoxystrobilurínu bol izolovaný spolu s ďalším derivátom 9-metoxystrobilurínu E a derivátom oudemansmu z kultivačného média huby *Favolaschia pustulosa* X27732. Pôsobí cytotoxicky na ľudské B lymfoblastoidy (IC₅₀ 1,8 nmol.l⁻¹). Má tiež antibakteriálnu (*Bacillus subtilis* MIC 0,9 $\mu\text{mol l}^{-1}$) a antifungálnu aktivitu (*Candida albicans* MIC 6 $\mu\text{mol.l}^{-1}$)⁴¹.



NK372135A, B, A, C (XX) nové antifungálne metabolity produkované kmeňom *Neosartorya fischeri* var *glabrata*. Pre vysokú aktivitu voči rodu *Candida* je nutná hydrogénovaná štruktúra na väzbe C2-C3. Metabohty

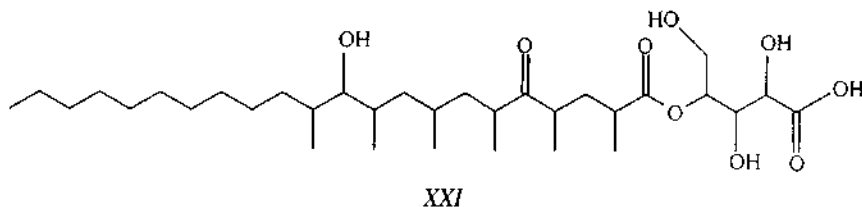


NK372135B a C majú pre *C. albicans* nižšie hodnoty IC₅₀ ako nystatin. Sú tiež účinné voči niektorým hubám, ako *Cryptococcus neoformans*⁴².

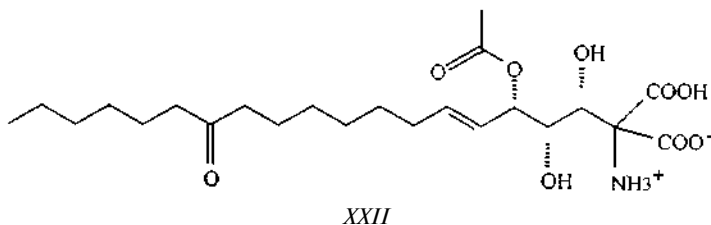
7. Alifatické antibiotiká

Medzi alifatické antibiotiká sa zaraďujú polyíny, ktoré tvoria ucelenú skupinu derivátov alkánov. Zaraďujeme sem tiež deriváty alifatických karboxylových kyselín a niektoré antibiotiká izolované z vyšších rastlín.

Khafrefungin (XXI) je nový inhibítor syntézy sfingolipidu izolovaný z neidentifikovanej endofytickej huby. Metabolit inhibuje rast mnohých kvasiniek a vláknitých húb (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* a *Saccharomyces cerevisiae* MIC 2,2 a 15,6 μg ml⁻¹). Rast *Aspergillus fumigatus* nebol ovplyvnený do koncentrácie 250 μg ml⁻¹. Khafrefungin inhibuje špecificky inkorporáciu inozitolu do sfingolipidov u húb a kvasiniek a neovplyvňuje biosyntézu sfingolipidov cicavčím bunkami. V *in vitro* podmienkach inhibuje inozitolfosfoceramid syntézu s IC₅₀ 0,6 nmol.l⁻¹ (cit.⁴³).



Malonofungin (XXII) je antifungálny metabolit kultúry *Phaeoramularia fusimaculans* CBS 616.87. Na základe štruktúry sa zaraďuje do skupiny prírodných sa vyskytujúcich aminomalónových kyselín. Inhibuje rast *Botrytis cinerea* a iných fytopatogénov patriacich do rodov *Botrytis*, *Pyricularia*, *Fusarium* a *Penicillium*⁴⁴.



Viridofunginy sú skupinou aminoacyl-alkyl citrátových zlúčenín produkovaných kultúrou *Trichoderma viride*. Metabolity majú široké spektrum antifungálnej aktivity (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis*, *C. albicans* a *C. parapsilosis* MIC 2–32 μg ml⁻¹),

avšak nízku antibakteriálnu aktivitu⁴⁵. Sú účinnými inhibítormi squalénsyntetázy, avšak ich antifungálny účinok nie je založený na inhibícii syntézy ergosterolu⁴⁶.

8. Záver

Značný nárast počtu pacientov s ochorením AIDS a inými formami oslabenia imunitného systému viedol v mnohých oblastiach k rozšíreniu húb ako predovšetkým patogénov.

S rozšírením používania antifungálnych látok na potlačenie týchto infekcií, objavil sa i fenomén rezistencie patogénnych kmeňov na dané antibiotiká. A tak i keď k liečbe fungálnych ochorení je k dispozícii množstvo látok, neustále narastá počet infekcií a kmeňov rezistentných na používané liečivá. Stále neexistuje látka, ktorá by vyhovovala potrebám širokého spektra účinku a bola súčasne bezpečná a efektívna pri orálnom, resp. parenterálnom užití. Z týchto dôvodov je výskum a hľadanie nových antifungálnych látok stále sa prudko rozvíjajúcou oblasťou. Pozornosť sa sústreďuje na prírodné látky, ktoré môžu byť následne modifikované chemickou cestou a tým zvýšená ich účinnosť a stabilita. Okrem mikrobiálnych metabolitov, tiež prírodné produkty s antifungálnymi vlastnosťami izolované z iných zdrojov, ako sú napr. rastliny a morské organizmy, sa môžu stať významnými v boji s fungálnymi ochoreniami.

LITERATÚRA

1. Balkovec J. M.: Exp. Opin. Invest. Drugs 3, 65 (1994)
2. Hector R. F.: Exp. Opin. Ther. Patents 5, 157 (1995).
3. Moehle Ch. M.: Exp. Opin. Ther. Patents 6, 129 (1996)
4. Okada H., Nagashima M., Suzuki H., Nakajima S., Kijiri K., Suda H.: J. Antibiot. 49, 103 (1996).
5. Guanawardana G., Rasmussen R. R., Scherr M., Frost D., Brandt K. D., Choi W., Jackson M., Karwowski J. P., Sunga G., Malmberg L.-H., West P., Chen R. H., Kadam S., Clement J. J., Mcalpine J. B.: J. Antibiot. 50, 884 (1997).
6. Magome E., Hanmaya K., Gomi S., Koyama M., Chiba N., Ota K., Mikawa T.: J. Antibiot. 49, 599 (1996)
7. Jackson M., Frost D. J., Karwowski J. P., Humphrey P.

- E , Dahod S K , Choi W S , Brandt K , Malmberg L H , Rasmussen R R , Scherr M H J *Antibiot* 48, 608 (1995)
- 8 Hochlowski J E , Whittern D N , Buko A Alder L , Mcalpine J B J *Antibiot* 48, 614 (1995)
 - 9 Bewley C A , He H , Williams D H , Faulkner D J J *Am Chem Soc* 118, 4314 (1996)
 - 10 Lacadena J , Martínez Del Pozo A , Gasset M , Patino B , Campos-Olivas R , Vazquez C , Martínez-Ruiz A , Mancheno J M , Onaderra M , Gavilanes J G *Arch Biochem Biophys* 324, 273 (1995)
 - 11 Awazu N , Ika K , Yamamoto J , Nishimura K , Mizutani S , Takesako K , Kato I J *Antibiot* 48, 525 (1995)
 - 12 Berg A , Rityau M , Ihn W , Schlegel B , Fleck W F , Heinze S , Grafe U J *Antibiot* 49, 817 (1996)
 - 13 Wirth J , Martínez Del Pozo A , Mancheno J M , Martínez-Ruiz A , Lacadena J , Onaderra M , Gavilanes J G *Arch Biochem Biophys* 343, 188 (1997)
 - 14 Grafe U , Ihn W , Ritzau M , Schade W , Stengel C , Schlegel B , Fleck W F , Kunkel W , Haitl A , Gutsche W J *Antibiot* 49, 126 (1995)
 - 15 Strobel G A , Hess W M *Chem Biol* 4, 529 (1997)
 - 16 D'Auria M V , Paloma L G , Minale L , Zampella A J *Nat Prod* 58, 121 (1995)
 - 17 Iwamoto T , Ujie A , Nitta K , Hashimoto S , Okuhara M , Kohsaka M J *Antibiot* 47, 1092 (1994)
 - 18 Alfatafta A A , Gloer J B , Scott J A , Malloch D J *Nat Prod* 57, 1696 (1994)
 - 19 Thines E , Arendholz W R , Anke H , Sterner O J *Antibiot* 50, 13 (1997)
 - 20 Whyte A C , Gloer J B , Scott J A , Malloch D J *Nat Prod* 59, 765 (1996)
 - 21 Wang H J , Gloer J B , Scott J A , Malloch D *Tetrahedron Lett* 36, 5847 (1995)
 - 22 Kato Y , Koshino H , Uzawa J , Anzai K *Biosci Biotech Biochem* 60, 2081 (1996)
 - 23 Kinsman O S , Chalk P A , Jackson H C , Middleton R F , Shuttleworth A , Rudd B A , Jones C A , Noble H M , Wildman H G , Dawson M J , Styll C , Sidebottom P J , Lamont B , Lynn S , Hayes M V J *Antibiot* 57, 41 (1998)
 - 24 Breinhold J , Ludvigsen S , Rassing B R , Rosendahl C N , Nielsen S E , Olsen C E J *Nat Prod* 60, 33 (1997)
 - 25 Breinhold J , Demuth H , Herde M , Jensen G W , Moller I L , Nielsen R I , Olsen C E , Rosendahl C N *Acta Chem Scand* 50, 443 (1996)
 - 26 Engler M , Anke T , Sterner O , Brandt U J *Antibiot* 50, 325 (1997)
 - 27 Dawson M J , Farthing J E , Marshal P S , Middleton R F , O'Neill M J , Shuttleworth A , Styll C , Tait R M , Taylor P M , Wildman H G J *Antibiot* 45, 639 (1992)
 - 28 Sidebottom P J , Highcock R M , Lane S J , Procopiou P A , Watson N S J *Antibiot* 45, 648 (1992)
 - 29 Jones C A , Sidebottom P J , Cannel R J P , Noble D , Rudd B A M J *Antibiot* 45, 1492 (1992)
 - 30 Gorman J A , Chang L P , Clark J , Gustavson D R , Lam K S , Mamber S W , Pirnik D , Ricca C , Fernandes P B , O'Sullivan J J *Antibiot* 49, 547 (1996)
 - 31 Leet J E , Huang S , Klohr S E , Mcbrien K D J *Antibiot* 49, 553 (1996)
 - 32 Mandala S M , Thornton R A , Frommer B R , Curotto J E , Rozdilsky W , Kurtz M B , Giacobbe R A , Bills G F , Cabello M A , Martin I J *Antibiot* 48, 349 (1995)
 - 33 Anke T , Werle A , Zapf S J *Antibiot* 48, 725 (1995)
 - 34 Kobayashi H , Sunaga R , Funhata K , Morisaki N , Iwasaki S J *Antibiot* 48, 42 (1995)
 - 35 Gamble W R , Gloer J B , Scott J A , Malloch D J *Nat Prod* 58, 1983 (1995)
 - 36 Morns S A , Curroto J E , Zink D L , Dreinkorn S , Jenkins R , Bills G F , Thompson J R , Vicente F , Basilio A , Liesch J M , Schwrtz R E *Tetrahedron Lett* 36, 9101 (1995)
 - 37 Harngan G G , Armentrout B L , Gloer J B , Shearer C A J *Nat Prod* 58, 1467 (1995)
 - 38 Fujimoto Y , Miygawa H , Tsurushima T , Irie H , Okamura K , Ueno T *Biosci Biotechnol Biochem* 57, 1222 (1993)
 - 39 Engler M , Anke T J *Antibiot* 48, 884 (1995)
 - 40 Petersen F , Moerker T , Vanzanella F , Peter H H J *Antibiot* 47, 1098 (1994)
 - 41 Wood K A , Kau D A , Wngley S K , Beneyto R , Renno D V , Ainsworth A M , Penn J , Hill D , Killacky J , Depledge P J *Nat Prod* 59, 646 (1996)
 - 42 Monno T , Nishimoto M , Itou N , Nishikiori T J *Antibiot* 47, 1546 (1994)
 - 43 Mandala S M , Thornton R A , Rosenbach M , Milligan J , Garcia-Calvo M , Bull H G , Kurtz M B J *Biol Chem* 272, 32709 (1997)
 - 44 Berova N , Breinholt J , Jensen G W , Kjaer A , Lo L Ch , Nakanishi K , Nielsen R I , Olsen C E , Pedersen Ch , Stidsen C E *Acta Chem Scand* 48, 240 (1994)
 - 45 Onishi J C , Milligan J A , Basilio A , Bergstrom J , Curroto J , Huang L , Meinz M , Nallin-Omstead M , Pelaez F , Rew, D , Salvatore M , Thompson J , Vicente F , Kurtz M B J *Antibiot* 50, 334 (1997)
 - 46 Mandala S M , Thornton R A , Frommer B R , Dreikon S , Kurtz M B J *Antibiot* 50, 339 (1997)

K. Lešová and M. Šturdíková (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*) **Antifungal Metabolites Produced by Micromycetes**

The number of new antifungal compounds is steadily growing due to the increase in the number of diseases associated with the impairment of the immunity system and the resulting spreading of fungi as predominant pathogens. The paper surveys fungicides isolated from micromycetes since 1994. The metabolites are arranged according to the Berdy system of chemical classification of antibiotics. The metabolites described are representatives of glycoside antibiotics, peptides and non-typical amino acids as well as heterocyclic, alicyclic, aromatic and aliphatic antibiotics. The classes of peptides, non-typical amino acids and heterocyclic antibiotics are most frequent. The substances in classes are briefly characterized from the viewpoint of their structure, antifungal properties and production microorganisms. Total 38 micromycetes metabolites with fungicide properties are described. Search and research of new antifungal therapeutics rapidly continues satisfying the pronounced and growing needs of human and veterinary medicine. The paper provides a brief survey of these substances with their basic characteristics.

MOLEKULOVÉ MODELOVÁNÍ A TEORETICKÁ CHEMIE NA PC

PAVEL JANDERKA

*Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail janderka@chemi.muni.cz*

Došlo dne 21 VI 1999

 Klíčová slova: molekulové modelování, chemický software

Teoretické studium chemických problémů bylo po dlouhou dobu výsadou několika málo špičkových světových pracovišť - těch, kde bylo k dispozici potřebné počítačové a programové vybavení. Proces zpřístupňování metod počítačové chemie širší chemické veřejnosti byl a je ovlivňován řadou tendencí a vlivů, někdy působících zdanlivě protichůdně. Především jde o rozvoj výpočetní techniky po stránce hardware (včetně periférií) i operačních systémů, které z hlediska průměrného individuálního uživatele staví na jeho pracovní stůl výpočetní vykony a vlastnosti, které by uživatele sálového počítače z poloviny osmdesátých let přivedly v němý úžas a navíc za peníze, které jsou „neinvestičního charakteru“. Pravda, náročnější uživatel musí i dnes sáhnout poněkud hlouběji do kapsy chce-li mít na svém stole „něco lepšího“ nebo použít (a tak tomu bude patrně i v budoucnu) služeb výpočetní techniky a profesionálů v superpočítačových výpočetních centrech. A to teoretikové nespí a vymýšlejí nové teoretické modely umožňující získávání přesnějších a správnějších předpovědí a teoretické výpočty dalších molekulových indexů stále větších a složitějších molekul.

Za půl století (cca od roku 1950) od výpočtů malých konjugovaných molekul, počítačová chemie dospěla po modelování a vizualizaci biomakromolekul či výpočty vlastností molekul v roztoku. Pro potenciálního zájemce - a těch je mnoho - však situace není zcela přehledná a navíc je třeba počítat s další akcelerací vývoje ve všech oblastech - teorie, modely, software i hardware. Každé rozhodnutí má tak jako tak časově omezenou platnost. Nicméně počty vědeckých prací vyjádřené formou počtu publikací stále narůstají. Primární rozhodnutí vyplývající z povahy studovaného problému je třeba důkladně rozvážit, neboť z něj především vyplývá další volba prostředků. Současné teoretické přístupy mohou být rozděleny do dvou velkých skupin (viz obrázek 1) založených na dvou principiálně odlišných teoretických modelech

- model molekulové mechanický (MM),
- model kvantové mechanický (QM)

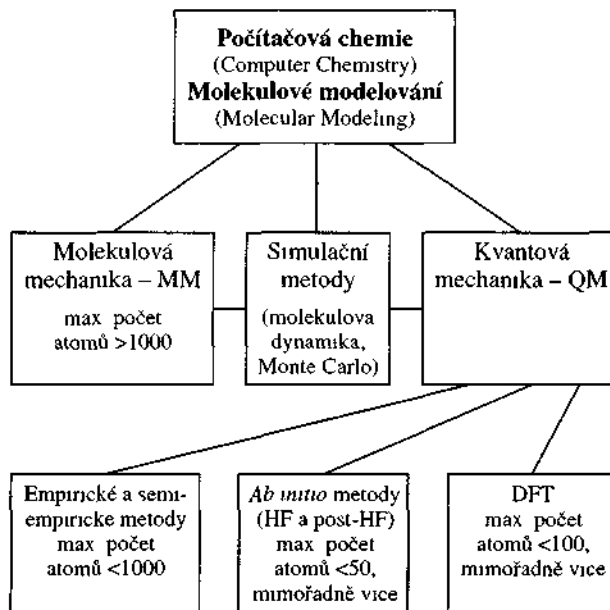
Třetí oblast počítačově podporovaného molekulového modelování, simulační metody, mohou v principu využívat obou modelů - MM i QM. Tyto metody nebudou dále podrobněji diskutovány.

Metody molekulové mechaniky (MM), viz např.² tento model ke konstrukci hyperplochy potenciální energie a fyzikálních vlastností, popisuje molekulu pomocí silových polí (force field - FF) užívajících rovnic klasické mechaniky. V rámci

tohoto modelu je molekula chápána jako soubor bodových nabožů (atomů v různých vazebných stavech), resp. vazeb mezi nimi. Na rozdíl od kvantově mechanického modelu nejsou tedy elektrony uvažovány explicitně. Každý typ atomu v každém vazebném stavu, každá vazba, musí být popsána charakteristickými empirickými konstantami, pro každý typ silového působení (např. valenční vibrace, deformace valenčního úhlu, deformace dihedrálního úhlu atd.) vazebného i uvažovaného ne vazebného typu (např. Van der Waalovy interakce, elektrostatické působení). Například jedna komponenta molekulově mechanického silového pole je energie pocházející ze stlačování a napínání chemické vazby. Tato komponenta byva často popsána jako harmonický oscilátor a může být vypočtena pomocí Hookova zákona, $V = 1/2 K_r (r - r_0)^2$, kde V je potenciální energie harmonického oscilátoru tvořeného oběma hmotami (atomy) spojenými pružinou (vazbou) K_r je silová konstanta pružiny (vazby), r a r_0 jsou vzdalenost a rovnovážná vzdalenost obou hmot (atomů). K_r a r_0 jsou specifické konstanty - FF parametry určité vazby. Suma energetických příspěvků všech typů vzájemného silového působení přes všechny atomy a všechny vazby, vazebného i ne vazebného typu, tvoří celkovou energii molekuly v rámci tohoto modelu.

Předností tohoto popisu je především rychlost a účinnost, především při výpočtech velkých molekul. Tato skutečnost přímo předurčuje použití MM metod do oblastí studia struktury a vlastností biomakromolekul, zejména v kombinaci s metodou molekulové dynamiky (MD). Průkopnické práce použití MM metod na organické molekuly pocházejí z pracovní skupiny Allingerovy (MM2, MM3, Univ. of Georgia)³.

Metody kvantové mechanické (QM). QM metody jsou založeny na kvantově mechanickém (vlnově mechanickém)



Obr. 1 Rozdělení metod počítačové chemie

Tabulka I
Některé nekomerční programy pro teoretickou chemii

Název	URL	Distribuce	Charakteristika
Aimpak	http://www.chemistry.mcmaster.ca/faculty/bader/aim		Baderova teorie „Atomy v molekule“ ¹¹
DeFT	http://www.chemistry.mcmaster.ca/aimpac/ ftp://ftp.CCL.net/pub/chemistry/software/SOURCES/FORTRAN/DeFT/	zdrojový kód, download zdrojový kód	teorie hustotního funkcionálu
MOPAC	ftp://ftp.ccl.osc.edu/pub/chemistry/software/MS-DOS/mopac-for-dos/ ftp://ftp.CCL.net/pub/chemistry/software/MS-WIN95-NT/mopac6/	verze 6, 7 pro MS DOS verze 6 pro MS Win9x/NT	pokročilé semiempirické metody
PC Gamess	http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html	verze 5 0 pro Win 9x/NT	<i>ab initio</i>
Gamess-UK	http://www.msg.ameslab.gov80/gamess/gamess.html http://www.dl.ac.uk/CFS/cfs.html	verze 6 pro Win 9x/NT	<i>ab initio</i> , DFT, semiempirické met (MNDO, AM1, PM3)
Tinker	http://dasher.wustl.edu/tinker/ resp ftp://dasher.wustl.edu/pub/tinker-bin/intelpc/	verze 3 6 pro Win95 a zdrojový kód	molekulová mechanika a dynamika
DALTON	http://www.kjem1.uio.no/software/dalton/dalton.html	verze 1.1 pro Win 98/NT	<i>ab initio</i> výpočty SCF, MP2 nebo MCSCF
AMMP	http7/astenx.jci.tju.edu/amm.html	verze 1 5 pro Win 3 x, Win 95	molekulová mechanika a dynamika, grafické rozhraní

popisu chování elektronu v poli jader a ostatních elektronů. Tento popis (po oddělení pohybu elektronů od pohybu jader – Bornova-Oppenheimerova aproximace) v kondenzované podobě vyjadřuje tzv. vlnová rovnice, což je diferenciální rovnice, v níž vystupují členy jako elektronová vlnová funkce ψ_{el} , Hamiltonův operátor elektronové energie H_{el} a elektronová energie E_{el} . Fyzikální model (model nezávislých elektronů), matematické rovnice a jejich řešení, které představuje přibližné řešení vlnové rovnice principiálně popisující elektronový obal víceelektronových atomů pomocí aparátu vlnové mechaniky, navrhli Hartree a Fock (HF SCF, self consistent field). Roothan později tento model s použitím teorie molekulových orbitalů rozšířil i na víceatomové (molekulové) systémy (Hartreeovy-Fockovy-Roothanovy rovnice), viz např.⁴ Většina dnes používaných QM metod využívá tedy jako pracovní model pro konstrukci elektronové molekulové vlnové funkce model, který je založen na představě jedoelektronových molekulových vlnových funkcí - molekulových orbitalů (MO), jako funkci, které se matematicky vytvářejí pomocí lineární kombinace atomových vlnových funkcí - atomových orbitalů (MO LCAO). Tento model všestranně vyhovuje fyzikálním představám a vhodným matematickým postupem je možné získat informace jak o energetických veličinách tak o elektronové struktuře molekuly. Bohužel tento model přináší i principiální nedostatky vyplývající z jeho samotné podstaty, jde o problém korelační chyby, kterou lze z největší části připisat dvojicím elektronů s antiparalelními spiny v prostorových orbitalech. Pro kvantitativní vyjádření korelační chyby je zavedena v rámci modelu nezávislých elektronů tzv. korelační energie, E_{cor} . Je definována jako rozdíl mezi přesnou energií E systému (v Bornově-Oppenheimerově aproximaci) a Hartreeovou-Fockovou limitou energie (E_{HFL}). E_{HFL} je nejnížší („nejlepší“) hodnotou energie, kterou je možno v rámci

HF-modelu získat. Pomineme-li nejjednodušší kvantově mechanickou výpočetní metodu MO pro π -elektronové systémy, Huckelovu metodu (HMO) a její Hoffmanem rozšířenou variantu na valenční bázi - EHT (Extended Hückel Theory, all valence base), všechny nejběžnější kvantově chemické metody jak semiempirické, tak *ab initio* v principu využívají HF model, případně doplněny (zejména u *ab initio*) o tzv. post-HF-modely, jako Moller-Plesset metodu (MP), metodu konfigurační interakce (CI). Kvalitativně odlišným typem modelu je metoda hustotního funkcionálu (Density Functional Theory, DFT), viz např.²

Z praktických důvodů je užitečné kvantově chemické metody rozdělit do tří skupin (viz obrázek 1)

- semiempirické metody,
- metody *ab initio*, včetně post-HF metod,
- metody založené na teorii hustotního funkcionálu (DFT)

Ještě před pár lety měl koncový uživatel osobního počítače (PC) k dispozici poměrně malý výběr metod omezený na empirické (HMO, EHT) a jednoduché semiempirické metody (CNDO/INDO), s vlastním software nebo s programovým vybavením získaným výměnou mezi členy vědecké komunity, resp. z výměnného programu (QCPE, Quantum Chemical Programm Exchange). Tato poslední možnost je samozřejmě aktuální stále. Řadu programů, např. Mopac7, Mopac93, MOZYME-Mopac pro velké molekuly, Makropol - pro konstrukci systémů v pevné fázi, DRAW - grafické rozhraní pro Mopac (a řadu dalších z oblasti počítačové chemie), je možné získat z QCPE legální cestou (většinou v podobě zdrojového kódu, někdy již přímo dosovské nebo Win-verze), a to zadarmo, resp. za cenu media a manipulační poplatek. Pravda i tyto částky, které se mohou pohybovat od 100 do 300 USD, nejsou pro násince zanedbatelné. Existují i jiná místa na Internetu, (některá URL viz tabulka I) odkud je možné volně stáhnout

Tabulka II

Užitečný vizualizační a pomocný software na Internetu

Název	URL	Poznámka	OS
Chemscape Chime	http://www.mdli.com/chemscape/chime	chemický plug-in pro webovské prohlížeče	Win 3.x, Win95
GopenMol	http://laaksonen.csc.fi/gopenmol/gopenmol.html	grafické rozhraní pro OpenMol, použitelný i pro Gaussian xx a další	Win 3.x, Win95
Molda	http://cssj.chem.sci.hiroshima-u.ac.jp/ftp/molda/molda.htm	modelování molekul, molekulová grafika, exporty a importy mnoha formátů, grafické rozhraní pro Gaussian, Amber, MM2	Win 3.x, Win95
Molmol	http://www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/software/molmol	molekulově grafický program pro vizualizaci a analýzu 3D struktur biolog. makromolekul	Win95/NT
Molden	http://www.caos.kun.nl/~schaft/molden/molden.html	program pro vizuální výstupů Gamess-UK, US, Mopac/Ampac, Gaussian atd	Win 9x/NT
MolPOV	http://www.chem.ufl.edu/~der/der_pov2.htm	vizualizace struktur v PDB formátu	Win95
RasMol	ftp://ftp.dcs.ed.ac.uk/usr/local/share/ftp/root/ nebo ttp://klaatu.oit.umass.edu/microbio/rasmol/getras.htm#raswin	prohlížeč molekul v PDB formátu	Win 3.x, Win95
Re-View	http://www.brunel.ac.uk/8080/depts/chem/ch241/s/re_view/re_view.htm	vizualizátor a analyzátor 3D-molekulových struktur	Win 3.x
Swiss-Pdb Viewer	http://www.expasy.ch/spdbv/	vizualizátor a analyzátor 3D-molekulových struktur a to i několika současně ve formátu PDB	Win 9x/NT
WebLab Viewer (lite nebo 30 dnů)	http://www.msi.com/weblab/viewer/info/	vizualizátor a analyzátor 3D-molekulových struktur, rozsáhlé exporty a importy jiných molekulových a grafických formátů	Win95/NT
Babel	Ftp://kekule.osc.edu/pub/chemistry/software/MS-WINDOWS95/babel/	univerzální transformátor desítek molekulových formátů	MS DOS
ISISDraw	http://www.mdli.com/download/ldraw.html	kreslicí program pro vytváření chemických struktur	Win 3.x, Win95/NT
Pro-3D	http://www.med.ufl.edu/Biochem/pchun/	modelování, vizualizace a analýza 3D-molekulových struktur, akceptuje data z X-ray krystalografických a PDB dat	Win95
Povray	http://www.povray.org	tvorba vysoce kvalitní grafiky	Win95

chemický software pro DOS někdy i pro Windows (a samozřejmě i pro další operační systémy, zejména Linux pro PC je v poslední době silně akcentován).

Typickou vlastností tohoto typu software je, že nemá grafické rozhraní. Tento dnes závažný nedostatek nepřináší jen problém nepohodlného ovládání programu, ale jde i o obtíže při zadávání dat pro větší molekuly a zejména jde o možnost hodnocení, případně prezentace výsledků. Proto je vhodné doplnit výpočetní program o graficky orientovaný software umožňující vizuální problém. Některé možnosti jsou shrnuty v tabulce II. Touto cestou si potenciální zájemce může vytvořit jádro vlastního výpočetního centra pro počítačovou chemii a modelování molekul, někdy též CAMM (Computer Assisted Molecular Modeling), případně si svůj programový potenciál může doplnit o některé další užitečné pomocné programy, jako software pro vzájemnou konverzi některých programových formátů, program na počítačové kreslení a vi-

zuahzaci molekul včetně tvorby vysoce kvalitní grafiky pomocí Povray (viz tabulka II) aj.

V době, kdy akcelerace výkonnosti personálních počítačů a naopak pád cen komponent pro náročné výpočty a grafické aplikace, jako jsou rychlé procesory, paměti RAM a pevné disky je obrovský, přestává být hardware limitujícím faktorem pro aplikace počítačové chemie. Potenciální zájemce z akademického prostředí má před sebou primární rozhodnutí:

- využívání služeb superpočítačového centra,
- samoobsluha (resp kombinace obou).

V případě neakademického zájemce (nemá-h na akademické půdě partnera), tato volba odpadá. Pomineme-h jiné operační systémy než Windows9x/NT, zdá se, že softwarový trh dnes již nabízí poměrně rozsáhlou nabídku programových balíčků pro oblast CAMM. Přirozeně i v této oblasti působí stejné tendence zvyšování požadavků na kvalitu hardware. Tam kde před čtyřmi roky stačily 4-8 MB operační paměti,

500 MB pevný disk představoval dostatečnou diskovou rezervu, běžný textový editor vystačil s maximálně 10 MB místa na disku pro instalaci, dnešní nároky jsou málem desetinásobné.

Stejně tendence působí i v oblasti počítačového modelování molekul a za to je uživateli poskytován větší komfort při práci s problémem, rychlejší výpočet, lepší a názornější grafické vyjádření, možnost použití dokonalejších a komplikovanějších teoretických modelů, možnost zpracování větších problémů - molekul, komplexů, krystalů atd., použití specifických výpočetních prostředků jako jsou QSAR (Quantitative Structure - Activity Relationships) a konformační analýza či hledání přechodového stavu. Takové možnosti mohou být přímo součástí základního balíku nebo mohou být jeho doplňky (add-ons) a to i od jiných producentů (third party add-ons, modules). Všechny tyto vlastnosti i když v různé míře za různé peníze nabízí komerční, profesionální software pro počítačovou chemii. Programy nabízejí mnohem více možností. Jsou komplexnější, přitom z hlediska uživatele jednodušší k ovládnutí a řízení vlastního výpočtu. Ve většině případů lze získat (z Internetu nebo na CD) demoverze nebo časově omezené verze a rovněž většinou jsou dodávány i zjednodušené „junior“ verze (lite, studentské) s omezenou funkcionalitou za zlomek ceny plných verzí.

Funkčnost jednotlivých programových prostředků je velmi odlišná. V některých případech existuje několik verzí lišících se svými funkcemi, je možné je doplnit dodatečnými moduly někdy i od jiného výrobce (moduly pro QSAR, pro konformační analýzu), které nejsou součástí základního programu. Stručný přehled komerčního software CAMM pro PC (Windows 9x/NT) a základních vlastností je uveden v tabulce III. O cenových relacích software této třídy si můžeme udělat představu porovnáním údajů uvedených v tabulce IV. Nyní podrobněji o některých programových balících uvedených v tabulce III.

CS Chem3D

Programový balík CS Chem3D (CambridgeSoft) je výkonný programový balík, umožňující modelování molekul (struktury je možné importovat i z volně dostupného Isis-Draw), vizualizaci molekul v 3D, vizualizaci orbitalů, elektrostatických potenciálů a nabojevých hustot. Integrovanou součástí je vestavěný modul pro výpočty energetických hyperploch metodou EHT a MM2. Balík CS Chem3D Ultra navíc obsahuje modul Mopac Pro, rozšiřující možnosti o použití semiempirických kvantově chemických metod (viz tabulka III) včetně vyhledávání tranzitního stavu. Pozoruhodnou vlastností Chem3D je možnost spolupráce s programem Gaussian 9xW tak, že Chem3D se stává grafickým rozhraním Gaussianu jak pokud jde o zadávání výpočtu, tak i vizualizaci výsledků⁷. Podobně lze do Chem3D integrovat jako „add-ons“ další moduly jako Conformer (Princeton Simulations Inc., konformační studium molekul do 200 atomů se současným prohledáváním až na 10 vazbách) a SCULPT (Interactive Simulations Inc.) (viz tabulka III). Výstupy mohou být v postscriptovém formátu a grafika ve formátu GIF může být snadno integrována na www stránku. Je vhodné poznamenat, že Chem3D je sice „stand-alone“ programový balík, ale může být součástí komplexního chemicky-uživatelsky orientovaného ba-

líku CS ChemOffice (ChemDraw, Chem3D, ChemFinder, ChemNMR, Mopac, ChemInfo). Pro podrobnější popis je vhodné navštívit www stránku Cambridge Software (viz tabulka IV).

Spartan

Softwarová společnost Wavefunction patří k těm z mála, které před nedávnou dobou svou nabídku software pro CAMM rozšířily o PC (a Macintosh) mutace svého umxového programového balíku SPARTAN 5. Jsou k dispozici tři balíky PC Spartan 1, Plus 1 a Pro 1. Společnými rysy všech verzí je grafické rozhraní s modelovacím modulem, který využívá několika šablon (template) předdefinovaných struktur (atomové fragmenty, jak pro začátečníky tak i pro zkušené uživatele s možností volby vazebnosti atomů, funkční skupiny, cykly, aminokyseliny, nukleotidy, šablonu pro modelování pevné fáze). Pro předoptimalizaci geometrie je k dispozici univerzální MM modul SYBIL. Významné rozdíly mezi jednotlivými verzemi jsou v implementaci QM výpočetních metod. Ve všech PC verzích jsou k dispozici v různé míře semiempirické metody včetně AM1-SM2 (solvatace ve vodě a hexadekanu), *ab initio* úroveň s několika možnostmi volby báze a DFT výpočty jsou nově k dispozici ve verzi Pro, která je v nabídce jako horká novinka.

Mimo mnoha dalších podstatných rysů o nichž je nejlépe se informovat navštívením www stránky (viz tabulka IV), považují za důležité zmínit dvě poznámky. Demonstrační CD, které je možné si nechat poslat, mimo mnoha příkladů demonstrujících funkcionalitu PC Spartami (a konec konců molekulového modelování a počítačovou chemii v širším smyslu) obsahuje funkční program pro Windows 95/NT s fungujícím originálním grafickým rozhraním (výběr molekuly, rotace, translace, rotace kolem vazby, zoom, zobrazování - „rendering“), vystavbovým modulem a fungující molekulovou mechanikou. Péče, kterou u Wavefunction věnují svým zákazníkům a zájemcům o počítačovou chemii formou setkání a přednášek (workshop) je značná (podobně jako u GAUSSIAN). Na přednáškách se podílí vůdčí postava Wavefunction a jeden ze současných koryfeů teoretické chemie prof. W. Hehre. Jedinou nevýhodou pro násince je, že „workshopy“ jsou většinou pořádány v Irvine v Californii (poslední workshop byl v prosinci 1998 v Praze). Společnost má vlastní edici „Wavefunction Publications“ (viz např.⁵).

HyperChem

Programový balík HyperChem, momentálně nabízený ve verzi 5 pro Windows 9x/NT (případně mírně levnější verze 4 v podstatě s podobnou funkcionalitou pro Win3x a pro Silicon Graphics (přibližně za stejné peníze verze 4.5) poskytne potenciálnímu uživateli standardně vyhlížející grafické rozhraní umožňující výstavbu, manipulaci, vizualizaci (rendering) struktur a výsledků výpočtů v některých případech i animaci (vibrace při výpočtu IC spektra). Z momentálně dostupných profesionálních programových balíků pro CAMM (mimo Gaussian) nabízí patrně nejdiferenzikovanější modul pro teoretickou chemii. V rámci MM výpočtů nabízí univerzální MM+ a tři další moduly (OPLS, BIO+ a AMBER) pro biomo-

Tabulka III
Přehled programových prostředků pro modelování molekul na PC

Program	GUI	MM	MD	QM-emp. a semiemp.	QM- <i>ab initio</i>	QM-DFT
Chem3D 4.0 (CambridgeSoft Corporation) CONFORMER (Princeton modul Simulation) SCULPT (Interactive Simulations)	ano	MM2 MM2, jako pro Chem 3D MM, jako modul pro Chem 3D	ne	MOPAC97 (AM1, PM3, MNDO, MINDO/3, MNDO/d)	ne	ne
PC Spartan 1 (Wavefunction, Inc.)	ano	Sybyl, MMFF94	ne	MNDO, MNDO(d), AM1, PM3, PM3(tr), SM2-5.4	HF, MP2	SVWN, BP86
Hyperchem 5 (Hypercube, Inc.)	ano	MM+, AMBER, BIO+, OPLS	ano	CNDO, INDO, MINDO/3, MNDO, AM1, PM3, ZINDO	HF, MP2	ne
ALCHEMY 2000 (Tripos Inc.)	ano	Sybyl, MM3	ne	MOPAC97 (AM1, PM3, MNDO, MINDO/3, MNDO/d)	ne	ne
WinMOPAC (Fujitsu)	ano	ne	ne	MOPAC97 (AM1, PM3, MNDO, MNDO/d, MINDO/3), MOS-F V4	ne	ne
G98/Gaussview (Gaussian)	ano ^a	Amber, DREIDING, UFF	ne	(CNDO/2, S, S2, S3, INDO/S) MNDO, AM1, PM3, SCRFF, ZINDO	HF, MP2-5, CI, CC, CAS, OVGFF, SCRFF,	Slater, Xa, Becke 1988, VWn, VWN5, LYP, P81, P86, P-W91, B3LYP
AccuModel 1.0 (MicroSimulations)	ano	MM3	ne	ne	ne	ne
ArgusLab 1.0	ano	ne	ne	EHT, INDO/s, MNDO, AM1, PM3	ne	ne
ChemSite	ano	MM2	ano	ne	ne	ne
Molecular Modeling Pro	ano	MOLY	ne	HMO, CNDO/INDO	ne	ne
CaChe 3.1 (Oxford Molecular Group, Ins.) DGauss 4.1	ano	MM2, MM3	ano	EHT, ZINDO, MOPAC	ne	ne
PCMODEL (Serena Software)	ano	MMX, MM3, MMFF94	ano	ne	ne	ano, jako modul pro CAChe
AMPAC (Semichem)	ano	ne	ne	MINDO/3, MNDO/c, d, AM1, PM3, SAM1	ne	ne
EduChem	ano	ne	ne	EHT, PM3	ne	ne
MOBY 1.5 (Springer Verlag)	ano	MM	ano	ano	ne	ne
SymApps 6	ano	MM2	ne	ne	ne	ne
ACD/3D Viewer	ano	CHARMM	ne	ne	ne	ne

^a GaussView, za doplatek, není součástí základního programového balíku

lekuly. Z QM metod jsou kromě empirické EHT k dispozici semiempirické QM metody v klasickém výběru analogickém MOPACu, až po spektrální verzi metody ZINDO, v kombinaci s metodou konfigurační interakce (CI) vhodnou pro výpočty energií elektronických přechodů (UV-VIS oblast). Tato metoda je mimochodem k dispozici pouze v poslední verzi Gaussianu 98, za velmi těžký peníz lze dokoupit modul ZINDO pro CERIOUS, resp. Insight II (MSI). Není implementována nová

MNDO/d a PM3(tr) umožňující výpočty molekul obsahujících přechodové kovy. Pro tyto případy je doporučována metoda ZINDO/1. Báze pro *ab initio* výpočty jsou k dispozici od minimální až po 6-31G** (H-Ar). V „single point“ modu je použitelná CI a MP2 procedura. Oproti Spartanu chybí DFT model, naopak je k dispozici molekulová dynamika (Langevinova dynamika) a metoda Monte Carlo v zásadě se všemi metodami. Z praktických důvodů má smysl použití MM a se-

Tabulka IV
Ceny profesionálních programů pro modelování molekul na PC

Program	Cena ^d	Cena ^b , SciTech, Kč	Cena ^c Opencae, Kč	Poznámka
Chem3D 4.0	489 USD	17964,-		http://www.camsoft.com/
CONFORMER	550 USD	16164,-		http://www.prim-sim.com http://www.conformer.com
SCULPT	690 USD			minimalizace v reálném case http://www.intsim.com , pro PC, MAC, SGI
PC Spartan	399 USD	10764,-		http://www.wavefun.com/
PC Spartan Plus	549 USD	16164,-		1 pro SGI, MAC
PC Spartan Pro	799 USD	25164,-		
Hyperchem 5 Suite	1395 USD	50220,-	50220,-	http://www.hyper.com/
Hyperchem5 Pro	995 USD	35820,-	35820,-	1 pro SGI(v 4.5), sit, hard lock
Hyperchem 5 Std	595 USD	21600,-	21420,-	
Hyperchem Lite	49.99-	3600,-	1960.5560-	
Pocket Hyperchem for Windows CE 2.0	-199 USD		8160,-	
ALCHEMY 2000	695 USD	29820,-		http://www.tnpos.com/
WinMOPAC (97)	400 USD			http://www.fujitsu.co.uk/ http://www.wmmopac.com vizualizace Gaussianu http://www.gaussian.com/
G98W/Gaussview (UNIX, sit 3000/3000\$)	600/500 USD	23040,-		
AccuModel 1.0	399 USD			http://www.microsimulations.com/
ArgusLab 1.0	nezjištěna			http://www.seanet.com/~mthompson/ArgusLab/index.htm (dodava)
ChemSite	99 USD			modelování proteinů, DNA, polysacharidů atd až 4000 atomů až 40 molekul současně, 70 fyz. vlastností
Molecular Modeling Pro obojako „standalone“	99 USD			programy nebo interaktivně dodava Chemistry Software for Windows, http://www.chemsw.com nebo http://www.sge.com/software/index.htm http://www.oxmol.com/
CaChe 3.1	600 GBP			http://www.serenasott.com/
PCMODEL7	400 USD			http://www.semichem.com/
AMPAC 6.5	495 USD			http://www.etc1.on.ca/products.htm
EduChem 1.1				
individuální licence	155 USD	8280,-		
skupinová (třídni, 10 lic.)	550 USD	22500,-		
školm(neomezena)	995 USD	38520,-		
MOBY 1.5	998 DM			svserv@dhdspn6.bitnet(demo)
SymApps 6	nezjištěna			http://www.softshell.com
ACD/3D Viewer	freeware			http://www.acdlabs.co.uk
QCPE	cca 200 USD			ftp://qcpe6.chem.indiana.edu MOPAC7, 93,

^d Akademická cena z ceníku výrobce, je-li uvedena, ^b SciTech spol. s r.o., akademická cena (bez DPH, 5%), prosinec 1998, ^c Opencae Praha spol. s r.o., akademická cena (bez DPH, 5%), brezen 1999

memprických metod. Zaznam výsledků molekulové dynamiky lze uložit a přehrávat jako aví soubor. Solvatace je dosud řešena pouze pro MM výpočty „ponorením“ molekuly do periodického boxu s molekulami vody. Jiný solvent není k dispozici.

V těchto posledně diskutovaných bodech (DFT, MD a přístup k problému solvatace) je patrný nejzásadnější rozdíl mezi oběma balíky. Hyperchem má otevřenou architekturu a zkušební uživatel může menit, resp. doplňovat soubory parametrů

standardně dodaných při instalaci a rozšiřovat funkcionalitu pomocí skriptů, které lze získat z Internetu (některé přímo z „home page“ Hypercube) a může si také skripty psát sám. Výrobce podporuje tuto formu rozšiřování funkcionality Hyperchemu a dodává k tomu programový nástroj Chemist's Developer Kit (CDK). Jde především o umožnění dynamické výměny dat a efektivní propojení s jiným windowsovým softwarem např. MS Word, MS Excel, MS Visual Basic. CDK je součástí balíku Pro a Suite. Ten navíc obsahuje další „add-ons“,

kteře rozšiřují další možnosti zobrazování, umožňují konformační analýzu, QSAR, poskytují uživateli možnost efektivního modelování fragmenty cukrů a modelování krystalů. Na okraj je třeba se zmínit o ještě jedné možnosti rozšíření užité hodnoty software od Hypercube. Jde o programový balík HyperNMR 2, který je sice „stand-alone“ program pro výpočty NMR spekter semiempirickou metodou TND01, 2, avšak oba programové balíky umožňují dynamickou výměnu dat a jejich kombinace zvyšuje jejich užitečnou hodnotu. Pravda za poněkud více peněz.

Alchemy

Programový balík Alchemy 2000 (Tripos Inc., především na unixovské aplikace orientovaná softwarová firma) představuje další komerční komplexní řešení pro CAMM pro PC. Má standardní windowsovske grafické rozhraní umožňující výstavbu molekul, jejich vizualizaci a ovládání jednotlivých funkcí. V rámci základních vlastností popsaných v tabulce III (integrované výpočetní modely teoretické chemie) zajímavou vlastností je modul pro molekulovou mechaniku a možnost nahrávání animací a jejich přehrávání ve formátu avi a modul pro konformační analýzu. Data lze exportovat do Excelu a možnost přípravy barevných prezentací je samozřejmostí. Vyznamné rozšíření funkcionality je možné pomocí „third party add-ons“: SciQSAR (studium relací typu „struktura-aktivita“, QSAR/QSPR), SciProtein (komplexní prostředek pro budování a práci s proteiny), SciPolymer (komplexní prostředek pro predikce vlastností polymerů založený na relacích struktura-vlastnost - QSPR, obsahuje databázi 650 polymerů, včetně informací o jejich vlastnostech), SciLogP (umožňuje predikci hodnot log P, logaritmus rozdělovacího koeficientu P, pro systém n-oktanol/voda, na základě korelací 3D molekulových deskriptorů). Tyto moduly jsou vyvinuty společností SciVISION (viz tabulka V) pro Alchemy a jsou použitelné i pro formát souborů Chem3D (Cambridge Software).

WinMOPAC

Jádro programového balíku tvoří – jak již napovídá název – MOPAC, nově ve verzi 97 nabízející klasické spektrum semiempirických metod s nově implementovanou metodou MNDO/d pro výpočty molekul obsahujících přechodné prvky. Navíc pak ještě balík MOS-F V4 (Semiempirical Molecular Orbital Package for Spectroscopy) vyvinutý pro Fujitsu ke studiu spektroskopických vlastností molekul pomocí semiempirických kvantově chemických metod. Implementovány jsou INDO/S a CNDO/S, S2, S3.

Mopac standardně nabízí mimo klasický rozsah kvantově chemických výpočtů jako optimalizace geometrie, elektronovou strukturu a statické indexy molekul rozsáhlé spektrum výpočtů nových deskriptorů pro QSAR/QSPR. Z nových možností, které nabízí nova generace MOPACu (93, 97) stojí za zmínku především možnost výpočtů molekul včetně solvatace (model COSMO) u verze 97 včetně excitovaných stavů. Zatímco MOPAC 93 nabízí i QCPE (viz tabulka IV), verze 97 v době sepisování tohoto článku nebyla QCPE nabízena. Vzhledem ke všeobecně známým kvalitám balíku MOPAC (rychlost, výkonnost, nabízené teoretické modely) je balík

WinMOPAC patrně to nejlepší pro PC, co v oblasti semiempirických výpočtů existuje a bylo vyvinuto pod vedením J. J. P. Stewarta (Mr MOPAC). WinMOPAC akceptuje i datové soubory generované Chem3D, Hyperchemem, případně jinými programy a také zobrazuje výsledky výpočtů Gaussianem.

Gaussian

Gaussian je standardní, nejvýkonnější komerční softwarový balík pro kvantově chemické výpočty, především pro *ab initio* a DFT. Stručný přehled vlastností a implementovaných metod je patrný z tabulky III. Před nedávnou dobou byla tato aplikace, od jakživa doména mainframeů a superpočítačů, zpřístupněna i pro operační systém Win9x/NT (a také pro MAC), jako GaussianW94 a nově i W98. Jeho hlavní předností je především široké spektrum post-Hartreeových-Fockových (elektronová korelace) metod a několika populárních variant metod DFT pro nejširší oblast aplikací a výpočtů vlastností molekul. V poslední verzi byla přidána do semiempirického balíku metoda ZINDO pro elektronicky excitované stavy. Z nových vlastností W98 lze dále uvést např. výpočet NMR stínících konstant a magnetických susceptibilit s použitím MP2, možnost výpočtu Ramanových intenzit pomocí DFT a MP2, rozšíření modelů pro uvažování solvatace, nové báze funkcí a řada dalších, které jsou v detailech popsány na příslušné stránce Gaussianu (viz tabulka IV). Gaussian má volitelné vlastní grafické rozhraní – GaussView, která je dodávána za doplatek (a ne právě malý) jako samostatný programový balík. Je možná spolupráce s Chem3D (Cambridge Software) nebo s jinými i volně dostupnými programy. Unikátní je možnost použití modelu ONIOM pro výpočty velkých molekul.

Pravděpodobně nejpodstatnější problém je otázka, zda vůbec výpočty na úrovni *ab initio* a stolní PC s operačním systémem MS DOS a vyšší (včetně Windows) jdou dohromady. Skutečnost, že programové vybavení umožňující realizovat *ab initio* výpočty na PC pod operačním systémem Win9x/NT již přináší řada komerčních i nekomerčních produktů ukazuje, že nejde o utopii. Díky zvyšování výkonnosti procesorů pro PC je možnost *ab initio* výpočtů malých molekul na stolních počítačích poměrně reálná.

Gaussian rovněž věnuje velkou pozornost „ne-internetové“ osvětě, pořádá semináře a má vlastní knižní edici (viz např.⁶⁾

GAMESS

GAMESS (The General Atomic and Molecular Electronic Structure System), resp. PC GAMESS je univerzální softwarový balík pro *ab initio* kvantově chemické výpočty, původně vyvinutý pracovní skupinou na Iowské státní univerzitě (Gordon research group at Iowa State University). Pro desktopy jej kompiloval již v paté verzi A. A. Granovski (Moskevská státní univerzita)⁸. Program umožňuje v rámci teoretických modelů a vlnových funkcí uvedených v tabulce III, výpočet energie, její optimalizace, hledání tranzitního stavu, reakční cesty, vibračních frekvencí a mnoha dalších molekulových indexů molekul obsahujících elementy až po radon. Jako jeden z mála programů je GAMESS vhodný pro excitované stavy (MCSCF, CI) na *ab initio* úrovni.

Tabulka V
Některá další zajímavá URL

URL	Poznámka
http://www.scitech.cz/software.htm	informace, stručný popis a ceny veškerého chemicky orientovaného software pro Windows i Unix
http://www.opencae.cz/	česká soft- a hardwarová společnost mimo jiné orientovaná na CAMM
http://www.chemsw.com	informace, stručný popis a ceny veškerého chemicky orientovaného software pro Windows, vydává časopis ChemSW(zdarma)
http://www.compuchem.com/	Software for Chemistry, Chemical Education, Structure Drawing, Molecular Design, Computational Chemistry, Scientific Software
http://store.camsoft.com/store/	www katalog chemicky orientovaných softwarových produktů, počítačů a knih
http://server.cclnet/chemistry.html	Computational Chemistry List
http://ep.llnl.gov/msds/orgchem/molmodl.html	internetové zdroje, informace a aplikace z oblasti organické chemie
http://www.links2go.com/topic/Chemistry_Software	vyhledávání v oblasti chemického softwaru
http://acad.tnstate.edu/~chemnet/chem.html	chemie a chemické zdroje na Internetu
http://www.chemcenter.org/	ChemCenter Home, servis americké chemické společnosti
http://www.chem.ucla.edu/chempointers.html	The World-Wide Web Virtual Library: Chemistry, uni v. Los Angeles
http://dir.yahoo.com/Science/Chemistry/Computational_Chemistry/	informace a zdroje z oblasti počítačové chemie
http://infoseek.go.com/Titles?qt=computational+chemistry	informace a zdroje z oblasti počítačové chemie
http://www.lycos.com/cgi-bin/pursuit?query=computational+chemistry&cat=dir	informace a zdroje z oblasti počítačové chemie
http://www.altavista.com/cgi-bin/query?q=computational+chemistry&pg=q&what=web&fmt=	informace a zdroje z oblasti počítačové chemie
http://www.shef.ac.uk/chemistry/chemdex/welcome.html	přehledný a aktuální Index chemických zdrojů informací, komerčních a akademických institucí
http://www.netsci.org/Resources/Software/top.html	přehledný a aktuální Index chemických zdrojů informací, software, komerčních a akademických institucí
http://www.sgi.com/chembio/resources/	rejstřík zdrojů chemických informací na stránce SGI
http://www.isinet.com	Institute for Scientific Information
http://hackberry.chem.mu.edu/	Northern Illinois Uni v., Dep of Chem. and Biochem., chemie na Internetu
http://www.ccdc.cam.ac.uk/	WWW Server Cambridge Structural Database
http://www.pdb.bnl.gov/PDB	WWW Server, Brookhaven National Laboratory, Protein Data Bank
http://ndb-mirror-2.rutgers.edu/	The Nucleic Acide Database
http://cmm.info.nih.gov/modeling/	National Institute of Health, Center for Molecular Modeling
http://www.softshell.com	Softshell, komplexní programové prostředky pro chemické prezentace, texty, diagramy, 2-D a 3-D struktury
http://www.cherwell.com	Cherwell Scientific Ltd. gNMR - software pro NMR simulaci(podle Popla), add-on pro Chem3D, pro Win/MAC
http://www.acdlabs.com/	ACD(Advance Chemistry Developments) Labs Property Predictions, software pro predikci ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P 2D-NMR spekter a mnoha dalších fyzikálních vlastností
http://www.msi.com	Molecular simulation, „top level“ CAMM software pro Unix, WebLab Viewer pro Win95
http://www.scivision.com	SciVISION Inc., moduly pro Alchemy a Chem3D, SciQSAR (QSAR/QSPR), SciProtein (vystavba a práce s proteiny), SciPolymer (predikce vlastností polymerů založený na QSPR, obsahuje databázi 650 polymerů, včetně informací o jejich vlastnostech), SciLogP(odhady rozdělovacího koeficientu P, n-oktanol/voda)

Nemá vlastní grafické rozhraní, je vhodné jej doplnit vhodným softwarem pro tvorbu vstupního souboru a vizualizaci výsledků výpočtu pro používaný operační systém, buď přímo od producenta programu nebo od jiných softwarových

společnosti GAMESS (toto označení lze považovat za vyhrazeno pro název programu pro jiné než PC výpočetní platformy) a PC GAMESS (označení zahrnuje verze pro Win9x/NT, Mac, Linux, OS/2 a DOS) je v podstatě software nekomer-

čného druhu, autoři vyžadují registraci a citování Nicméně vzhledem k jisté podobnosti s Gaussianem považují za vhodné jej citovat na tomto místě. Detailní popis programu je dostupný v literatuře⁹

AccuModel

V roce 1993 založená firma MicroSimulation (New Jersey, USA) nabízí mimo rozsáhlejší nabídku software pro unixové systémy i modelovací programový balík AccuModel pro Win95/NT. Program orientovaný výslovně na tzv. organické molekuly, nabízí standardní prostředky tvorby molekul v grafickém rozhraní, standardní možnosti exportu a importu struktur (PDB, MM3, MDL molfiles, ChemDraw, ChemWindow, MacroModel), tři obvyklé možnosti vizualizace (drátový model, model „ball and sticks“ a CPK model (koule o Van der Waalovu poloměru)). Výpočty a minimalizace energie pomocí MM3 nebo UFF (univerzální FF metoda) Jako moduly jsou nabízeny Powerfit umožňující překryv a porovnání dvou molekul a AccuLogP pro výpočet rozdělovacího poměru P Studentům je nabízena 80% sleva z komerční ceny (dvojnásobek akademické ceny, viz tabulka IV)

ArgusLab

Jako novinka se nabízí na www stránce ArgusLab (viz tabulka IV) stejnojmenný program ve verzi 1.0 pro Win95/98/NT, umožňující standardní základní funkce pro CAMM, modelování, minimalizaci energie, vizualizaci a výpočty běžných molekulových indexů V programovém balíku není integrována molekulová mechanika, což patrně není nutné, neboť integrované semiempirické kvantově chemické metody jsou dostatečně rychlé. Za zmínku stojí možnost výpočtu elektronických spekter (INDO/S) a možnosti současného zpracování několika problémů při použití výkonného, např. víceprocesorového PC Kromě vlastního formátu souborů je podporován formát .ent (Brookhaven Protein Data Bank formát, pdb).

ChemSite a Molecular Modeling

Oba uvedené programové balíky (Molecular Modeling ve verzích Basic a Pro, spolu s doplňkem Molecular Analysis Pro) je nabízen softwarovými firmami (viz např. tab. IV) jako velmi levný prostředek především pro využití, pro prostředí Win95/NT. ChemSite je programový prostředek určený pro práci s biologickými makromolekulami Umožňuje modelování, zobrazování a simulaci jejich dynamického chování. Je přirozeně podporován pdb formát a další nejběžnější formáty (.mol, Mopac Z-Matrx, MDL) Molecular Modeling Pro je univerzální programový prostředek pro molekulové modelování umožňující výpočet celkem 70 molekulových indexů (ovšem včetně molární hmotnosti a elementárního složení), mj. rozměry, povrch a objem molekul, rozpustnostní parametry, log p, bod varu a tenze par aj., pokud vystačíme s HMO, semiempirickými metodami (CNDO, INDO) a molekulovou mechanikou Výhodou je možnost současného zobrazení až 40 molekul a 4000 atomů a současně minimalizace až 10 mo-

lekul současně molekulovou mechanikou MOLY. Jsou rovněž podporovány standardní molekulové formáty Silným argumentem k zamyšlení je zejména cena (viz tabulka IV) Jako plug-in je doporučován balík Molecular Analysis Pro, umožňující analýzy vztahů mezi strukturou a experimentálními vlastnostmi (QSAR a QSPR) s přímým exportem dat do Excelu

CAChe

Doménou softwarové společnosti Oxford Molecular Group jsou především unixové produkty a rozsáhlá nabídka software pro oblasti bioinformatiky, chemické informatiky, molekulového modelování a QSAR Avšak i pro prostředí Win9x/NT nabízí dva komplementární výkonné produkty, kterými jsou PC verze programových balíků CAChe 3.1 (Personal a Quantum) a DGauss 4.1 (pouze pro Win NT), který je možno použít jako modul pro CAChe i jako samostatný program. Filozofie balíku CAChe je poněkud odlišná od rysů obvyklých pro tento typ software Balík tvoří tři integrální součásti, „ProjectLeader“, „ProcedureEditor“ a „Workspace“. Uvedené tři součásti odpovídají třem etapám realizace počítačového experimentu, tj. jeho plánování, přípravy, včetně přípravy „pracovního deníku“ pro záznam výsledků, ve formě grafických, tabulkových a textových podkladů, včetně regresí a QSPR modelů (ProjectLeader), příprava a plánování dávek výpočtů, volba metod a rozsahu výpočtů (geometrie, energie, volba metody pro optimalizaci geometrie a následně metody pro zadané vlastnosti a indexy) a konečně vlastní výstavbové prostředí - Workspace V Quantum CAChe jsou integrovány metody MM (MM2, MM3) a MD, z QM metod EHT (s parametrizací pro všechny elementy), MOPAC včetně COSMO - solvatačního modelu, ZINDO (UV-VIS spektra), včetně možnosti uvažování solvatace. Při dokoupení programu DGauss se spektrum QM metod doplní o DFT (viz tabulka III) pro všechny elementy včetně lantanidů a aktinidů Je ohlášena verze Quantum CAChe 3.2 obohacena a možnosti bohatší analýzy a práce s polymery a krystaly Bohaté exporty a importy do většiny běžných formátů včetně formátu PC GAMESS jsou samozřejmostí

PCmodel

Dříve velmi populární balík (Serena Software) pro CAMM vyznačující se snadným ovládním grafického rozhraní s integrovanou molekulovou mechanikou. Patrně jeden z prvních (ne-li první) s nímž jsme se seznamovali Nejužitečnější vlastností bylo, že podporoval širokou škálu exportů a importů umožňující ve své době vytvářet datové soubory pro jiný software V současné době je nabízen ve verzi 7, pro Win9x/NT. Podporuje několik MM modelů (viz tabulka III) Umožňuje zobrazení až 2500 atomů, konformační prohledávání ve čtyřech cyklech a až padesáti vazeb současně MM metody jsou parametrizovány pro všechny přechodné kovy a uživatel může použít i vlastní sadu parametrů Podporovány jsou formáty souborů MM2, MM3, MOPAC, Gaussian, Macromodel, Alchemy, Sybyl, Chem-3D a PDB Programový balík je určen především pro práci s malými molekulami avšak je použitelný i pro práci s biomakromolekulami, neboť například umožňuje

v případě polypeptidů zobrazení v módu „graphical polypeptide backbone ribbons“ S PCmodelem spolupracují další programy, jako Global-MMX (GMMX), program pro minimalizaci sterické energie, který užívá MMX-metodu (molekulová mechanika), k vyhledání energeticky nejvýhodnější konformace, dále je dodávána vlastní verze Mopacu 6 pro Win3 x, Win9x/NT podle zdrojového kódu z QCPE (QCPE #504) K vizualizaci výsledků Mopacu (a také Gaussianu je nabízen program Orbdraw pro Win3.x, Win9x/NT Dalším doplňkem může být program Vibrate, což je program pro vizualizaci normálních vibračních módů molekuly Program Vibrate umí číst soubory generované Mopacem, Gaussianem, a programem pro *ab initio* výpočty - HONDO a zobrazit vypočtené vibrační spektrum. Program nabízí i možnost animace vibrací v molekule pro zvolenou spektrální linii, současně s možností rotace molekuly v průběhu animace.

AMPAC

Ampac (SemiChem) je hlavním programovým produktem této firmy Tento programový produkt u jehož zrodu (především pokud jde o fyzikální modely) stál M J S Dewar je spolu s programovým balíkem Mopac považován za standard v oblasti kvantově chemických výpočtů semiempirickými metodami Pro PC verzi Ampacu 6 5 je především charakteristické, že nemá vlastní grafické rozhraní (na rozdíl od unixových verzí) a jako doporučené GUI je PCModel (viz výše). Přehled implementovaných semiempirických metod je uveden v tabulce (viz tabulka III) a stejně jako v Mopacu pro uvažování solvatace je použit model AMSOL a COSMO Rovněž hledání přechodových stavů je k dispozici. Nutnost dodatečného doplnění Ampacu vizualizačním prostředkem je významným nedostatkem PC verze a doporučená kombinace s PCmodelem se pak ve srovnání s konkurenčními produkty prodraží (viz tabulka IV). Mimo výše uvedené doplňkové programy je Ampac i Amsol dostupný z QCPE.

EduChem

Na výukové prostředí, především středních škol, je zaměřen programový balík Educhem ve verzích 1 0 a 1 1, který je určen pro operační systém Windows 95/98 a NT. Nesporně by však byl užitečným pomocníkem i na vysoké škole Balík - mimo jiné - obsahuje moduly Molecule Builder, Molecule Viewer, Orbital Viewer a QuanChem (tento modul je právě jen ve verzi 1.1) Vlastnosti a možnosti modulů jsou podřízeny předpokládaným výukovým účelům a předpokládané zájmové skupině uživatelů. Builder má předdefinované široké spektrum struktur, funkčních organických i metalických skupin a cyklů včetně fragmentů polypeptidů a polynukleotidů Specifickým modulem je Orbital Viewer, který umožňuje grafické prezentace atomových orbitalů vodíkového typu pro hlavní kvantové číslo do pěti a vedlejší do tří (s, p, d, f). Orbitály jsou znázorněny formou izoploch s možnostmi dalších typů vizualizace a manipulace. Modul QuanChem umožňuje metodami EHT nebo PM3 optimalizace geometrie a výpočty elektronických vlastností atomů a molekul Jsou možné výpočty neutrální i nabitých molekul s různou multiplicitou metodou UHF Molecule Viewer umožňuje běžné možnosti vizualizace a ma-

nipulace s molekulami Balík obsahuje doprovodný vyukový text v HTML formátu (za 30 USD lze získat v tištěné podobě).

Pro výukové účely lze z Internetu získat pro oblast obecné a strukturální chemie rozsáhlé spektrum programů, obrázků, animací a hypertextů (na tento aspekt počítačové chemie se však autor tohoto textu neměl v úmyslu zaměřovat) a přirozeně v zásadě všechny dříve popsané produkty lze tvůrčím způsobem pro výuku použít. EduChem z hlediska poměru vlastností a ceny by jistě našel na našich školách uplatnění, jeho nespornou předností je uživatelská příjemnost a komplexnost

MOBY

Tento program byl patrně naposledy distribuován ve verzi MOBY 1.5 v roce 1992 pro DOS 2.0 a vyšší Umožňoval standardní 3-D modelování molekul s až 2000 centry Umožňoval optimalizace geometrie a konformační analýzu jak pomocí MM a QM metod (semiempirické metody) a molekulovou dynamiku a výpočty spektrálních vlastností jak IR, tak i elektronické přechody (UV/VIS spektra).

SymApps, ACD/3D Viewer

Uvedené dva programové moduly nejsou svou podstatou typickými programy pro modelování molekul. Obajsou především konvertory 2-D molekulových struktur na 3-D prostorové modely s běžnými grafickými modely vizualizace 3-D molekulových objektů pro chemické prezentace.

První je součástí publikačního programového balíku ChemWindow 6 (Softshell, Inc, viz tabulka V) a druhý doplňkem (resp součástí) freewarového chemického kreslicího programu ChemSketch v 4 0 (oba od Advanced Chemistry Developments, Inc., viz tabulka V) V obou případech je 2-D - 3-D konverze realizována pomocí optimalizace geometrie 2-D objektu metodami MM V případě SymApps jde o metodu MM2 a v případě ACD/3D Vieweru jde o CHARMM, s omezením na atomy C, H, F, Cl, Br, I, N, O a S. ACD/3D Viewer je dále k dispozici ve verzi vhodná jako modul pro ISIS/Draw (od v 2.0) a ISIS/Base

ACD/3D Viewer importuje soubory MDL mol, resp. prostřednictvím propojení s ChemSketch může nepřímou importovat formáty .skc (ISIS) a .chm (CS ChemDraw). Exporty (opět jen prostřednictvím ChemSketch) jsou možné do již uvedených programových a do běžných bitmapových grafických formátů.

SymApps umožňuje import i z ChemDraw nebo ISIS/DRAW, formát MDL mol, GaussianZ-matnx, Mopac, PDB, XYZ, podporuje export do PDB a XYZ Umožňuje animace některých operací a jejich ukládání v avi souborech.

Jak si vybrat?

Potenciální zájemce o modelování molekul a teoretickou chemii si musí najít odpovědi především na následující otázky. Bude schopen daný programový balík řešit ten typ problémů, který mě zajímá? Bude obsahovat ty teoretické modely, které jsou adekvátní mým problémům? Bude možné pracovat s tak velkými molekulami s nimiž pracuji? Bude vše co mě zajímá

proveditelné na PC v rozumných výpočetních časech? K nalezení řady odpovědí bude jistě v první řadě většina zájemců hledat především prostřednictvím internetu. K tomu může v první řadě posloužit některá z adres (URL), které uvádím v tabulce V.

Jistou orientaci ve vlastnostech některých programových produktů z oblasti CAMM, je možné hledat v některých souhrnných státech, např. poměrně pravidelně v časopisu CS Catalyst¹¹ (od čísla 6(1), 1998 byl přejmenován na Chem-News.Com a je k dispozici i v elektronické formě „on-line“), a Scientific Computing World¹². Oba jsou distribuovány zdarma, proto lze očekávat orientaci především na komerčně distribuované programy. V oblasti freeware je situace méně přehledná. Vstup do této problematiky např. prostřednictvím Internetu jsem se pokusil potenciálnímu zájemci usnadnit nabídnutím alespoň některých adres (tabulky I, II a V).

V každém případě je možné uzavřít, že je k dispozici poměrně rozsáhlé spektrum programových prostředků pro vstup do světa CAMM na PC, až do úrovně *ab initio* výpočtů. Řešení pro jednotlivce za relativně málo peněz nebo i zadarmo. Vzhledem k nástupu Windows NT, software pro režim „terminál-server“, při použití i víceprocesorových PC a síťového software, může být např. HyperChem v kombinaci s Gaussianem 98W řešením případně i pro malé pracovní skupiny. V této souvislosti je zajímavá zpráva ohlašující zahájení prodeje grafických pracovních stanic společnosti Silicon Graphics (SGI) Silicon Graphics 320 a Silicon Graphics 540 (cit.¹⁰). Nové pracovní stanice využívají procesory Intel a operační systém Windows NT. Standardní technologie jsou zkombinovány se zkušenostmi Silicon Graphics v oblasti vizualizace a s novou architekturou, která při zachování plné kompatibility překonává bariéru tradičního vnitřního uspořádání PC. Tato inovace je příčinou neobvykle vysoké užitné hodnoty a tím i příznivého poměru cena/výkon. Stanice Silicon Graphics 320 může být osazena až dvěma procesory Intel Pentium II 450 MHz a až 1GB paměti ECC SDRAM.

Stanice Silicon Graphics 540 je prozatím jedinou grafickou stanicí na trhu, kterou lze osadit až čtyřmi procesory Intel Pentium II Xeon 450 MHz s 512 kB, resp. 1 MB nebo 2MB L2 cache paměti a až do 2 GB paměti ECC SDRAM. Architektura IVC je založena na grafické čipové sadě Cobalt To umožňuje odezvy v reálném čase při zpracování velkých obrazů s vysokým rozlišením, 3D modelů a komplexních databází, což přináší podstatnou výhodu uživatelům, kteří pracují s velkými obrazovými soubory nebo komplexními grafickými daty.

Na první pohled ideální řešení pro CAMM. Jen mít peníze.

LITERATURA

1. Grunenberg J., Herges R.: *Nachr. Chem.* 4, 46 (1998).
2. Leach A. R.: *Molecular Modelling, Principles and Applications*. Longman, Essex 1996.
3. Allinger N. L., Zuh H. Z.: *J. Am. Chem. Soc.* 77/, 8551 (1989).
4. Polák R., Zahradník R.: *Kvantová chemie*. SNTL, Praha 1985.
5. Hehre W. J., Yu J., Klunzinger P. E., Lou L.: *A Brief Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*. Wavefunction, Irvine 1998.
6. Foresman J. B., Frisch E.: *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. Gaussian, Pittsburgh 1996.
7. Frisch J.E.: *Vizualizing Gaussians's Results with Chem3D*: <http://www.chemnews.com/issue.cfm?I=92>
8. The PC Gamess: <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>.
9. Schmidt M. W., Baldridge K. K., Boatz J. A., Elbert S. T., Gordon M. S., Jensen J. H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K. A., Su S., Windus T. L., Dupuis M., Montgomery J. A.: *J. Comput. Chem.* 14, 1347 (1993).
10. Hlavenka J.: *Computer* 2, 19 (1999).
11. Bader R. F. W.: *Atoms in Molecules – Quantum Theory*. Oxford University Press. Oxford 1990
12. <http://www.chemnews.com>.
13. <http://www.scientific-computing.com/Mags/SCW/>.

P. Janderka (*Department of Theoretical and Physical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*):
Molecular Modeling and Theoretical Chemistry on PC

The article presents a review on software products for computer-assisted molecular modeling (CAMM) as well as for visualization and customization of results on personal computers with special attention to those working under MS Windows 9x/NT. Commercial computational products on the software market and some other useful free programs such as builders, visualizers and converters are reviewed. Properties of various packages, in particular implemented theoretical models, and the prices for academic customers are compared. Internet addresses are given of software companies and suppliers as well as some other interesting addresses for potential customers or teachers interested in general, structural and theoretical chemistry.

VĚTŠINA MEDAILÍ TENTOKRÁT PRO CHEMICAL ABSTRACTS (POROVNÁNÍ VYBRANÝCH BÁZÍ DAT NA PŘÍKLADU REŠERŠE O FARMACEUTICKÉM PŘÍPRAVKU EPIBATIDIN)

JAROSLAV HORKÝ a BOHUMIL BOČEK

*MEDISTYL, s r o., Němčická 1112, 142 00 Praha 4, e-mail.
medistyl@medistyl.cz*

Došlo dne 10 VI 1999

Klíčová slova: databáze, Chemical Abstracts, epibatidin

1. Úvod

Ve světových databázových centrech a sítích je obrovské množství nejrůznějších informací, oblast farmacie nevyjímá. Kontakt s touto pokladnicí světových znalostí je velmi významný - může například zabránit velmi nákladnému výzkumu, na jehož konci (např. ve fázi patentování výsledků) by se zjistilo, že daná problematika byla již dříve podrobně popsána a jednotlivé postupy, resp. přípravky jsou pečlivě patentově chráněny.

Ke sledování konkrétních ladek nás může přivést postupný vývoj ve vlastní firmě, sledování činnosti firem konkurenčních nebo třeba průběžné monitorování odborného tisku v daném oboru.

Srovnání jednotlivých databází začalo tentokrát krátkým článkem v Hospodářských novinách (7.10.1997), v němž byla zmíněna látka s označením Epibatidin, jež má mít o 200 % vyšší účinnost než morfiu a jež byla izolována z kůže ekvádorské ropuchy. Podle této zprávy má být molekula epibatidinu tvořena dvěma vzájemně propojenými cykly, přičemž atom chloru v pyridinovém jádře má hrát rozhodující roli v účinnosti této látky.

K bližšímu prozkoumání uvedené látky se nabízí databázová síť STN International (Scientific and Technical Information Network Columbus/Ohio - Karlsruhe - Tokio), jejíž

Příklad 1

=> s epibatidin?

```
197 FILE CHEMICAL ABSTRACTS - CAPLUS (ke dni 6.5.98: 186)
191 FILE BIOSIS Previews (182)
179 FILE SCISEARCH (170)
154 FILE EXCERPTA MEDICA - EMBASE (143)
86 FILE MEDLINE (82)
83 FILE DERWENT DRUG FILE (82)
43 FILE LIFESCI (41)
```

z dalších například:

```
38 FILE INPADOC
19 FILE TOXLINE
15 FILE BIOBUSINESS
15 FILE NAPRALERT
12 FILE WPINDEX atd.
```

prioritou jsou vědeckotechnické a marketingové informace v oblasti chemie a farmacie.

Prvním krokem je zjištění, ve kterých bázích dat se epibatidin objevuje. Výsledkem dotazu byl následující přehled, uvádějící seznam bází dat, v nichž se epibatidin vyskytuje - v řazení podle frekvence záznamů. V rámci tohoto příspěvku není možné hodnotit subjektivní důležitost jednotlivých článků, která jinak z hlediska autorů nanejvýš významná. Přehled byl aktualizován dne 15. června 1998. V závorce je uveden počet záznamů ke dni zpracování 6. května 1998. Přírůstky ve všech databázích svědčí o skutečnosti, že vývoj epibatidinu a jeho derivátů pokračuje poměrně intenzivně (příklad 1).

Aspoň jednou se výraz „epibatidin“ objevil v 31 různých bázích dat v síti STN International.

Největší počet záznamů vykazuje báze dat CHEMICAL ABSTRACTS, a to ve verzi CAPLUS - největší bibliografická báze dat v oblasti chemie a příbuzných oborů, dále BIOSIS PREVIEWS - rozsáhlá báze dat v oblasti přírodních věd, SCISEARCH, zaměřená na citační analýzu prací v různých oborech vědy a techniky (tzv. Science Citation Index) a patrně nejrozsáhlejší báze dat v oblasti medicíny - EMBASE (Excerpta Medica). Další báze dat obsahují méně než polovinu záznamů ve srovnání s Chemical Abstracts - např. farmaceutická báze DERWENT DRUG FILE, další medicínská MEDLINE, a jiné báze dat z oblasti přírodních věd. LIFESCIENCE a desítky dalších uvedly ve svých záznamech alespoň jednou výraz epibatidin. Podrobná charakteristika všech uvedených a dalších bází dat STN International je uvedena v pravidelně aktualizovaném katalogu, který má k dispozici zástupce této sítě v České republice - firma Medistyl. Na výše jmenovaných sedm bází dat je zaměřeno naše následující srovnání.

Přehlednou informaci poskytuje též báze dat REGISTRY (Chemical Abstracts Service), jež uvádí kromě různých názvů (k vyhledávání lze použít výraz „epibatidin“) též přesný chemický název podle Chemical Abstracts a registrační číslo Chemical Abstracts (CAS RN).

Zadáním hesla epibatidin se dostáváme nejen k očekávanému záznamu o hledané látce, ale též k různým jeho derivátům.

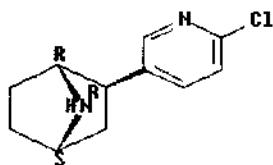
Příklad 2

IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, (1R-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, dihydrochloride, (1R-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, monohydrochloride, (1S-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(3-pyridinyl)-, (1R-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-7-ethyl-, exo-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(3-pyridinyl)-, (1S-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-methoxy-3-pyridinyl)-, (1R-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, monohydrochloride, (1R-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, exo-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-7-(phenylmethyl)-, exo-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, endo-(-)-
 IN 7-Azoniabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-7,7-dimethyl-, iodide,
 (1R-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, (1S-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 7-acetyl-2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, (1R-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, endo-(+)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 7-acetyl-2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, (1S-exo)-
 IN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, endo-

Příklad 3

L1 ANSWER 1 OF 1 REGISTRY COPYRIGHT 1998 ACS
 RN ***140111-52-0*** ZREGISTRY
 CN 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane, 2-(6-chloro-3-pyridinyl)-, (1R-exo)-
 (9CI) CA INDEX NAME)
 OTHER NAMES:
 CN (+)-Epibatidine
 CN (1R,2R,4S)-Epibatidine
 CN (1R-exo)-2-(6-Chloro-3-pyridinyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptane
 CN Alkaloid 208/210 from Dendrobates
 CN CMI 488
 CN Epibatidine
 FS STEREOSEARCH
 DR 163437-11-4, 152378-31-9
 MF C11 H13 Cl N2
 CI COM
 SR CA
 LC STN Files: AGRICOLA, BEILSTEIN*, BIOBUSINESS, BIOSIS, CA,
 CANCERLIT, CAPLUS, CASREACT, CEN, CHEMCATS, CHEMINFORMRX, CIN,
 CJACS, CSHEM, DDFU, DRUGU, DRUGUPDATES, EMBASE, IPA, MEDLINE,
 MRCK*, PHAR, PNI, PROMT, TOXLIN, TOXLIT, USPATFULL
 (*File contains numerically searchable property data)

Absolute stereochemistry.



77 REFERENCES IN FILE CA (1967 TO DATE)
 7 REFERENCES TO NON-SPECIFIC DERIVATIVES IN FILE CA
 79 REFERENCES IN FILE CAPLUS (1967 TO DATE)

tům. Kromě toho i vlastní epibatidin existuje kromě pravotočivé varianty též ve formě levotočivé nebo jako racemát. Výsledkem je tudíž 19 různých záznamů s devatenácti různými registračními čísly Chemical Abstracts. Na každý z nich se můžeme dále zaměřit samostatně.

V dalším textu jsou uvedeny pouze názvy, k dispozici je

však také strukturální a sumární vzorec a další informace (příklad 2).

Záznam z báze dat REGISTRY k základní pravotočivé formě (v seznamu uveden jako první) vypadá následujícím způsobem (příklad 3).

Z uvedeného záznamu se dovídáme, že registrační číslo

CAS hledané látky je 140111-52-0, že název látky je (1*R*-exo)-2-(6-chloro-3-pyridinyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptan a rovněž v kterých dalších databázích se látka objevuje. Současně se dovídáme dvě další registrační čísla, která byla dříve látce přidělena (CAS RN 163437-11-4 a 152378-31-9). Jedná se o čísla duplicitní a dodatečně zrušená (tzv. deleted numbers), avšak i pod nimi se v některých starších záznamech může epibatidin objevovat.

Uvedený záznam z REGISTRY se týká jedné konkrétní látky, popsané výše uvedeným CAS RN. Pokud vyhledáváme látku pomocí slova „epibatidin“, je počet záznamů větší, neboť takto zachytíme i různé deriváty a analogy epibatidinu. To je vysvětlením rozdílu 79 referencí o dané látce v CAPLUS, jež avizuje ve výše uvedeném záznamu báze dat REGISTRY a 197 záznamů o epibatidinu v bázi dat CAPLUS, které jsou uvedeny v předcházejícím přehledu.

Kromě typicky vědecko-technických bází dat je v záznamu REGISTRY uveden výskyt též v bázích obchodně-ekonomických a významné jsou též informace, zachycené v bázích dat patentových. To jsou oblasti, na které se ve své činnosti zaměřují autoři tohoto příspěvku prioritně, ale nikoli v tomto textu.

2. Srovnání databází vědeckotechnických informací

V dalším textu se zaměříme na srovnání vědeckotechnických bází dat CHEMICAL ABSTRACTS (CAPLUS), BIOSIS PREVIEWS, SCIENCE CITATION INDEX (SCISEARCH), EXCERPTA MEDICA (EMBASE), MEDLINE, DERWENT DRUG FILE a LIFESCIENCES. Jedná se o ukázkou existujících možností, k vyčerpávající analýze by bylo nutno srovnávat ještě další báze dat.

CHEMICAL ABSTRACTS (CAPLUS) – producentem Chemical Abstracts Service, USA, retrospektiva od roku 1967 (ve zkrácené verzi a s omezenými možnostmi vyhledávání online až od roku 1907), velmi široké pojetí chemických, biochemických a „příbuzných“ oborů.

BIOSIS PREVIEWS – producentem je společnost BIOSIS, USA, retrospektiva od roku 1969 (11 milionů záznamů), oblast přírodních věd,

SCISEARCH – producentem Institute for Scientific Information, USA, retrospektiva od roku 1974 (17 milionů záznamů), multidisciplinární vědecká báze dat,

EMBASE – producentem Elsevier Science, B.V., Nizozemsko, retrospektiva od roku 1974 (7,5 milionů záznamů), všechny obory medicíny a farmacie,

MEDLINE – producentem U.S. National Library of Medicine, USA, retrospektiva od roku 1966 (10 milionů záznamů), všechny obory medicíny a farmacie,

DERWENT DRUG FILE – producentem Der-

went Information Ltd., Velká Británie, retrospektiva od roku 1983 (téměř 1 milion záznamů), všechny aspekty farmacie,

LIFESCIENCES – producentem jsou Cambridge Scientific Abstracts, USA, retrospektiva od roku 1978 (téměř 2 miliony záznamů), oblast přírodních věd.

Podrobnější informace k jednotlivým uvedeným a dalším bázím dat v síti STN International jsou k dispozici též na internetu na těchto adresách:

- www.medistyl.cz
- www.fiz-karlsruhe.de
- www.cas.org
- www.jicst.go.jp

Celkový počet záznamů a nabízená retrospektiva je pouze jedním z parametrů při výběru vhodných bází dat. Na další aspekty se zaměříme v dalším textu.

a) Hodnocení bází dat podle počtu záznamů

Celkem bylo v sedmi sledovaných databázích nalezeno 317 různých záznamů, v nichž se alespoň jednou objevilo slovo „epibatidin“. Je samozřejmě možno polemizovat o účelnosti, resp. nutnosti zachycení všech záznamů, neboť čím větší počet záznamů máme, tím větší je pravděpodobnost multiplicity nalezených informací. Na druhou stranu je možné tvrdit, že určitá multiplicita je účelná, pokud se určitým způsobem doplňuje mozaika získaných informací. Zároveň platí, že výskyt hledané informace v neočekávaných zdrojích a souvislostech může mít někdy zcela zásadní význam.

Absolutně největší počet záznamů o epibatidinu (ke dni zpracování celkem 197, tj. 62 % z celkového počtu) přináší největší chemická báze dat na světě – CHEMICAL ABSTRACTS ve verzi CAPLUS, z toho 110 uvádí epibatidin přímo v titulu. Vysoký počet záznamů o epibatidinu s použitím stejného zadání vykazala v době zpracování rešerše rovněž báze dat BIOSIS PREVIEWS – celkem 191 (60 %), z toho plných 116 uvádí výraz epibatidin v názvu (a to je více 1 ve srovnání s CA Plus!)

Třetí co do počtu záznamů je báze SCISEARCH (Science Citation Index), uvádějící kromě úplné bibliografie a abstraktu též všechny citace, které jsou v dané práci uvedeny. Z celkového počtu 179 záznamů (56 %) uvádí epibatidin v názvu 96.

Jen o málo menší počet záznamů o epibatidinu zařadila medicínská báze dat EMBASE. U ostatních sledovaných databází byl již počet záznamů výrazně nižší (příklad 4).

b) Hodnocení bází dat podle počtu sledovaných časopisů

S celkovým počtem záznamů souvisí úzce hodnocení podle počtu zpracovaných časopisů. Odkazy na 317 různých prací o epibatidinu v sedmi vybraných databázích se vyskytují celkem v 95 různých titulech časopisů. Největší počet z nich zahrnuje CAPLUS, EMBASE a SCISEARCH (příklad 5).

Příklad 4

CAPLUS	-	197
BIOSIS	-	191
SCISEARCH	-	179
EMBASE	-	154
MEDLINE	-	86
DERWENT DRUG FILE	-	83
LIFESCIENCES	-	43

Příklad 5

CAPLUS	-	61
EMBASE	-	57
SCISEARCH	-	55
BIOSIS	-	47
DERWENT DRUG FILE	-	32
MEDLINE	-	30
LIFESCIENCES	-	19

Příklad 6

Society for Neuroscience Abstracts	- 42
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	- 22
Tetrahedron Letters	- 21
Medicinal Chemistry Research	- 13
Neuropharmacology	- 12
Molecular Pharmacology	- 10

Příklad 7

CAPLUS	- 23
SCISEARCH	- 23
BIOSIS	- 20
EMBASE	- 20
MEDLINE	- 14
DERWENT DRUG FILE	- 14
LIFESCIENCES	- 10

Příklad 8

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics
Molecular Pharmacology
European Journal of Pharmacology
British Journal of Pharmacology
Journal of Medicinal Chemistry
Brain Research

Příklad 9

SCISEARCH	1	2	1	1	3	1	celkem bodů:	9
CAPLUS	2	1	2	3	3	1	celkem bodů:	12
EMBASE	5	2	3	3	1	1	celkem bodů:	15
BIOSIS	3	4	3	1	5	1	celkem bodů:	17
MEDLINE	3	4	3	3	5	1	celkem bodů:	19
DERWENT DRUG FILE	6	7	6	3	1	2	celkem bodů:	24
LIFESCIENCES	6	6	7	7	7	1	celkem bodů:	34

Ve 27 titulech časopisů z celkového počtu 95 se objevil epibatidin nejméně třikrát. V následující tabulce je uveden přehled časopisů, v nichž byla hledaná látka zmíněna nejméně desetkrát (příklad 6).

Pokud výše zmíněných 27 časopisů považujeme z hlediska epibatidinu za základní, pak má smysl hodnotit, jak jsou zpracovány ve sledovaných databázích (příklad 7).

V rešerši z CAPLUS chybí např. záznamy ze Society for Neuroscience Abstracts a FASEB Journal, v BIOSIS chybí Medicinal Chemistry Research atd. Větší rezervy z tohoto hlediska vykazují medicínské báze dat EMBASE a MEDLINE, u nichž chybí záznamy ze tří z pěti nejcitovanějších časopisů na dané téma (v případě EMBASE Society for Neuroscience Abstracts, Medicinal Chemistry Research a Neuropharmacology, v případě MEDLINE chybí Society for Neuroscience Abstracts, Tetrahedron Letters a Medicinal Chemistry Research).

Interpretace těchto výsledků ovšem může být různá. V konkrétních případech může být např. výhodou báze dat EMBASE, že zahrnuje větší počet časopisů (57), z nichž řada není zachycena v jiných bázích dat a může (ale nemusí) se jednat o informace unikátní.

Přehled časopisů, které jsou v rešerši na epibatidin zachyceny ve všech sledovaných bázích, dat (příklad 8).

Analýza potvrzuje široký tematický záběr databází SCISEARCH a CAPLUS. Zatímco Scisearch je deklarována jako multioborová, v případě CAPLUS je hlavním zaměřením chemie. Jak je však patrné z uvedeného příkladu, zpracovává tato databáze též široký okruh medicínských a farmakologických časopisů (všech šest výše uvedených a desítky dalších).

Naopak MEDLINE nezahrnuje do zpracování časopisy zaměřené na oblast chemie, resp. na rozhraní chemie a medicíny. Proto v bázi Medline chybí záznamy např. z časopisu Medicinal Chemistry Research, Journal of Organic Chemistry, Journal of the Chemical Society a dalších.

V případě rešerše na epibatidin má tato nevýhoda zásadní význam, neboť první publikace o této látce byla uveřejněna v časopise Journal of American Chemical Society v roce 1992 a druhá publikace následovala až téměř o rok později!

c) Hodnocení bází dat podle výtěžnosti zpracovaných časopisů

V předcházející části bylo uvedeno šest časopisů, jejichž citace byly nalezeny ve všech sledovaných bázích dat. Počet záznamů z těchto časopisů v jednotlivých bázích se však liší.

Mezi nejdůležitější informační zdroje o epibatidinu patří časopis Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Rešerše na epibatidin přináší odkazy na tento titul ve všech sedmi sledovaných bázích dat. Nejvíce záznamů z něj přináší SCISEARCH - celkem 22, CAPLUS - 21, BIOSIS PREVIEWS a MEDLINE 19, EMBASE 18, DERWENT DRUG FILE a LIFESCIENCES 11. V případě dalších časopisů je pořadí obdobné, pouze Embase má ve všech ostatních případech „medailové“ umístění mezi sledovanými bázemi dat. U čtyřech ze šesti sledovaných titulů časopisů vykazuje největší počet zpracovaných záznamů o epibatidinu právě SCISEARCH.

Pokud označíme pořadí bází dat podle počtu záznamů z šesti sledovaných časopisů (a výsledky sečteme), dostáváme následující pořadí (příklad 9).

I když lze někdy polemizovat o účelnosti zpracování každého (i méně významného) článku, obecně platí, že někdy i na první pohled nenápadná nebo ze subjektivního hlediska nevýznamná informace může mít pro uživatele informaci velkého významu. Proto považujeme i stupeň vytěžení zpracovávaných časopisů za důležitou veličinu.

Výběr menšího počtu dokumentů z téhož zdroje (např. u báze dat MEDLINE) je jednou z příčin menšího celkového počtu záznamů.

Tabulka I
Počet záznamů o epibatidinu v období 1992–1998

Databáze	Počet záznamů v roce						
	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
SCISEARCH	1	9	21	25	39	50	34+
CAPLUS	1	9	30	34	41	49	33+
EMBASE	1	9	17	26	33	44	24+
BIOSIS	1	8	21	37	46	60	18+
MEDLINE	0	3	7	15	15	28	18+
DERWENT DRUG FILE	1	7	13	14	18	22	8+
LIFESCIENCES	0	1	6	11	11	12	2+

Tabulka II
Ceny platné od 1.1.1999

Databáze	Cena v DM		
	1 hodinu připojení	jeden záznam	1 vyhledávací termín
MEDLINE	51	0,29	0
BIOSIS PREVIEWS	102	2,71	0
CAPLUS	51	3,58	2,05
DERWENT DRUG FILE	115	2,29	0
EMBASE	141	2,80	0
LIFESCI	136	2,80	0
SCISEARCH	178	4,83	0

Jednou z příčin menšího počtu dokumentů z určitého zdroje může (ale nemusí) být pomalejší zpracování u některýchází dat Proto se v dalším kroku zaměřujeme na operativnost.

d) Hodnoceníází dat podle operativnosti

V tabulce I je uveden počet záznamů o epibatidinu ve sledovaných databázích podle jednotlivých let.

Z přehledu vyplývá, že nejvíce nejnovějších záznamů (tj publikovaných v roce 1998 a zařazených nejpozději do 15 června 1998) má SCISEARCH (ke dni zpracování 34), CAPLUS (ke dni zpracování 33) a EMBASE (24). Menší počet - 18 mají na svém kontě MEDLINE (což v podstatě odpovídá poměru celkového počtu záznamů) a také BIOSIS. V případě této báze dat je ovšem počet záznamů v dřívějších letech velmi vysoký a menší počet záznamů prací, uveřejněných v roce 1998 může být následkem méně operativního zpracování záznamů v případě BIOSIS Previews

Z tabulky I vyplývá i další skutečnost, významná z hlediska operativnosti, a to kdy se v které databázi objevil první záznam o epibatidinu. Jak již bylo výše uvedeno, v případě MEDLINE jde o jednorozhodně zpoždění, neboť nezpracovává na rozdíl od dalšíchází dat časopis Journal of American Chemical Society

S rostoucím počtem záznamů se pravidelně zvyšuje i multiplicita informací, tj že stejná informace je publikována ve více zdrojích, např. časopisech. Určitá multiplicita je však

účelná, jednotlivé časopisy mohou zpracovat danou informací různě, tj mohou dávat důraz na rozličné aspekty a tím se postupně skládá informační mozaika na hledané téma. Rovněž zpracování těžké publikace v jednotlivých bázích dat může být poněkud subjektivní - z hlediska zaměření té které báze dat i jednotlivého zpracovatele. Jestliže se však jedná o první informace o dané látce, o daném postupu apod, pak je zásadní rozdíl, zda máme k dispozici deset záznamů nebo tři - což hovoří v neprospěch báze MEDLINE v letech 1992–1993.

e) Hodnoceníází dat podle ceny

Důležitým parametrem při výběru používanýchází dat je nepochybně jejich cena. V tabulce II jsou uvedeny ceny sledovaných databází v databázové síti STN International. Jedná se především o cenu za dobu připojení k dané databázi (tzv. connect time), přičemž je nutno si uvědomit, že v případě předem dobře připravených dotazů je za 10-20 minut možno udělat spoustu dobré práce a dale o cenu za jeden záznam v úplném tvaru, jak ho jednotlivé báze dat nabízejí. Vzhledem k tomu, že se v případě sledovanýchází dat jedná o typické bibliografické soubory, nedávají k dispozici plný text původního pramene, ale kompletní citaci a abstrakt. V případě rešerší z Chemical Abstracts, resp. CAPLUS je nutno započítat ještě poplatek za každý vyhledávací termín (tzv. search term). V tabulce II jsou uvedeny ceny platné od 1.1.1999

Vzájemný poměr mezi cenou rešerše v jednotlivých databázích je závislý na počtu vyhledaných záznamů a v případě CAPLUS též na složitosti zadání. Tyto dvě položky mohou v případě srovnání BIOSIS/CAPLUS zvrátit bilanci v neprospěch CAPLUS, přestože základní cena za dobu připojení je v případě CAPLUS velmi nízká

Každopádně nejnižší cenu má báze MEDLINE, která je silně dotována „z kapes amerických daňových poplatníků“. To se projevuje i na nízké ceně báze MEDLINE, resp. jejich tematických derivátů, dostupných na optických discích CD-ROM. V poslední době je navíc MEDLINE k dispozici na Internetu. V tomto případě platíme „pouze svým časem“, ovšem na paměti je nutno mít omezené vyhledávací možnosti.

V přecházejících částech byla uváděna fakta spíše v neprospěch báze dat MEDLINE. Pokud ovšem je hlavním problémem uživatele informací nedostatek finančních prostředků, je volba této báze dat zcela přirozená. Měl by si však

uvědomit, že při výhradní orientaci na bázi dat MEDLINE nemá k dispozici zdaleka všechny dostupné informace

V případě využívání báze dat MEDLINE (ale též např. CHEMICAL ABSTRACTS) na CD-ROM je dále nutno uvažovat dostupnou retrospektivu, tj jaké časové období je uživateli k dispozici (ve srovnání se záběrem od roku 1967 v případě online).

f) Hodnocení bázi dat podle typu sledovaných dokumentů

Časopisy jsou důležitým, ale nikoli jediným zdrojem vědeckotechnických informací.

Výhodou CHEMICAL ABSTRACTS, resp. CAPLUS je velký rozsah zpracování nečasopisové literatury. Podíl časopisů činí v této bázi dat 74 % z celkového rozsahu 16 % tvoří patenty (1 v případě epibatidinu bylo v CAPLUS několik patentů zachyceno), 5 % sborníky z konferencí, ostatní záznamy jsou o technických aj zprávách, disertacích, knihách, ale převážně jen amerického původu

V případě zájmu o patentové dokumenty lze však doporučit orientaci na specializované báze dat, především DERWENT WORLD PATENTS INDEX.

V bázi MEDLINE tvoří více než 95 % objemu záznamy z odborných časopisů, zprávy z konferencí jsou uvedeny jen v malém množství. Patenty zařazovány nejsou. Podobný záběr mají i ostatní sledované báze dat.

g) Hodnocení bázi dat podle vypovídací schopnosti a vyhledávacích možností

Toto hodnocení vyžaduje rozsáhlejší rozbor (srovnání vypovídací schopnosti titulů, abstraktu, ukázkového, tzv freeformátu a rozsahu a struktury deskriptorové části)

Všeobecně je možno říci, že abstrakty, jako hlavní obsahová část záznamů, jsou ve všech výše sledovaných bázích dat obdobné, většinou dokonce do slova a do písmene stejné. Upozornit je nutno i na skutečnost, že v případě bázi Chemical Abstracts je záznam včetně abstraktu uveden pouze v jediném databázovém centru, a to - STN International, která nabízí různé varianty báze dat Chemical Abstracts

Rozdíly mezi sledovanými bázemi dat jsou ovšem v vyhledávacích možnostech a deskriptorovém slovníku jednotlivých bází dat. Takový rozbor ovšem přesahuje rámec tohoto příspěvku.

3. Závěr

Cílem tohoto příspěvku bylo porovnání několika bibliografických bází, přinášejících vědeckotechnické informace z oblasti farmacie. Při použití různých hledisek se projevují různé výhody jednotlivých bází dat. Při zpracování rešerše na konkrétní látku či postup je zpravidla vhodné kombinovat využití většího počtu databází a s jejich pomocí postupně skládat „informační mozaiku“.

Výhodou báze CHEMICAL ABSTRACTS, resp. CAPLUS je velká retrospektiva (více než 30 let), rozsah zpracovávaných časopisů, a to včetně titulů medicínského a farmaceutického zaměření a podrobně rozpracovaná chemická podstata problému. Vzhledem k tomu, že i výtěžnost zpracovávaných časopisů a operativnost je poměrně vysoká, je vý-

sledkem velký počet záznamů. Další výhodou může být skutečnost, že kromě časopisů zpracovává velký počet dalších zdrojů, např. patentů, sborníků z konferencí, disertací aj. Ani cena by neměla být zásadním problémem. Prioritní zaměření může být v konkrétním případě výhodou, ale též nevýhodou, pokud podstata hledaného problému není chemická, např. v případě konkrétních terapeutických aspektů

Výhodou báze SCISEARCH je široký tematický záběr, vysoká výtěžnost zpracovávaných časopisů, vysoká operativnost zpracování a vysoká vypovídací schopnost záznamů, včetně uvedení citovaných prací. Nevýhodou může být vyšší cena

Výhodou báze dat EMBASE je bohatě rozpracovaný deskriptorový aparát z hlediska medicíny a velký výběr sledovaných časopisů (výhodou může být i více evropské zaměření). Přitom retrospektiva i stupeň výtěžnosti zpracovávaných časopisů jsou dobré, jakož i operativnost. Cena je nižší než v případě SCISEARCH, ale stále ještě poměrně vysoká

Výhodou báze MEDLINE je především velmi nízká cena, rovněž bohatě rozpracovaný deskriptorový aparát a retrospektiva více než 30 let.

Nevýhodou je menší množství sledovaných časopisů a dalších informačních zdrojů.

Výhodou báze BIOSIS PREVIEWS je velký celkový počet záznamů, velká retrospektiva a rovněž cena je velmi přijatelná.

Pro konkrétní případy může být účelné zpracování rešerší též v bázích dat DERWENT DRUG FILE a LIFESCIENCES. Při kombinaci většího počtu bází dat je možné odstranit duplicitu.

Četnost využívání jednotlivých databází v dané organizaci je měřítkem, zda je ekonomicky výhodnější využívat báze dat, vystavene ve světových databázových sítích (online) nebo na optických discích CD-ROM. Výhodou online přistupuje platba za konkrétní vyhledané informace, velká retrospektiva, průběžná aktualizace a především možnost operativní kombinace rešerší z různých databází vědeckotechnických, patentových (zvláště DERWENT WORLD PATENTS INDEX), marketingových (např. PREDICASTS OVERVIEW OF MARKETS AND TECHNOLOGY, DRUGUPDATES, PHARMAPROJECTS, PHARMACEUTICAL NEWS INDEX aj.), toxikologických (např. REGISTER OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES) a jiných podle okamžité potřeby.

Důležitost kombinování různých informačních zdrojů platí všeobecně. V tomto případě „vítězí“ Chemical Abstracts, ale stejně jako v případě jednostranné orientace třeba na Medline, byla by problematická i výhradní orientace na Chemical Abstracts například v případě sledování patentů

To však již překračuje rozsah tohoto příspěvku

**J. Horký and B. Boček (MEDISTYL Comp., Prague):
Most Medals to Chemical Abstracts This Time (a comparison of selected databases on an example of literature search of pharmaceutical Epibatidin)**

The aim of the contribution is a comparison of several bibliographic databases providing scientific and technical information from the field of pharmacy. Using different viewpoints, various advantages of databases are shown. In searching for a specific substance or process, it is always appropriate to combine exploitation of a number of databases using them to make an information mosaic.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VISKOZITA SUSPENZÍ

JAROSLAV NÝVL

*Ustav anorganické chemie, Akademie věd České republiky,
250 68 Řež u Prahy*

Došlo dne 13 IV. 1999

Klíčová slova. viskozita, suspenze, dusičnan vápenatý

Úvod

Z technické praxe je známo, že viskozita kapalin je významně ovlivňována přítomností tuhé fáze. Při tom velmi záleží na koncentraci suspenze. Zatímco ve zředěných suspenzích probíhá míchání v režimu hydraulického toku a viskozita narůstá s koncentrací tuhé fáze poměrně pozvolna, v oblasti koncentrovaných suspenzí přechází na tok plastický a zdánlivá viskozita narůstá velmi strmě. Přejít mezi oběma oblastmi závisí na velikosti a tvaru tuhých částic a na hustotě kapaliny i tuhé fáze, ale obecně lze pozorovat^{1,2}, že ke zlomu dochází při hodnotách poměru hmotností tuhé a kapalné fáze s/l v rozmezí 0,45 až 1,0.

Při výrobě kombinovaných hnojiv se přírodní fosfát rozkládá kyselinou dusičnou, při čemž vzniká roztok obsahující jako hlavní složky dusičnan vápenatý, kyselinu fosforečnou a přebytek kyseliny dusičné. Ochlazením tohoto roztoku na teploty blízké k 0°C dojde k vyloučení převážně části tetrahydrátu dusičnanu vápenatého (THDV) a ložtek získaný jeho separací se potom používá v dalším technologickém stupni. Míchatelnost suspenze THDV závisí na hodnotě s/l a tedy na teplotě vymražení.

Cílem této práce je odvození vztahů pro popis zdanlivé viskozity suspenze v oblasti hydraulického a plastického toku a ověření platnosti těchto vztahů na datech o viskozitě suspenzí THDV v roztocích získaných rozkladem fosfátu kyselinou dusičnou.

Teoretická část

Pro viskozitu suspenzí v oblasti nízkých koncentrací je uváděn³ Einsteinův vztah

$$\eta = \eta_0(1 + 2,5\varphi) \quad (1)$$

ktej vyhovuje lépe v modifikovaném tvaru⁴

$$\eta = \eta_0(1 + 4,5\varphi) \quad (2)$$

V těchto vztazích značí η a η_0 zdánlivou dynamickou viskozitu suspenze (dále jen viskozita) a dynamickou visko-

zitu čirého roztoku (mPa.s) a φ objemový zlomek tuhé fáze v systému

$$\varphi = \frac{V_2}{V_2 + V_1} = \frac{\frac{s}{\rho_s}}{\frac{s}{\rho_s} + \frac{l}{\rho_l}} = \frac{S}{S+R} \quad (3)$$

kde $S = s/l$ je hmotový poměr hmotností tuhé a kapalné fáze a $R = \rho_l/\rho_s$ je poměr hustot tuhé fáze a kapaliny. Obdobně můžeme pro maximální koncentraci suspenze psát

$$\varphi_{\max} = \frac{S_{\max}}{R + S_{\max}} \quad (4)$$

a odtud

$$S_{\max} = R \frac{\varphi_{\max}}{1 - \varphi_{\max}} \quad (5)$$

Pro těsně uložené kulovité částice je $\varphi_{\max} = 0,6$ a tedy platí

$$S_{\max} = 1,5 R \quad (6)$$

Dále lze odvodit vztah

$$\frac{\varphi}{\varphi_{\max}} = \frac{S}{3S + R} \quad (7)$$

Pro zředěné suspenze lze upravit modifikovanou Einsteiнову rovnici (2) na tvar

$$\eta = \eta_0(1 + 4,5\varphi) = \eta_0 \frac{R + 5,5S}{R + S} \quad (8)$$

uvedený již v dřívějších pracích^{1,2,4}

Pro koncentrované suspenze platí Frankelova-Acnvosova rovnice⁵

$$\eta = \frac{9}{8} \left(\frac{\varphi / \varphi_{\max}}{1 - \varphi / \varphi_{\max}} \right)^{1/3} = \frac{9}{8} \eta_0 \left(\frac{\frac{5}{3}S}{R - \frac{2}{3}S} \right)^3 \quad (9)$$

Protože tato rovnice platí až v oblasti plastického toku, tj při vyšších hodnotách S , je vhodné ji upravit na obecnější tvar

$$\eta = \frac{9}{8} \eta_+ \left(\frac{aS}{R + (-a)S} \right)^3 \quad (10)$$

kde η je zdánlivá viskozita suspenze na přechodu mezi oblastmi režimu toku. Pro hmotnost krystalů vyloučených z roztoku při jeho ochlazení platí⁶

$$s = m_0 \frac{w_0 - w_f}{w_0 + 1} \quad (11)$$

Zbývající hmotnost roztoku tedy je

$$l = nu - s = m_0 \left[1 - \frac{w_0 - w_f}{w_0 + 1} \right] = m_0 \frac{w_f + 1}{w_0 + 1} \quad (12)$$

a tedy

$$S = \frac{s}{l} = \frac{w_0 - w_f}{w_f + 1} \quad (13)$$

Rozpustnost w (kg hydrátu/kg volné vody) lze vypočítat ze vztahů

$$\log x = A + B/T + C \log T \quad (14)$$

a

$$w = \frac{x M_{\text{hyd}}}{M_0 - x(M_0 - M_{\text{anh}} + M_{\text{hyd}})} \quad (15)$$

Konstanty rovnice (14) lze pro velké množství roztoků anorganických látek ve vodě nalézt v tabulkách⁷.

Pokusná část

V dřívější práci² jsou uvedena experimentální data o zdánlivé viskozitě suspenzí THDV v roztocích získaných rozkladem apatitu kyselinou dusičnou o koncentraci 55 % v 5%ním stechiometrickém přebytku. Údaje odečtené z publikovaného grafu jsou:

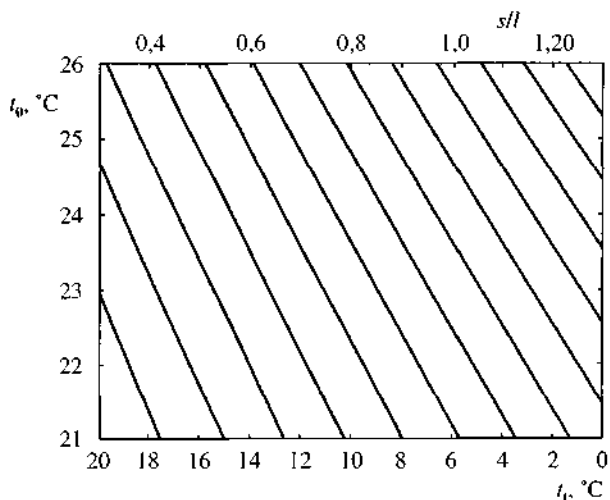
s/l	0	0,455	0,794	1,07	1,29	1,63
η [mPa.s]	40	90	110	150	325	600

Měření byla provedena na viskozimetru s rotujícím válcem.

Rozpustnost THDV v odpovídajících roztocích^{2,8} byla korelována pomocí vztahů (14) a (15) s konstantami $A = 25,86602$, $B = -1759,825$, $C = -8,420321$ a výsledné hodnoty jsou následující:

t [°C]	-10	-5	0	5	10
w	1,2066	1,4648	1,7814	2,1747	2,6717

t [°C]	15	20	25	30	35
w	3,3142	4,1697	5,3564	7,0995	9,8900



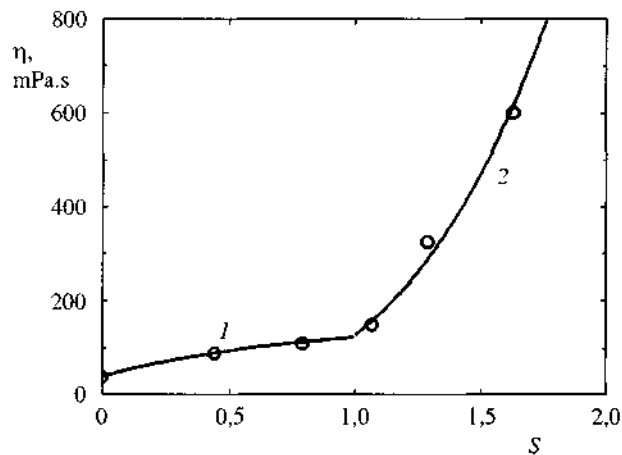
Obr. 1. Poměr hmotností tuhé a kapalné fáze v systému THDV jako funkce výchozí (t_0) a konečné teploty (t_f)

Pomocí vztahu (13) pak byly pro různé výchozí a konečné teploty vypočteny hodnoty $S = s/l$, uvedené na obr. 1.

Zdánlivou viskozitu suspenze v oblasti nízkých koncentrací lze vypočítat z rovnice (8). Pro hustotu krystalů $\rho_c = 1720 \text{ kg.m}^{-3}$ a hustotu kapaliny $\rho_l = 1500 \text{ kg.m}^{-3}$ dostáváme $R = 1,15$ a pro hodnoty ϕ vypočtené ze vztahu (3) pak můžeme vypočítat zdánlivou viskozitu suspenze jako funkci poměru hmotnosti koexistujících fází S . Jako mezní hodnota oblasti hydraulického toku je v práci² uvedeno $S = s/l \approx 1,0$, čemuž podle vztahu (2) odpovídá v daném případě zdánlivá viskozita $\eta = \eta_+ \approx 120 \text{ mPa.s}$. Po dosažení této hodnoty do rovnice (10) můžeme z experimentálních dat vyhodnotit konstantu $a = 1,064$ a z rovnice pak vypočítat závislost zdánlivé viskozity koncentrované suspenze jako funkci S .

Diskuse výsledků

Experimentálně stanovené hodnoty zdánlivé viskozity suspenzí THDV v rozkladném roztoku jsou vyneseny na obr. 2.



Obr. 2. Zdánlivá dynamická viskozita suspenze THDV jako funkce poměru hmotností tuhé a kapalné fáze ($S = s/l$); 1 - oblast řídkých suspenzí, rov. (8), 2 - oblast koncentrovaných suspenzí, rov. (10)

Těmito body jsou pak proloženy křivky vypočtené z rovnice (8) pro oblast zředěných suspenzí (t_j pro oblast hydraulického toku) a z rovnice (70) pro oblast koncentrovaných suspenzí (t_j pro oblast plastického toku). Z obr. 2 je patrné, že navržené vztahy vystihují experimentální data s uspokojivou přesností a tak umožňují pro daný systém stanovení maximálně přípustného stupně vymrazení a volbu typu a výpočet vhodného míchadla.

Seznam symbolů

A	konstanta v rovnici (14)
a	konstanta v rovnici (70)
B, C	konstanty v rovnici (14)
l	hmotnost kapalné fáze, kg
M_{anh}	molekulová hmotnost bezvodé látky, kg kmol^{-1}
M_{hyd}	molekulová hmotnost hydrátu, kg kmol^{-1}
M_0	molekulová hmotnost vody, kg kmol^{-1}
m_0	hmotnost vchozího roztoku, kg
R	podíl hustot tuhé a kapalné fáze
S	podíl hmotnosti tuhé a kapalné fáze
S_{max}	podíl hmotnosti tuhé a kapalné fáze na přechodu režimu toků
s	hmotnost tuhé fáze, kg
T	teplota, K
t	teplota, $^{\circ}\text{C}$
V_l	objem kapalné fáze, m^3
V_s	objem tuhé fáze, m^3
w	koncentrace, kg hydrátu/kg volného rozpouštědla
w_0	vychozí koncentrace roztoku, kg hydrátu/kg volného rozpouštědla
w_f	konečná koncentrace roztoku, kg hydrátu/kg volného rozpouštědla
x	molekulový zlomek rozpustené látky
η	zdanlivá dynamická viskozita suspenze, mPa s
η_0	dynamická viskozita roztoku, mPa s
η_+	zdanlivá dynamická viskozita suspenze na přechodu mezi oblastmi režimů toku, mPa s

φ	objemový zlomek tuhé fáze v suspenzi
φ_{max}	objemový zlomek tuhé fáze v suspenzi o koncentraci na rozhraní režimů toku
ρ	hustota kapaliny, kg m^{-3}
ρ_s	hustota tuhé fáze, kg m^{-3}

Za podporu této práce děkuji Grantové agentuře České republiky grant č. 203/99/1222

LITERATURA

- 1 Nyvlt J *Kryštalizace z roztoků*, str. 38 SVTL, Bratislava 1967
- 2 Nyvlt J, Miček F, Haas K *Zh Prikl Khim* 35, 1424 (1962)
- 3 Mullin J W *Crystallization*, 3. vyd., str. 35 Butterworth-Heinemann, Oxford 1993
- 4 Nyvlt J *Chem Prum* 72, 440 (1962)
- 5 Frankel N A, Acrivos A *Chem Eng Sci* 22, 847 (1967)
- 6 Nyvlt J *Vypočty krystalizátorů*, str. 33 Academia, Praha 1991
- 7 Broul M, Nyvlt J, Sohnel O *Tabulky rozpustnosti anorganických látek ve vodě* Academia, Praha 1979
- 8 Nyvlt J *Chem Listy* 93, 32 (1999)

J. Nyvlt (*Institute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řez near Prague, Czech Republic*) **Viscosity of Suspensions**

Relations for calculation of apparent viscosity of suspensions valid up to high concentrations of the solid phase were derived. The relations were verified using data on viscosity of suspensions of calcium nitrate tetrahydrate in solutions obtained by decomposition of phosphates with nitric acid. The applicability of the derived relations was proved in the whole range of suspension concentrations. The obtained data are important both for assessment of the ability of suspensions to be stirred and for selection of a suitable stirrer type.

RESPIROMETRICKÉ SLEDOVÁNÍ INHIBIČNÍCH VLIVŮ XENOBIOTIK NA AEROBNÍ RESPIRACI MIKROORGANISMŮ AKTIVOVANÉHO KALU

SVATAVA VAŇKOVÁ, IVETA ŘEZNIČKOVÁ
a JAROMÍR HOFFMANN*

Katedra technologie životního prostředí a chemie, VUT Brno, Fakulta technologická ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, e-mail Hoffmann@Zhn.vutbr.cz

Došlo dne 16. V 1999

Klíčová slova. inhibice, respirace, fenol, syntan, mikroorganismy

Úvod

Stále se zvyšující počet průmyslových polutantů kontaminujících životní prostředí si v posledních letech vynutil rozvoj screeningových testů, jejichž úkolem je rychlé posouzení potenciálních toxických účinků těchto látek na živé organismy. Při testování inhibičních účinků polutantů na čistírenský aktivovaný kal, tedy směsnou mikrobiální kulturu, jsou často využívány respirometrické metody. V této práci byly při sledování inhibičních účinků fenolických látek (fenolu a dvou syntetických třísliv tzv. syntanů) na respirační aktivitu aktivovaného kalu aplikovány dvě respirometrické metody. 1) stanovení inhibice respirační aktivity podle ISO 8192 (cit¹) (respirace měřena kyslíkovým článkem) a 2) manometrická metoda stanovení biochemické spotřeby kyslíku, modifikace standardního testu stanovení biologické rozložitelnosti^{2,3}. Kombinace obou postupů umožnila sledování inhibičních vlivů za velmi variabilních, nicméně poměrně přesně definovaných podmínek. Práce navázala na naše dřívější poznatky, týkající se průběhu inhibičních křivek a jejich matematického zpracování⁴ a aplikace zmíněných postupů při sledování inhibičních účinků soli chromu na aktivovaný kal⁵.

Testované syntany jsou používány v každodělném průmyslu k činění kůží. Tyto přípravky nahrazují v procesu činění dřívě používaná přírodní třísliva, která byla k prostředí podstatně šetrnější (lepší rozložitelnost, nižší toxicita). Z chemického hlediska jde o kondenzační produkty substituovaných aromatických sloučenin, hlavně fenolů. Inhibiční účinek syntanů na aktivitu aktivovaného kalu byl již některými autory nestandardními postupy (inhibice BSK₅, respirace, enzymatické aktivity) sledován^{6,8}.

Experimentální část

Modelové vzorky

Fenol, chemicky čistý, Lachema a.s. Brno; syntany vyrobené firmou Tanex a.s. Jaroměř s obchodním názvem Kortan:

Kortan FB - kondenzační produkt sulfonovaného 1-naftolu a fenolu s formaldehydem, neutralizovaný amoniakem, Kortan MX - speciální syntan pro výrobu měkkých usní, kondenzační produkt sulfomethylovaných fenolů s formaldehydem.

Biologický materiál

Aktivovaný kal byl odebrán z městské čistírny odpadních vod ve Zlíně-Malenovicích. V laboratoři byl kal filtrací zbaven hrubých nečistot, promyt pitnou vodou a udržován za aerobních podmínek; nejdéle do 48 h od odběru na čistírně byl použit k testu. Koncentrace suspendovaných látek (Cs) byla stanovena filtrací (2,5-3 μm) a sušením do konstantní hmotnosti při teplotě 105 °C.

Metody

Ke sledování inhibičních účinků zvolených xenobiotik na respirační aktivitu mikroorganismů přítomných v kalu byly použity dva postupy.

Postup 1

Procedura dle¹ ISO 8192 byla použita pro krátkou dobu expozice (zpravidla 1 h). Jako zdroj uhlíku, energie a minerálních látek bylo použito minerální medium (syntetická odpadní voda) podle⁹ OECD. Suspenze aktivovaného kalu o koncentraci přibližně 1000 mg.l⁻¹ suspendovaných látek byla v testovací baňce smíchána se syntetickou odpadní vodou (32 ml.l⁻¹) a s testovanou látkou o různých koncentracích (1-2000 mg.l⁻¹). Celkový objem směsi byl 0,5 l. Kontrolní pokus byl připraven analogicky, pouze bez přídavku testované látky. Jako testovací nádoby byly použity dělicí nálevky o objemu 1 ltr, do kterých byl zespodu stopkou přiváděn vzduch. Tímto způsobem byla suspenze mikroorganismů zásobována kyslíkem a dokonale promíchávána. Hodnota pH byla ve všech testech upravena na 7,3 ± 0,2. Po zvolené době kontaktu byla část směsi přenesena do respirační nádoby a stanovena respirační rychlost (oximetr WTW D1g1 610). Data byla v 10 vteřinových intervalech archivována počítačem po dobu cca 10 minut. Z naměřených hodnot byly pro každou koncentraci testované látky a pro kontrolní pokus vypočteny specifické respirační rychlosti *R* (mg h⁻¹.g⁻¹) a následně inhibice respirační rychlosti / (%) dle vztahu (7):

$$I = (R_k - R_t / R_k) \cdot 100 \quad (1)$$

kde *R_t*, resp. *R_k* jsou rychlosti spotřeby kyslíku v testech s proměnlivými koncentracemi testované látky, resp. v kontrolním pokusu (v mg.l⁻¹.h⁻¹).

Postup 2

Respirace kalu byla měřena v respirometru s manometrickou indikací spotřeby kyslíku (Bial BOD 10, DAK Sluovice). Přístroj umožňuje průběžné sledování biochemické spotřeby kyslíku (BSK). Základní částí přístroje je deset měřících jednotek, upevněných do pohyblivého roštu v temperované

* Zaslát veškerou korespondenci

vodní lázni. Každá měřicí jednotka je tvořena dvojicí baněk (měrné a kompenzační) o stejných objemech cca 150 ml. Baňky jsou opatřeny plastovými uzávěry s postranním tubusem a zavzdušňovacím ventilem. Postranní tubusy slouží k propojení párových baněk přes manometrickou U-trubicí. Do těsnicího kroužku plastového uzávěru je zasunuta skleněná zkumavka, opatřená v horní části několika otvory a obsahující roztok KOH pro absorpci vznikajícího CO_2 . Podrobnější popis je uveden v manuálu přístroje.

Pro možnost porovnání výsledků obou metod byly zachovány stejné kultivační podmínky jako u postupu 1 včetně složení minerálního media, pouze celkový objem směsi byl 10× menší (0,05 l). Měření probíhalo při teplotě $25 \pm 0,5$ °C. Z časových závislostí BSK byly pro zvolené časy t (doby expozice) odečteny hodnoty BSK a vypočteny inhibice / (%) analogicky jako shora (rovnice (1)); místo respiračních rychlostí byly ale dosaženy hodnoty BSK v čase t pro vlastní, resp. kontrolní pokusy (BSK_p , resp. BSK_k , v mg l^{-1}).

Analýza naměřených hodnot

Výsledky obou metod byly zpracovány postupem již uvedeným v práci⁴ k sestavení inhibičních křivek a k výpočtu hodnoty efektivní koncentrace (EC_{50}) byla použita rovnice distribuční funkce normálního rozdělení (2):

$$P(x) = \Phi(x - \mu) / \sigma \quad (2)$$

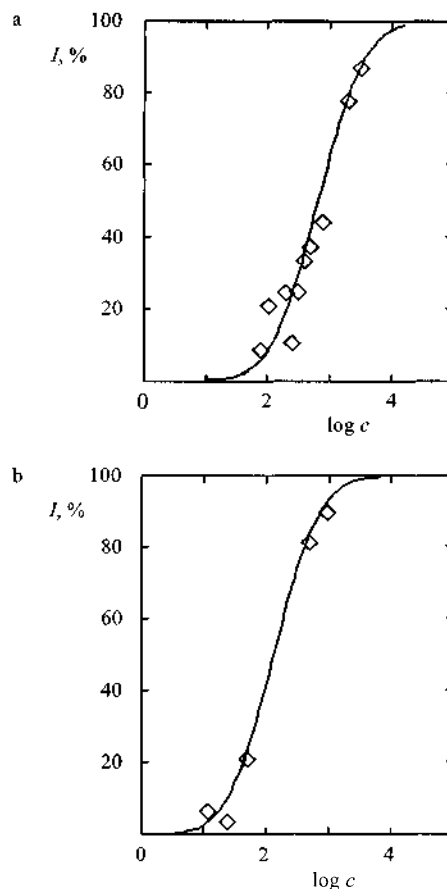
Φ - distribuční funkce standardního normálního rozdělení, x - logaritmus koncentrace testované látky, μ - střed normalního rozdělení, σ - standardní odchylka normalního rozdělení

Pro nalezení regresní křivky byla použita procedura nelineární regrese systému ADSTAT (TnloByte Statistical Software, Ltd.), který používá derivačních postupů pro minimální podmínky nejmenších čtverců pro nelineární regresní model. Takto byly získány hodnoty parametrů μ a σ spolu s 95 % intervaly spolehlivosti (IS). Odhad střední hodnoty μ společně s 95 % intervalem spolehlivosti představuje hledanou hodnotu EC_{50} a její limity.

Výsledky a jejich diskuse

Toxicita xenobiotik na čistírenský kal zjištěna v laboratorních podmínkách je významně ovlivňována experimentálními podmínkami použitých testů. Mezi nejzákladnější vlivy patří vedle druhového zastoupení mikroorganismů v případě směsných mikrobiálních kultur (aktivovaného kalu) doba a intenzita kontaktu mikroorganismů s testovanými látkami (doba expozice), teplota, kyslíkové poměry, přítomnost dalších látek atd. Případně irelevance v tomto směru řeší do jisté míry standardizace testů. V praxi je velmi často potřebná i opačná možnost, tj. změna těchto podmínek a sledování jejich vlivu na inhibiční působení. Typickým příkladem je doba expozice. Aplikace jednoho testu nemusí poskytovat potřebnou variabilitu, výhodná může být jejich kombinace.

Dále jsou popsány možnosti sledování inhibičních účinků fenolu a dvou syntanů na respirační aktivitu aktivovaného kalu pomocí dvou shora popsaných postupů. Pozornost byla zaměřena především na vliv doby expozice na inhibici, reprezentované hodnotami EC_{50} .



Obr. 1. Inhibice respirační rychlosti / fenolem (a) a Kortanem FB (b) (koncentrace c v mg l^{-1}) po hodinové expozici, postup 1

Inhibiční účinek po hodinové expozici

Směs aktivovaného kalu s testovanou látkou a syntetickou odpadní vodou byla v soulase s metodikou¹ ISO 8192 (postup 1) intenzivně míchána a provzdušňována. Po uplynutí jedné hodiny byla změřena respirační rychlost. Hodnoty inhibice / byly vypočteny podle rovnice (1), ke konstrukci inhibičních křivek a k výpočtu 1 h EC_{50} byla použita rovnice (2).

Řadou doplňkových testů (výsledky nejsou prezentovány) bylo zjištěno, že u fenolu a u Kortanu MX nastává za daných experimentálních podmínek prokazatelná inhibice teprve od koncentrace 100 mg l^{-1} , toxicitější Kortan FB inhiboval respiraci již od koncentrace 30 mg l^{-1} .

Příklady inhibičních křivek pro fenol a Kortan FB znázorňuje obr. 1. Z jejich průběhu je zřejmé, že heterogenní kultura aktivovaného kalu reaguje na toxickou látku obdobně jako populace jednoho biologického druhu.

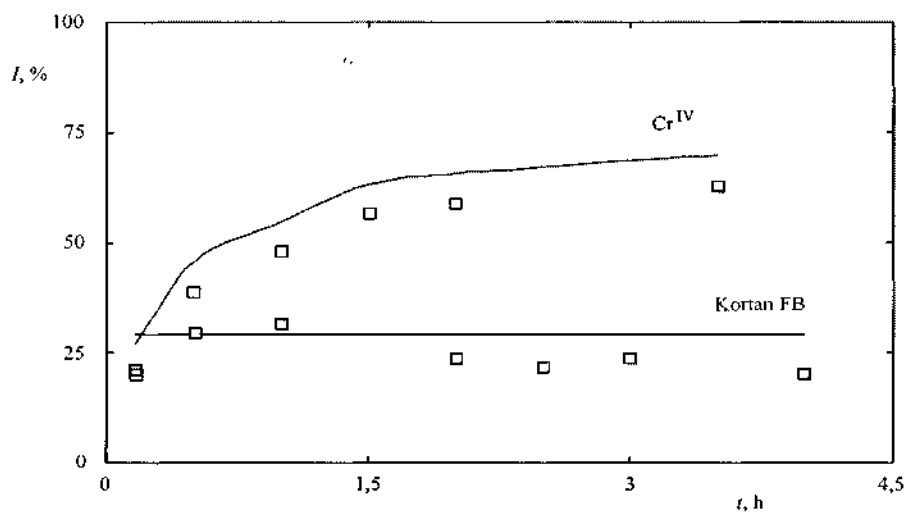
V tabulce I jsou uvedeny hodnoty EC_{50} s příslušnými 95 % IS pro fenol a oba syntany. Po jednohodinové době expozice byl určen inhibiční účinek sledovaných látek v pořadí Kortan FB > Kortan MX > fenol. V tabulce II jsou pro srovnání uvedeny publikované hodnoty EC_{50} pro fenol. Nalezené a publikované hodnoty respirometrických postupů přijatelně korespondují (řádově).

Tabulka I
Hodnoty 1 h EC_{50} pro fenol a syntany

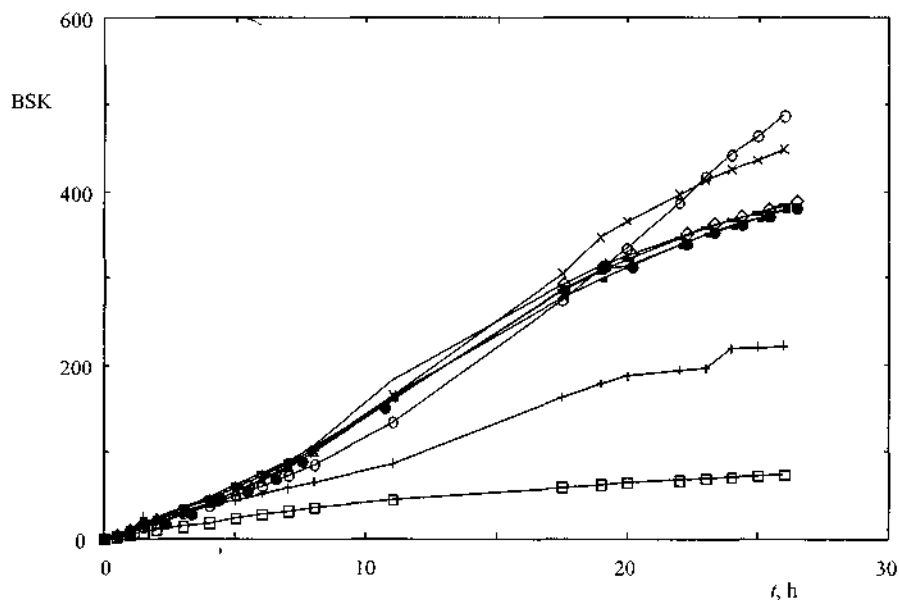
Testovaná látka	1h EC_{50} [$mg.l^{-1}$]	IS (95 %)
Fenol	655	518-830
Kortan MX	438	342-562
Kortan MX	201	77-522
Kortan FB	132	98-191
Kortan FB	153	97-241
Kortan FB	150	110-206

Tabulka II
Publikované hodnoty EC_{50} pro fenol

EC [$mg.l^{-1}$]	Expozice [h]	Test	Citace
>1000	4-6	růstový (městský AK)	10
880	4-6	růstový (průmyslový AK)	10
300	0,5	respirační	10
>100	0,25	dehydrogenasový	11
740	0,5	respirační	12
1000	3	respirační	12
1400	1	dehydrogenasový	12



Obr. 2. Inhibice respirační rychlosti / Kortanem FB a Cr^{VI} v závislosti na době expozice t ; postup 1



Obr. 3. Časový průběh BSK ($mg.g^{-1}$) při různých koncentracích fenolu; — kontrolní p., \diamond —2 $mg.l^{-1}$, \rightarrow —10 $mg.l^{-1}$, \triangle —20 $mg.l^{-1}$, \times —100 $mg.l^{-1}$, \ominus —200 $mg.l^{-1}$, \leftarrow —800 $mg.l^{-1}$, \square —2000 $mg.l^{-1}$, postup 2

Inhibiční efekt při krátkodobé (několikahodinové) expozici

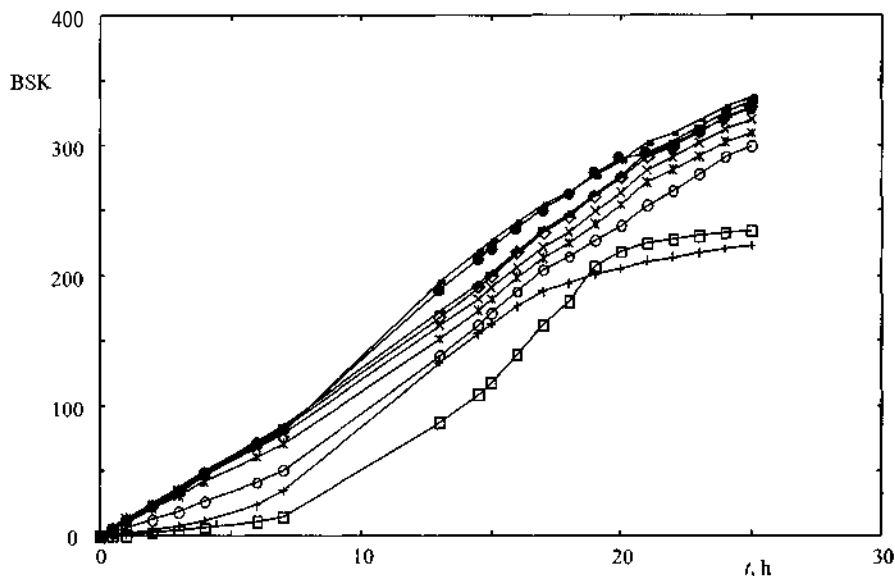
U Kortanu FB byl opět postupem 1 testován měnící se inhibiční účinek v závislosti na době expozice (obr. 2). Koncentrace syntanu byla 100 mg.l^{-1} , což přibližně odpovídá hodnotě EC_{50} pro tuto látku. Stejně jako u ostatních testů byla koncentrace suspendovaných látek přibližně 1000 mg.l^{-1} . Z obrázku je zřejmé, že inhibice naměřená po velmi krátké expozici (10 min) je srovnatelná s inhibičním efektem po tříhodinovém působení.

Pro srovnání je uvedena stejná závislost pro Cr^{VI} , z níž je zřejmé, že inhibice ve sledovaném časovém intervalu postupně narůstá. Tyto rozdíly jsou důsledkem odlišných mecha-

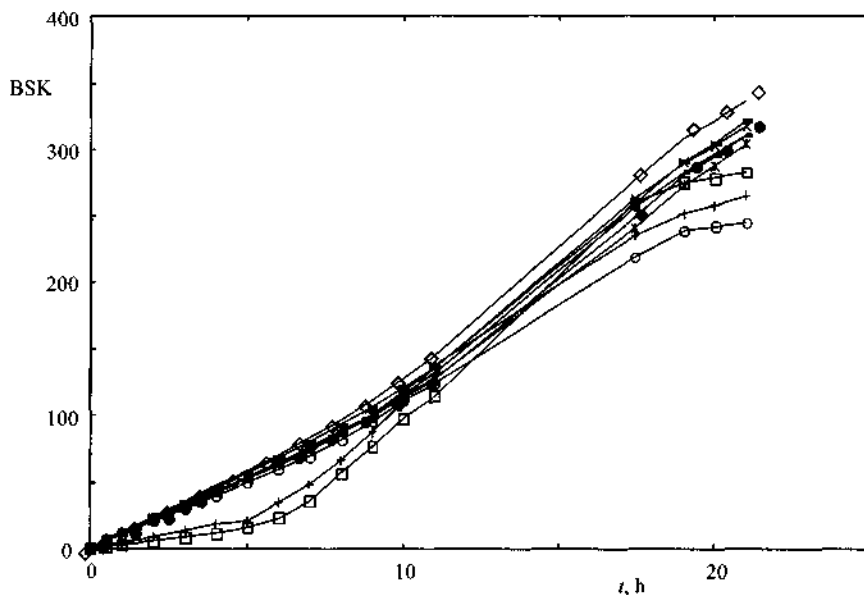
mů působení obou látek. Znalost těchto závislostí je důležitá pro korektní interpretaci hodnoty EC_{50} i pro porovnání mezi-laboratorních výsledků.

Inhibice BSK

Průběžné sledování BSK bylo prováděno na zařízení s manometrickou indikací spotřeby kyslíku na přístroji Bial (postup 2). Dvě měření byla pravidelně prováděna s kontrolní směsí bez toxické látky, ve zbývajících osmi měřících jednotkách byl sledován vliv přidavku testovaných látek v rozmezí koncentrací $1\text{-}2000 \text{ mg.l}^{-1}$. Pro sestavení inhibiční křivky bylo tímto způsobem možno získat maximálně osm hodnot (za



Obr. 4. Časový průběh BSK (mg.g^{-1}) při různých koncentracích Kortanu FB; — kontrolní p, ○— 1 mg.l^{-1} , —■— 2 mg.l^{-1} , —▲— 10 mg.l^{-1} , —×— 20 ml.l^{-1} , —*— 80 mg.l^{-1} , —○— 200 mg.l^{-1} , —+— 800 mg.l^{-1} , —□— 2000 mg.l^{-1} , postup 2



Obr. 5. Časový průběh BSK (mg.g^{-1}) při různých koncentracích Kortanu MX; — kontrolní p, ○— 2 mg.l^{-1} , —■— 10 mg.l^{-1} , —▲— 20 mg.l^{-1} , —×— 40 ml.l^{-1} , —*— 80 mg.l^{-1} , —○— 200 mg.l^{-1} , —+— 800 mg.l^{-1} , —□— 2000 mg.l^{-1} , postup 2

předpokladu provedení duplicitního měření pouze u kontrolního pokusu). Měření bylo zpravidla prováděno současně na dvou přístrojích.

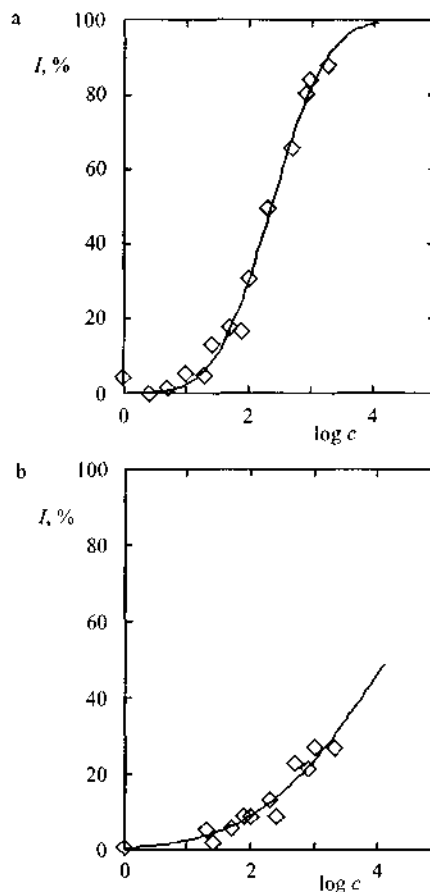
Účelem těchto pokusů bylo především posouzení inhibičních účinků při dlouhodobé expozici (desítky hodin až dny). Nespornou výhodou tohoto postupu je možnost odečtu hodnot při libovolné době expozice v průběhu měření. Pro srovnání s předchozí alternativou byly vypočteny hodnoty EC_{50} i po hodinovém kontaktu s testovanými látkami (tabulka III). Z konfrontace výsledků (tabulka I a III) plyne, že manometrická metoda poskytovala hodnoty $1h EC_{50}$ mírně (pro Kortan FB) až významně (pro fenol) vyšší. Tyto diference byly zřejmě způsobeny méně intenzivním promícháváním testované směsi v manometru; v měřících baňkách docházelo k částečné sedimentaci biologického kalu, čímž byl zpomalen kontakt testované látky s buňkami mikroorganismů. Druhou příčinou těchto diferencí mohly být také dosud neustálené tlakové podmínky v měřících nádobkách manometru v počáteční fázi testů, které se projeví větším rozptylem hodnot inhibičních křivek a tím i vypočtených $1 h EC_{50}$. Lze to dokumentovat větší šířkou 95 % intervalu spolehlivosti v tabulce III. Při dlouhodobější expozici se tyto vlivy již prakticky neprojeví a oba postupy poskytovaly z hlediska intervalu spolehlivosti srovnatelné výsledky.

Oběma postupy bylo zjištěno stejné pořadí inhibičních účinků sledovaných látek po hodinovém kontaktu: Kortan FB > Kortan MX > fenol. Při delší expozici (12-15 hodin) se toto

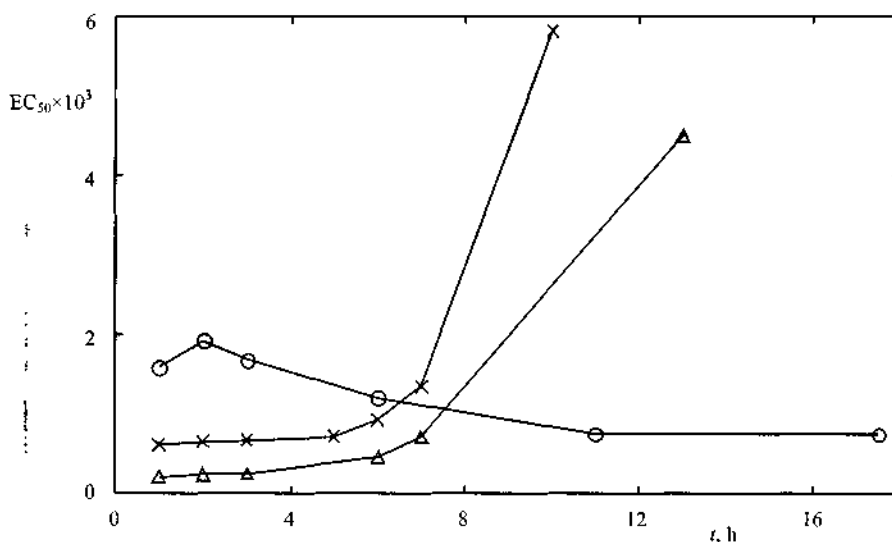
Tabulka III
Hodnoty $1h EC_{50}$ stanovené manometrickou metodou

Testovaná látka	$1h EC_{50}$ [$mg.l^{-1}$]	IS (95 %)
Fenol	1551	729 - 3305
Kortan MX	594	452-785
Kortan FB	196	152-253

pořadí prakticky obrátilo a oba syntany v koncentracích několika $g.l^{-1}$ již respiraci významněji neovlivňovaly (viz níže).



Obr. 6. Inhibice respirační rychlosti I Kortanem FB (koncentrace c v $mg.l^{-1}$) po třech (a) a osmnácti hodinách (b) expozice; postup 2



Obr. 7. Vliv doby expozice na inhibiční účinky (efektivní koncentrace EC_{50}) fenolu, Kortanů FB a MX, —x—MX, —△—FB, —○—fenol, postup 2

inhibice při dlouhodobé expozici

Vliv fenolu a obou syntanů na časový průběh BSK při různých koncentracích těchto látek znázorňují obr. 3-5. Při testech s fenolem (obr. 3) byla zjištěna významná inhibice teprve u koncentrací vyšších než 200 mg l⁻¹. U nižších koncentrací byla zaznamenána mírná inhibice pouze na počátku pokusu, po několika hodinách byla rychlost BSK srovnatelná s kontrolním pokusem, popř. i vyšší. U nejvyšší testované koncentrace 2000 mg l⁻¹ byla zjištěna výrazná represe BSK po celou dobu měření (27 h). Naproti tomu u obou testovaných syntanů (obr. 4, 5) došlo po několika hodinách expozice i u nejvyšších koncentrací 800-2000 mg l⁻¹ ke značnému poklesu inhibičních účinků. Tento náhlý pokles inhibičních účinků s dobou inkubace znázorňují i příklady inhibičních křivek, vypočtených podle rovnice (2) pro Kortan FB (obr. 6). Zatímco po třech hodinách expozice byla vypočtena střední hodnota EC₅₀ 233 mg l⁻¹, po 18 hodinách byla hodnota EC₅₀ > 2000 mg l⁻¹.

Popsané změny inhibičních účinků na respirační aktivitu aktivovaného kalu v závislosti na době kontaktu znázorňuje obr. 7. Zatímco inhibiční účinky obou syntanů přibližně po 12 hodinách inkubace velmi výrazně poklesly, u fenolu se naopak inhibiční účinek s dobou působení mírně zvyšoval.

Manometrická metoda představuje mezistupeň mezi kratkodobým respiračním testem a kontinuálně pracujícím modelem biologické aktivace. Umožňuje do jisté míry simulovat podmínky adaptace a množení mikroorganismů v podmínkách dlouhodobého kontaktu. Ke stejným závěrům dospěli také Broecker a Zahn¹³, kteří srovnávali inhibiční účinek 3,5-dichlorfenolu, naměřeny pěti různými kratkodobými testy s výsledky získanými v laboratorním modelu aktivace inhibice BSK (stanovována na přístroji Sapromat) po 20 hodinách se nejlepe shodovala s inhibicí biodegradace procesu na modelové čistírně. Při kratké době kontaktu (2 hodiny) byl pozorován výraznější inhibiční účinek.

Závěr

Posuzování inhibičních účinků xenobiotik na respirační aktivitu mikroorganismů aktivovaného kalu na základě výsledků dvou respirometrických metod, tj. měření respirační rychlosti kyslíkovou elektrodou podle ISO 8192 (cit¹) a raanometrického stanovení biochemické spotřeby kyslíku, se ukázalo jako velmi výhodné. První postup lze doporučit pro testy inhibice při kratkodobé expozici za standardních podmínek, druhý umožňuje sledování změn inhibičních účinků v průběhu dlouhodobého kontaktu mikroorganismů (a tedy jejich případné adaptace) s testovanými látkami, poskytuje při srovnatelné práci mnohem více informací. Získané výsledky jsou zřejmě bližší působení testovaných látek v reálných podmínkách biologické aktivace. Uvedené vyplývá z těchto testů s fenolem a dvěma syntany i z výsledků inhibice respiračního procesu solemi chromu⁵.

Práce byla realizována v rámci grantu Grantové agentury ČR grant č. 104/93/1066

LITERATURA

- 1 ISO Standard 8192-84 Water quality Test for inhibition of oxygen consumption of activated sludge
- 2 ČSN EN 29408, 1995 (ISO Standard 9408 1991)
- 3 OECD Guideline for Testing of Chemicals (Paris) 1992, 301
- 4 Vaňkova S., Hoffmann J., Řezníčková I. Acta Hydrochim Hydrobiol 25, 141 (1997)
- 5 Vaňkova S., Kupec J., Hoffmann J. J. Ecotoxicol Environ Safety 42, 16(1999)
- 6 Corning D. R. The Biodegradability of Tannery Chemicals XV Konferenz Internationalen Union der Leder-Chemiker und Chemiker Verbände (IX/3), Hamburg, 3 - 7 Sept 1997
- 7 Kupec J., Tkač J., Mladek M. Kožařství 29, 12 (1979)
- 8 Vinklerek Z. Kožařství 34, 346 (1984)
- 9 OECD Guidelines for Testing of Chemicals (Paris) 1984, 1
- 10 Strotmann U. J., Eglasaer H., Pagga U. Chemosphere 28, 755(1994)
- 11 Strotmann U. J., Zarembo S., Bias W. R. Acta Hydrochim Hydrobiol 20, 136(1992)
- 12 Dutka B. J., Nyholm M., Petersen J. Water Res 17, 1363 (1983)
- 13 Broecker B., Zahn R. Water Res 11, 165 (1977)

S. Vaňková, I. Řezníčková, and J. Hoffmann (Department of Environmental Technology, Faculty of Technology, Technical University Brno) **Respirometric Observation of Inhibitory Effects of Xenobiotics on Aerobic Respiration of Activated Sludge**

With phenol and two syntans (synthetic tanning agents) as examples, a description is given of possible ways to observe inhibitory effects of water-soluble xenobiotics on the respiratory activity of microorganisms of activated sludge using two procedures: the respirometric method after ISO 8192 or manometric method of determination of biochemical oxygen demand. Description of inhibition curves and calculations of effective concentrations, EC₅₀, using the equation of a normal distribution function was satisfactory in both methods. Attention was mainly focused on evaluation of the influence of exposure time on inhibition expressed by EC₅₀ values. After 1 h exposure, the inhibitory effects decreased in the order Kortan FB > Kortan MX > phenol. At 15 h exposure, the order was virtually reversed, inhibitory effects of syntans on respiration were negligible, and the phenol toxicity grew with the contact time. The ISO method proved suitable for determination of inhibition after a short contact time (1 h) under "standard" conditions, the manometric test, on the contrary, for assessment of changes in inhibitory effects during a long-term contact of microorganisms with tested substances and thus for studying possible adaptations and behaviour in real conditions of biological activation.