

Chemické listy na internetu (ještě jednou po sedmi letech)

Když si zpětně přečtu úvodník s podobným názvem, psaný zhruba před sedmi lety, kdy jsem se ujímal práce redaktora WWW stránek Chemických listů a připomenu si tehdejší „smělé“ plány rozvoje jejich obsahu, musím konstatovat, že současná podoba Chemických listů na internetu tyto plány již daleko přesáhla. Velkou zásluhu na tom má samozřejmě bouřlivý rozvoj technologií pro publikování na internetu, díky němuž se stala jistá forma internetové přítomnosti pro odborný časopis určitou normou.

Co se vlastně za těch uplynulých sedm let změnilo? Kdybychom porovnali web Chemických listů z roku 1999 s tím současným, jistě bychom na prvním místě zaznamenali změnu designu. Vzhled stránek se za uplynulé roky změnil celkem třikrát a troufám si říci, že nikdy ne k horšímu, i když až současná verze je postavená na principech použitelnosti a přístupnosti a snese srovnání s časopisy prestižních vydavatelství. Vzhled stránek ale přece jen asi není tím, co zajímá většinu návštěvníků webu Chemických listů nejvíce. Tím je bezesporu obsah, a právě v oblasti obsahu došlo za uplynulá léta k nejzásadnější změně – elektronickému zveřejňování plných textů článků. To bylo zpočátku ojedinelé, ale od roku 2002 se započalo se standardním zveřejňováním článků vydávaných v hlavních sekcích časopisu. Netrvalo příliš dlouho, než se tato praxe rozšířila do dnešní podoby, kdy se na web dostává celý obsah čísla. Později se provedla i digitalizace starších ročníků, takže v současné době je na internetu k dispozici kompletní obsah Chemických listů počínaje rokem 1997, i když je při procházení digitalizovaných čísel potřeba smířit se s poněkud horší obrazovou kvalitou a většími velikostmi souborů.

Zatím poslední změnou týkající se internetového vydání Chemických listů je jejich začlenění do služby ChemPort® (<http://chemport.cas.org>), poskytované pod hlavičkou Chemical Abstracts Service (CAS). Základní funkcí služby ChemPort je propojit uživatele elektronických vyhledávacích nástrojů CAS, jako např. SciFinder® nebo STN®, přímo na plné texty článků, dostupných u jejich vydavatele nebo u nějaké třetí strany. Služba ChemPort je poskytována zdarma, což ovšem neznamená, že jsou zdarma poskytovány i plné texty odkazovaných článků. Tato volba je plně v kompetenci vydavatele a Chemické listy, které jsou v současnosti zdarma dostupné, představují

spíše výjimku. V praxi je pak získání plného textu článku velmi transparentní. Probíhá tak, že výsledky vyhledávání v např. SciFinderu jsou doplněny tlačítkem, po jehož stisku jsou čtenáři nabídnuty možné cesty vedoucí k získání plného textu. Je-li článek poskytován zdarma nebo zahrnuje-li přístup k tomuto článku čtenářovo předplatné, lze článek ihned otevřít, v opačném případě je nabídnuta cesta pro jeho rychlé získání za úplatu.

Co tedy vlastně začlenění Chemických listů do ChemPortu přinese čtenářům? Odpověď úzce souvisí s otázkou, jaký je vlastně typický čtenář internetové verze Chemických listů. Statistiky návštěvnosti webových stránek naznačují, že přes 70 % návštěvníků na stránky přichází z Česka nebo ze Slovenska. Přibližně o stejném procentu návštěvníků platí, že se na stránky Chemických listů dostávají tak, že přímo zadají jejich adresu (nebo použijí „záložku“ ve svém internetovém prohlížeči). Lze očekávat, že průnik těchto dvou množin je velký, a že reprezentuje čtenáře, kteří více či méně pravidelně čtou nebo prohlížejí časopis v jeho internetové verzi. Přímý přínos pro tuto skupinu čtenářů je poměrně malý, protože ke článkům nepřistupují na základě žádných vyhledávačů. Doplněk k uvedeným majoritním skupinám tvoří návštěvníci, kteří přicházejí ze zahraničí a přes vyhledávací služby. Právě pro tuto skupinu představuje ChemPort obrovské zjednodušení, protože namísto zdlouhavého hledání stránek časopisu a zjišťování, zda jsou zde dostupné plné texty, mohou získat požadovaný článek několika kliknutími myši. Je jistě legitimní pochybovat o ochotě česky nemluvicích návštěvníků zabývat se článkem v češtině, ale myslím, že obrázky a tabulky jsou do značné míry jazykově nezávislé a jsou-li doplněny kvalitním anglickým souhrnem, lze snad článek považovat alespoň za použitelný. V souvislosti s tím se redakce Chemických listů dohodla podporovat rozšířené souhrny článků v angličtině, jejichž rozsah spolu s grafickými a číselnými informacemi umožní pochopit nejdůležitější části obsahu článku i čtenářům, kteří vládou „pouze“ angličtinou. Podle mého názoru tedy může začlenění Chemických listů do služby ChemPort přinést zvýšení počtu čtenářů ze zahraničí, přispět k citovanosti publikovaných článků a k růstu impaktového faktoru časopisu, a tím dále zvýšit jeho kvalitu pro všechny čtenáře.

Petr Zámotný

KVARKY S BARVOU A VŮNÍ A CO DÁL?

JIŘÍ CHÝLA

Fyzikální ústav Akademie věd České republiky, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
 chyla@fzu.cz

Došlo 24.7.06, přijato 28.8.06.

Klíčová slova: standardní model, kvarky, leptony, kvantová chromodynamika, sjednocení sil, supersymetrie, struny

Obsah

1. Úvod
2. Charakter zákonů mikrosvětla
3. Co o mikrosvětě víme
4. Elektromagnetické síly
5. Efektivní elektrický náboj
6. Vyšší princip mravní: lokální kalibrační invariance
7. Neabelovské kalibrační teorie
8. Slabé síly
9. Silné síly
10. Asymptotická volnost
11. Kvantová chromodynamika
12. Jak dál?
13. Jsou kvarky a leptony skutečně elementární?
14. Teorie velkého sjednocení
15. Supersymetrie
16. (Super)struny
17. Teorie s velkými dalšími dimenzemi
18. První pozdrav z Nového světa?
19. Závěr

1. Úvod

Pokrok ve vědě jde často daleko složitějšími cestami, než jak se o tom dočítáme v knihách o historii vědy. To platí zvláště o teoretické fyzice, částečně proto, že dějiny píší vítězové. Historikové často ignorují různé cesty, jimiž se vývoj ubíral, mnohé falešné stopy, po nichž se fyzikové ubírali a všechny chybné představy, jež měli. Četbou historických pramenů jen vzácně získáme správnou představu o skutečné podstatě vědeckého pokroku, do něhož patří fraška stejně jako triumf. Vznik a vývoj kvantové chromodynamiky je krásný příklad vývoje od frašky až k triumfu.

*David Gross,
 laureát Nobelovy ceny za fyziku v roce 2004*

Citát z přednášky „25 let asymptotické volnosti“, kterou David Gross přednesl v roce 1998 na konferenci o historii fyziky, snad nejlépe vystihuje cestu, kterou se v uplynulých zhruba padesáti letech ubíraly snahy fyziků pochopit strukturu hmoty a zákonitosti, jimiž se její základní stavební kameny řídí. Nobelova cena za fyziku, kterou byl David Gross spolu s Frankem Wilczekem a Davidem Politzerem v roce 2004 poctěn, byla udělena za objev, který zásadním způsobem změnil naše chápání sil působících v mikrosvětě a který ve svých důsledcích vedl k tomu, že jsme pochopili strukturu protonů a neutronů, tedy částic, z nichž se skládá 99,9 % hmoty na Zemi. Jejich objev, k němuž se ještě vrátím, má však i širší důsledky, neboť se dotýká otázky, jaký má – či nemá – smysl hovořit o něčem, co neexistuje v přírodě jako izolovaný objekt, ale jen jako součást složitějších systémů.

Hledání základních stavebních kamenů hmoty a zákonitostí, jimiž se řídí, je pradávna touha filozofů a přírodovědců. Samotný pojem „elementární“ měl proměnný obsah: od čtyř elementů starých Řeků, přes atomy Johna Daltona až po kvarky a leptony současné fyziky elementárních částic. Co bylo včera „elementární“ je dnes „složené“ a nejinak tomu bude asi i v budoucnosti. Důležitým zlomem ve vývoji našeho chápání menších a menších objektů byl objev atomového jádra v roce 1911. Rutherford tehdy ukázal, že převážná část objemu atomů je prázdná a většina hmoty je soustředěna v malém objemu o poloměru několika femtometrů ($1 \text{ fm} = 10^{-15} \text{ m}$), atomovém jádře. Tento okamžik znamenal zrod jaderné fyziky a atomové jádro a jeho vlastnosti jsou také spojovacím mostem mezi chemií a tím, co se dnes volně nazývá fyzikou elementárních částic. Ta se sice již posunula na ještě nižší úroveň struktury, ale protony a další atomová jádra jsou stále základním nástrojem při studiu mikrosvětla. Pro fyziku atomů a molekul jsou ovšem důležité vlastnosti elektronů a protonů jen jako celků, nikoliv jejich jemnější struktura. Je to dáno tím, že rozměry atomů a molekul jsou o několik řádů větší, než rozměr protonu. Nic z toho, o čem vypráví tento článek, proto není pro chemii prakticky „užitečné“ a žádný objev, na který se fyzikové elementárních částic tak těší, nepřispěje k hlubšímu pochopení složitých chemických struktur a jejich vlastností. Pokrok ve studiu mikrosvětla na subjaderné úrovni však může ukázat, jak se do přírodních zákonů dostávají ty základní fyzikální veličiny, jako jsou hmotnosti, elektrické náboje a magnetické momenty elektronů, protonů a neutronů, které pro chemii představují vstupní parametry. Pochopit, proč mají tyto veličiny právě takové hodnoty, jaké mají, může být zajímavé i pro chemii, neboť existence a bohatost v přírodě existujících chemických struktur citlivě závisí na jejich numerických hodnotách. Kdyby měl elektron dvojnásobnou hmotnost, či měl poloviční elektrický náboj, vypadal by svět zcela jinak.

V dalším výkladu nejdříve podáme stručný přehled současného stavu našich znalostí struktur a zákonitostí mikrosvětla, jímž budeme rozumět vše menší než zhruba 1 femtometr^a. Tyto znalosti, jež jsou obvykle shrnovány pod termínem „standardní model“ (SM) elementárních částic, jsou výsledkem více než půl století experimentálního a teoretického zkoumání mikrosvětla, na němž se podíleli tisíce fyziků. Cesta ke SM byla trnitá se spoustou zákrutů a vzrušujících okamžiků a kráčeli po ní smutní hrdinové i miláčci štěstěny, kteří by si zasloužili naši pozornost, ale na něž v tomto článku bohužel není místo^b.

V druhé části pak nastíníme několik směrů, jimiž se dnes teorie ve snaze vylepšit SM ubírá. SM je sice při popisu experimentálních dat velmi úspěšný, ale má řadu slabých míst, které svědčí o tom, že jde jen o „efektivní teorii“, pod níž zřejmě leží ještě hlubší úroveň struktury a zákonů mikrosvětla. Co to bude, dnes ještě nevíme, ale do konce tohoto desetiletí se snad dozvíme, který z těchto směrů, pokud vůbec některý, je správný. Měly by k tomu přispět experimenty na novém mohutném urychlovači, který se staví v Evropském středisku fyziky částic CERN (z francouzského *Conseil Européen pour la Recherche Nucléaire*) v Ženevě a jenž by měl začít pracovat koncem roku 2008.

2. Charakter zákonů mikrosvětla

Zákony, jež platí v mikrosvětě, se opírají o dvě teorie, které spatřily světlo světa počátkem minulého století: teorii relativity a kvantovou teorii. Jedním z důsledků Einsteiny teorie relativity je ekvivalence hmotnosti a energie. Energie získaná z jádra ani životodárné paprsky ze Slunce by neexistovaly, kdyby se molekuly, atomy a jejich jádra řídily zákony klasické fyziky, které sice dovolují přeměnu různých forem energie, ale nikoliv přeměnu klidové hmotnosti částic na kinetickou energii. Jedině díky zmíněné ekvivalenci je také možné, že při srážkách částic mohou v mikrosvětě částice vznikat i zanikat.

Svět kolem nás však ke své existenci potřebuje i kvantovou teorii. Její historicky první forma, nerelativistická kvantová mechanika, vznikla v polovině dvacátých let minulého století jako vyvrcholení snahy řady velkých osobností jako byli Bohr, Sommerfeld, Pauli, Heisenberg, Schrödinger, Dirac a další, pochopit základní vlastnosti atomů poté, co v roce 1911 Rutherford objevil atomové jádro. Kdyby se protony, neutrony a elektrony, z nichž se skládá svět kolem nás, řídily zákony klasické fyziky, nebyly by atomy stabilní a neexistovaly by proto ani žádné

struktury, kterými se chemie a fyzik zabývá. A neexistovali bychom samozřejmě ani my. Skutečnost, že vázané stavy elektronů a protonů existují jen v diskrétních energetických stavech, je bezprostředním důsledkem kvantové povahy těchto částic.

Kvantová mechanika si vynutila nejen zásadní změnu v pojmech, kterými svět atomů popisujeme, ale přinesla i první zcela neklasický pojem – vnitřní moment hybnosti elektronu, tj. jeho spin. V roce 1924, těsně předtím, než byla formulována kvantová mechanika a než byl pojem spinu formálně zaveden, vyslovil Wolfgang Pauli na základě zkoumání spekter atomů předpoklad, že elektron existuje ve dvou „klasicky nepopsatelných“ stavech. Pro systémy elektronů pak formuloval svůj „vylučovací princip“, jenž říká, že „v systému elektronů nemohou být žádné dva ve zcela stejném stavu“. Právě toto omezení na možné stavy elektronů v atomech brání tomu, aby v základních stavech atomů všechny elektrony zaujímaly nejnižší možnou energii a musí se plnit i vyšší energetické hladiny. Dnes víme, že elektron je jen jedna z mnoha částic, které mají poločíselný spin a jímž říkáme fermiony. Pro všechny tyto fermiony platí Pauliho princip. Žádné takové omezení neplatí pro systémy bosonů, částic s celočíselným spinem. Až donedávna se zdálo, že mezi fermiony a bosony je hluboká teoretická propast, neboť vlnové funkce popisující stavy fermionů a bosonů se liší vlastností symetrie vůči permutacím částic. Jedna z moderních teoretických představ, o níž se zmíníme, právě tuto bariéru nemilosrdně bortí.

3. Co o mikrosvětě víme

Základní poznatky o struktuře a zákonech mikrosvětla jsou shrnuty v již zmíněném SM. Podle něho jsou základními stavebními kameny hmoty tři tzv. generace fermionů se spinem 1/2, jež se dále dělí na kvarky a leptony (viz tabulka I). Každý ze šesti tzv. „vůň“ kvarků, označovaných symboly u (z anglického up), d (down), s (strange), c (charm), t (top), b (bottom), existuje ve třech různých stavech, nazývaných „barvy“. Elektrické náboje jsou uvedeny v jednotkách elektrického náboje pozitronu. Čísla v závorkách ukazují klidové hmotnosti částic, resp. u neutrin horní meze na jejich hmotnosti. V případě kvarků jde o tzv. „konstituentní“ hmotnosti. Hierarchie hmotností kvarků a leptonů nevykazuje žádný zjevný řád, kromě obecného trendu, že hmotnosti částic rostou s pořadím generace. Otázka původu jejich hodnot je zcela otevřená a představuje jeden z hlavních problémů současné teorie.

^a Pro svět subatomárních částic je mezinárodní systém jednotek nevhodný a je proto zvykem používat přirozené jednotky, jimiž je v případě energie gigaelektronvolt (GeV = miliarda eV). Klidová hmotnost protonu odpovídá energii 0,94 GeV. Navíc se pracuje v jednotkách, v nichž číselné hodnoty rychlosti světla c a Planckovy konstanty $h/2\pi$ jsou rovny 1. Rozměr délky je pak GeV^{-1} a konstanta jemné struktury je vyjádřena pomocí elektrického náboje elektronu je dáno jako $\alpha \equiv e^2/4\pi$.

^b Informace o klíčových experimentálních objevech, které přivedly ke standardní teorii i o tom, jak se „dělá“ fyzika elementárních částic dnes ve světě a jak k tomu přispívají čeští fyzikové, lze najít v přehledných člancích a textech¹⁻⁴.

Tabulka I

Tři generace kvarků a leptonů, ν_e – elektronové neutrino, ν_m – mionové neutrino, ν_τ – tauonové neutrino, e^- – elektron, μ^- – mion, τ^- – tauon. Čísla v závorkách udávají u kvarků a nabitých leptonů jejich klidové hmotnosti a v případě neutrin jejich horní meze. Každý z kvarků existuje ještě ve třech různých stavech, nazývaných „barvy“

Částice	Náboj, Q	1. generace	2. generace	3. generace
Kvarky	$\frac{2}{3}$	u (0,3 MeV)	c (1,5 GeV)	t (175 GeV)
	$-\frac{1}{3}$	d (0,3 MeV)	s (0,5 GeV)	b (4,5 GeV)
Leptony	0	ν_e (3 eV)	ν_μ (0,2 MeV)	ν_τ (0,2 GeV)
	-1	e^- (0,5 MeV)	μ^- (0,1 GeV)	τ^- (1,8 GeV)

Na rozdíl od leptonů, které v přírodě existují v běžném slova smyslu, tj. jako izolované objekty, kvarky v přírodě existují vždy jako kombinace tří kvarků – tyto částice nazýváme *baryony* – či jako pár kvark-antikvark – tzv. *mezony*. K přičinám, proč tomu tak je, a k otázce, v jakém smyslu je třeba u kvarků chápat výrok „existují“, se vrátíme v části o silných silách. Na tomto místě je třeba upozornit na nebezpečnou terminologickou nekonzistenci, spočívající v tom, že nabitý lepton druhé generace se obvykle nazývá mezon μ , i když se nejedná o systém složený z kvarků a antikvarků. Je proto vhodnější pro tuto částici používat název *mion* (a pro nabitý lepton 3. generace *tauon*). Matoucí název mezon μ vznikl z řeckého „meson“, tj. „střední“, v důsledku skutečnosti, že klidová hmotnost mionu je ve srovnání s hmotnostmi protonu a elektronu střední.

Baryony a mezony (a jejich antičástice) se souhrnně nazývají *hadrony*. Tak například z kvarků první generace jsou složeny protony (trojice uud) a neutrony (trojice udd), jež spolu s elektrony vytvářejí atomy a tím i většinu hmoty na Zemi i ve viditelné části vesmíru. Mezi mezony patří např. pion (π -mezon), nebo kaon (K-mezon).

Proč existují v přírodě právě tři generace kvarků a leptonů je jedna ze základních otázek dnešní fyziky mikrosvěta. Ke každému kvarku a leptonu existuje i antičástice, u antikvarků a antineutrin označovaná pruhem nad symbolem příslušného kvarku či neutrina, u nabitých leptonů horním indexem (e^+ pro pozitron, μ^+ pro kladný mion a τ^+ pro kladný tauon). Ve všech procesech popisovaných standardním modelem se zachovává tzv. baryonové číslo, tj. počet kvarků mínus počet antikvarků. Podobně i u leptonů. Kvarky i leptony tedy mohou vznikat, nebo zanikat jen v párech kvark-antikvark či lepton-antilepton.

Mezi kvarky a leptony působí čtyři typy sil: gravitační, elektromagnetické, slabé a silné (tabulka II). Kromě

Tabulka II

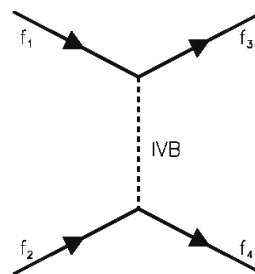
Tři základní síly působící v mikrosvětě a jejich příslušné intermediální vektorové bosony IVB (viz kapitoly 4, 8 a 9)

Síly	IVB
elektromagnetické	foton
slabé	W^+ , W^- , Z
silné	8 gluonů

gravitace, o níž se zmíníme až ke konci článku a jež v mikrosvětě na experimentálně dostupných vzdálenostech nehraje žádnou roli, lze ostatní tři síly popsat pomocí výměny, schématicky znázorněné na obr. 1, zprostředkujících částic, intermediálních vektorových bosonů (IVB), jež mají spin 1. Tato skutečnost je výchozím bodem při snaze tyto síly sjednotit, tj. chápat je jako tři projevy jedné fundamentální „prasily“ a to navzdory tomu, že na první pohled mají velmi rozdílné vlastnosti. Důležitou roli při sjednocování těchto sil hraje okolnost, že v kvantové teorii je dosah síly nepřímo úměrný hmotnosti příslušného IVB.

„Výměnný“ charakter mají i síly mezi nukleony, jejichž první teorii formuloval v roce 1935 Hideki Yukawa, a které se nazývají *jaderné síly*. V tomto případě jsou zprostředkujícími částicemi piony (π mezony), které mají spin 0, nikoliv 1 jako IVB (slovo „vektorový“ vystihuje právě skutečnost, že jde o částice se spinem 1). Jaderné síly mezi nukleony jsou důsledkem sil mezi kvarky.

Základní rozdíl mezi kvarky a leptony je v tom, že silné síly působí jen na barevné částice a tedy jen mezi kvarky. Tyto síly zodpovídají za vazbu kvarků uvnitř protonů, neutronů a mezonů a dalších hadronů. Přechod mezi kvarky a leptony ve SM není možný. Jak uvidíme, v moderních teoriích mikrosvěta ani tohle nemusí platit. Kromě částic uvedených v tabulce I hraje ve ST důležitou roli i tzv. Higgsův boson, částice se spinem nula, jejíž interakce s ostatními částicemi je odpovědná za velikosti hmotností kvarků, leptonů a IVB. Higgsův boson je pozůstatkem mechanismu, o němž se zmíníme v části o slabé síle.



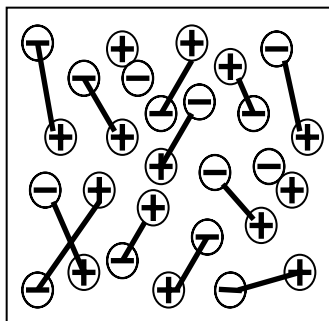
Obr. 1. Grafické znázornění výměnného mechanismu sil působících mezi kvarky a leptony z tabulky I (označenými f_1 , f_2 , f_3 a f_4)

4. Elektromagnetické síly

Elektromagnetické síly byly v řadě aspektů vzorem při formulaci teorie sil slabých i silných. Na klasické úrovni jsou elektromagnetické síly známy již od 70. let 19. století, kdy Maxwell formuloval své rovnice. V statické aproximaci je lze popisovat pomocí potenciálu, jenž je nepřímo úměrný vzdálenosti mezi elektrickými náboji a přímo úměrný součinu jejich nábojů. Tento potenciál vystupuje i při popisu elektromagnetických sil v rámci nerelativistické kvantové mechaniky, jež je vhodná pro popis systémů s dobře definovaným počtem částic, které se pohybují pomalu ve srovnání s rychlostí světla. Pro popis relativistických částic navrhl Dirac v roce 1927 rovnici, jež nese jeho jméno a o dva roky později formuloval kvantovou elektrodynamiku (QED), teorii, popisující vzájemné působení elektricky nabitých částic a fotonů. Ta je invariantní vůči prostorovému zrcadlení i vůči záměně částice – antičástice, to znamená, že pohybové rovnice QED se nezmění, když zaměníme prostorové souřadnice x za $-x$ a elektron za jeho antičástici, pozitron.

QED byla první kvantovou teorií pole (QFT, z anglického *Quantum Field Theory*), která byla pro popis procesů v mikrosvětě použita a je proto vhodné aspoň krátce připomenout, jaké nové rysy přinesla a v čem se lišila od kvantové mechaniky. Spojení kvantové teorie s teorií relativity totiž přineslo i řadu problémů. Vyřešení jednoho z nich trvalo půl století a vyvrcholilo právě objevem, za nějž byla udělena již zmíněná Nobelova cena.

QFT vychází z představy o poli jako základní entitě, s níž pracujeme. Všechny částice chápeme jako excitace základního stavu pole, jež se nazývá vakuum. Tento název je ovšem zavádějící, protože jde o netriviální stav pole, který není v běžném slova smyslu „prázdný“. Zhruba řečeno, vakuum QED se chová jako moře „virtuálních“ elektron-pozitronových párů, které po svém vzniku „žijí“ jen konečnou – někdy velmi krátkou, jindy delší – dobu a nechovají se stejně jako reálné částice (viz obr. 2). Přesto za určitých okolností je rozdíl mezi chováním reálných a virtuálních částic malý. Jako celek ale i každý makroskopický objem vakua je elektricky neutrální a vakuum se tedy chová ve všech místech prostoru stejně.



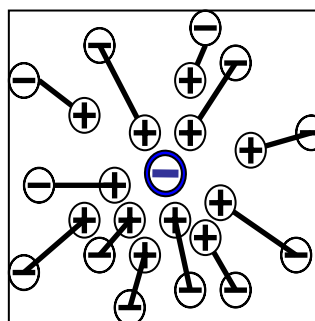
Obr. 2. Grafické znázornění vakua v QED; Virtuální elektron-pozitronové páry „žijí“ po dobu, která je úměrná délce spojnice vyznačené mezi elektronem a pozitronem

Na rozdíl od kvantové mechaniky, QFT popisuje také procesy, v nichž částice vznikají a zanikají. První antičástici – pozitron – předpověděl v roce 1929 Dirac na základě analýzy řešení své rovnice. Ta však vedla bezprostředně i dalšímu důležitému pojmu: spinu elektronu. Ten již existoval v rámci kvantové mechaniky, ale teprve v rámci QFT se vyjasnil jeho původ a role, kterou v mikrosvětě hraje.

Zatímco v klasické i kvantové mechanice částice na sebe působí na dálku, v QED je silové působení mezi dvěma elektricky nabitými částicemi přenášeno elektromagnetickým polem a „zprostředkujícími“ částicemi jsou fotony. Ty jsou elektricky neutrální a protože ani jinak nemění identitu částic, znamená to, že v diagramu na obr. 2 je $f_1=f_3$ a $f_2=f_4$. Protože foton je nehmotný, mají elektromagnetické síly nekonečný dosah.

5. Efektivní elektrický náboj

Moderní směry rozvoje kvantové teorie pole se opírají o pojem „efektivního náboje“. V klasické fyzice je elektrický náboj částice číslo a stejně je tomu i v kvantové mechanice. V QED je tomu v důsledku netriviálních vlastností vakua jinak. Vložíme-li do vakua elektron s nábojem e_B , kterému budeme říkat „holý“, dojde vlivem jeho působení na virtuální elektrony a pozitrony k „polarizaci vakua“: virtuální pozitrony jsou k holému náboji přitahovány, zatímco virtuální elektrony jsou naopak od holého náboje odpuzovány (obr. 3). Prostorová hustota kladných nábojů nesených virtuálními pozitrony je proto v každé konečné vzdálenosti od holého náboje větší než hustota záporných nábojů nesených virtuálními elektrony. Celkový náboj $e(r)$ uzavřený v kouli o poloměru r je tak v absolutní hodnotě menší než vložený holý náboj a navíc klesá se vzdáleností r . Protože silové působení ve vzdálenosti r od holého náboje je určeno právě veličinou $e(r)$, je zvykem ji nazývat „efektivní elektrický náboj elektronu“. Vliv vakua tedy v QED vede ke stínění holého náboje a vakuum QED se tedy chová podobně jako dielektrické nebo diamagnetické látky. Výpočty efektivního elektrického náboje v rámci poruchové QED ukazují, že příspěvky virtuálních elektron-pozitronových párů divergují v limitě,



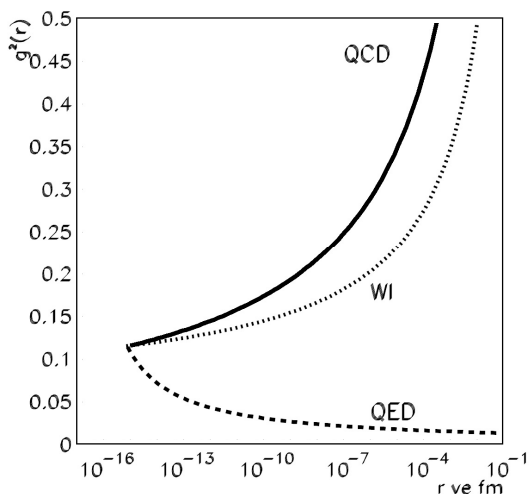
Obr. 3. Polarizace vakua v QED v důsledku vložení záporného holého náboje

kdy „doba života“ párů jde k nule. Protože v této limitě jsou elektron-pozitronové páry „malé“, lze tuto divergenci regularizovat tím, že elektronům i pozitronům přiřadíme konečný poloměr r_B . Protože fyzikální elektron konečný poloměr nemá, je třeba na konci procedury položit $r_B=0$. Výpočet závislosti efektivního elektrického náboje $e(r, r_B)$ vede na výraz

$$e^2(r, r_B) = \frac{e_B^2(r_B)}{1 + \beta e_B^2(r_B) \ln(r/r_B)} \Rightarrow e_B^2(r_B) = \frac{e^2(r, r_B)}{1 - \beta e^2(r, r_B) \ln(r/r_B)} \quad (1)$$

kde $\beta = 2/\pi$ a holý náboj elektronu jsme nechali záviset na jeho poloměru. Z prvního vztahu v (1) je patrné, že pro pevné r a e_B jde efektivní náboj $e(r, r_B)$ s klesajícím r_B k nule. Pokud by byl elektrický náboj holého elektronu nezávislý na jeho poloměru, dostali bychom v limitě bodového elektronu teorii, v níž na sebe elektrony a pozitrony nepůsobí, neboť efekty polarizace vakua holé náboje odstítní. To není nesmyslné, jen to není fyzikálně zajímavé. Chceme-li dostat pro každé r konečnou, na holém náboji e_B nezávislou hodnotu efektivního elektrického náboje $e(r)$, musí e_B záviset na jeho poloměru tak jak udává druhý vztah v (1). Z něj plyne, že pro konečnou hodnotu r_B , rovnou tzv. Landauovu poloměru r_L , bude holý elektrický náboj $e(r, r_B)$ divergovat. Holý elektron tedy nelze stáhnout až na bod, jak bychom chtěli, a QED tedy není na malých vzdálenostech definována.

Jak je pak ovšem možné, že ve všech učebnicích kvantové teorie pole je QED považována za nejlepší teorii, jakou pro popis mikrosvěta máme? Důvod spočívá v tom, že hodnota Landauova poloměru r_L je tak malá, že problém, který jsme právě zmínili, je sice principiální, ale v praxi se nikdy neprojeví. Konkrétně, pro případ, že uva-



Obr. 4. Závislost efektivních nábojů silných (QCD), slabých (WI) a elektromagnetických (QED) sil na vzdálenosti mezi kvarky

žujeme ve vakuu jen elektron-pozitronové páry, přestává mít QED smysl na vzdálenostech menších než $r_L \approx 10^{-291}$ cm! To je tak nepředstavitelně malé číslo, že pragmatický přístup ke QED má své oprávnění. To, co standardně nazýváme elektrický náboj elektronu, je hodnota efektivního elektrického náboje na vzdálenostech větších než Comptonova vlnová délka elektronu, tj. 400 femtometrů. Tam výše uvedený vztah pro $e(r, r_B)$ přestává platit a efektivní elektrický náboj jde ke konstantě, rovné klasickému elektrickému náboji. Výsledná závislost efektivního elektrického náboje na vzdálenosti je znázorněna na obr. 4.

6. Vyšší princip mravní: lokální kalibrační invariance

QED byla vzorem pro teorie ostatních sil působících v mikrosvětě i pokud jde o princip, na němž je ve SM založena dynamika všech sil. V roce 1929 ukázal Hermann Weyl, že QED plyne z principu lokální kalibrační invariance, tj. požadavku, aby rovnice, které splňuje pole $\Psi(x)$ elektronu byly invariantní vůči lokálním fázovým transformacím

$$\psi(x) \rightarrow \psi'(x) = \exp(i\alpha(x))\psi(x) \quad (2)$$

kde $\alpha(x)$ je libovolná diferencovatelná funkce souřadnic. Na rozdíl od případu, kdy $\alpha(x)$ je konstanta, rovnice volného Diracova pole vůči (2) invariantní nejsou, a proto v teorii musí existovat vektorové pole A_μ , které s Diracovým polem elektronů interaguje a při transformaci (3) se transformuje podle předpisu

$$A_\mu \rightarrow A'_\mu = A_\mu - \partial\alpha(x)/\partial x^\mu \quad (3)$$

Požadavek invariance rovnic teorie vůči transformacím (2–3) také znamená, že kvantum pole A_μ , náš dobře známý foton, musí mít nulovou klidovou hmotnost. Tento výrok neznámá nic jiného, než dobře známou skutečnost, že foton se v každé souřadné soustavě pohybuje rychlostí světla.

7. Neabelovské kalibrační teorie

Když v říjnu 1954 dva mladí teoretici, Chen Ning Yang a Robert Mills, formulovali třídu kvantových teorií pole, které se dnes nazývají neabelovské kalibrační teorie, nebo také Yangovy-Millsovy teorie, nikdo, ani sami autoři, netušil, že tím položili základní rámec pro popis sil v mikrosvětě.

Yang a Mills ve své práci budovali teorii sil, které jsou zodpovědné za vazbu protonů a neutronů v jádrech. Z hlediska těchto sil jsou proton a neutron dva různé stavy jedné částice, nukleonu, které se liší hodnotou vnitřního kvantového čísla, jež se nazývá izospin. Připomeňme, že svou práci psali 10 let před formulací kvarkového modelu, v době, kdy byly protony a neutrony ještě považovány za

základní částice. Průkopnický význam práce Yanga a Millse spočíval v tom, že svou teorii jaderných sil budovali v těsné analogii s QED na základě již zmíněného principu lokální kalibrační invariance. Technicky to znamenalo zaměnit grupu $U(1)$ lokálních fázových transformací (2) grupou $SU(2)$ lokálních (tj. na souřadnicích závislých) transformací izospinového dubletu (proton, neutron). Invariance sil vůči takové transformaci pak neznamená nic jiného, než požadavek, aby teorie byla invariantní nejen vůči záměně proton ↔ neutron, ale i při záměně stavů protonu a neutronu jejich dvěma libovolnými ortogonálními lineárními kombinacemi.

Ke každému generátoru grupy $SU(2)$ existuje jeden kalibrační boson, který hraje analogickou roli jako foton v QED, a tak v jejich teorii byly síly mezi dvěma nukleony zprostředkovány výměnou tří IVB: kladně nabitého V^+ , záporně nabitého V^- a neutrálního V^0 . Nejdůležitější rozdíl od fotonů, které jsou neutrální a proto samy na sebe nepůsobí, je v tom, že částice V^+, V^- a V^0 na sebe vzájemně působí stejnými silami, jaké samy zprostředkují. Právě tato vlastnost teorií Yanga a Millse, nazývaná „samointerakce IVB“, má za důsledek, že neabelovské kalibrační teorie za určitých okolností netrpí neduhy, které sužují kvantovou elektrodynamiku. Stejně jako v QED je důsledkem požadavku invariance teorie vůči transformacím (4) nulovost klidové hmotnosti příslušných kalibračních bosonů.

8. Slabé síly

Slabé síly se od elektromagnetických liší dramaticky a ve všech ohledech. Jejich dosah je jen asi tisícina femtometru a díky tomu neexistuje žádná „klasická“ teorie slabých sil a jediným vhodným nástrojem pro jejich popis je kvantová teorie pole. V důsledku velmi krátkého dosahu neexistují žádné částice, které by „držely“ pohromadě slabými silami. Procesy, jež jsou důsledkem slabých sil, jako je například β -rozpad neutronu a jader, nebo proces fúze jader vodíku na jádro hélia v nitru Slunce, jsou tedy bytostně kvantové povahy^c. Poznamenejme, že např. β -rozpad neutronu na proton, elektron a elektronové antineutrino nelze chápat jako vzájemné odpuzování protonu, elektronu a antineutrino, neboť neutron není z těchto částic složený! Při β -rozpadu neutron přechází na proton a přitom vznikají elektron a antineutrino. Ačkoliv jsou na vzdálenostech řádu průměru protonu ve srovnání s elektromagnetickými silami skutečně „slabé“, mají jednu

důležitou vlastnost: nejsou invariantní vůči prostorové (P) a nábojové (C) inverzi (tj. záměně pojmů „vpravo“ a „vlevo“, resp. „částice“ a „antičástice“), ba ani vůči kombinované prostorové a nábojové inverzi (CP). Zde je na místě připomenout, že nejobecnější principy kvantové teorie vyžadují, aby pohybové rovnice byly invariantní vůči kombinaci (označované CPT) všech tří inverzí: prostorové, nábojové a časové (T). Narušení CP invariance pak implikuje narušení invariance vůči změně toku času.

Právě jemný (na relativní úrovni 0,001) efekt narušení CP invariance je zřejmě klíčem k pochopení skutečnosti, proč je ve vesmíru více hmoty než antihmoty a proč tedy vůbec existujeme. Shodou okolností k objevu narušení CP invariance v rozpadech částic, jimž se říká neutrální K-mezony, došlo v roce 1964 jen krátce před objevem reliktního mikrovlnného záření. V obou případech šlo o skutečně neočekávané objevy, jež ovšem zásadně ovlivnily vývoj kosmologie i fyziky částic a byly počátkem sblížení těchto zdánlivě tak odlišných oborů.

Slabé síly jsou na druhé straně nejuniverzálnější, neboť působí na všechny kvarky a leptony. Ze tří zprostředkujících částic slabých sil je jedna, označovaná Z, neutrální a dvě, označované W^+ a W^- , elektricky nabité. Při výměně bosonu Z v procesu na obr. 1, se identita rozptylujících částic nemění, podobně jako při výměně fotonu. Při výměně nabitých bosonů W^+ a W^- se mění elektrický náboj kvarků a leptonů o jednotku. Barva kvarků se přitom nemění.

Kvantitativně lze slabé síly mezi například dvěma kvarky popsat pomocí Yukawova potenciálu (viz vzorec v obr. 5), v němž $g_{Wf}^2(r)$ je čtverec efektivního slabého náboje kvarku a $r_{Wf} \approx 10^{-18}$ m je dosah slabých sil. Tomu odpovídají klidové hmotnosti IVB W^+, W^- a Z, jež jsou zhruba 100krát větší než je hmotnost protonu. Exponenciálně potlačující člen v potenciálu je účinný na vzdálenostech mnohem větších než dosah slabých sil, zatímco na vzdálenostech $r \ll r_{Wf}$ přechází potenciál slabých sil na coulombický tvar, charakteristický pro elektromagnetické síly. Na obr. 5 je srovnána závislost slabé síly (WI) mezi kvarky se silou elektromagnetickou (QED) za předpokladu, že efektivní elektrické a slabé náboje kvarků jsou stejné. To sice není přesně pravda, ale jak dále uvidíme, rozdíl není velký a pro srovnání na obr. 6 nepodstatný. Na vzdálenostech menších než asi tisícina femtometru není mezi slabými a elektromagnetickými silami co do velikosti žádný podstatný rozdíl. Obr. 5 ilustruje skutečnost, že za „slabost“ slabých sil na vzdálenostech řádově femtometr

^c V souvislosti s teorémem CPT (Hegstrom R. A., Rein D. W., Sandars P. G. H.: J. Chem. Phys. 73, 2329 (1980).) bylo jednoznačně ukázáno, že slabé síly jsou diskriminativní a rozlišují mezi optickými antipody. Rozdíl energie antipodů je malý (Jungwirth P., Skála L., Zahradník R.: Chem. Phys. Lett. 161, 502 (1989).) a v současné době neměřitelný. Podle zdrženlivých odhadů může však být měřitelný za 10 či 20 let. Změna energie spojená s přechodem od pravotočivé k levotočivé molekule je identická se změnou energie při přechodu pravotočivé molekule k pravotočivé antimolekule; je tudíž splněna invariance vůči spojené operaci CP. Zmíněný energetický rozdíl může být umocněn interakcí s povrchem chirální pevné látky (např. křemene), a proto je vážně uvažován v souvislosti s úsilím o interpretaci výskytu L-aminokyselin a D-cukrů v živé hmotě. Této tematice v posledních letech věnuje velkou pozornost M. Quack (Chimia 57, 147 (2003).) – poznámka prof. Zahradníka

může primárně velká hmotnost IVB W^+, W^- a Z .

Pochopit, jak IVB W^+, W^- a Z získávají velkou hmotnost a foton přitom zůstává nehmotný, se podařilo Sheldonu Glashowovi, Abdusovi Salamovi a Stevenu Weinbergovi koncem 60. let. Teorie, kterou formulovali, a která dnes nese jejich jméno (teorie GWS), se opírá o princip lokální kalibrační invariance a využívá myšlenku tzv. spontánního narušení symetrie. Na podrobnější diskusi tohoto mechanismu, který navrhl v roce 1964 Peter Higgs a nezávisle i Francois Englert s Robertem Broutem, zde není místo, jen poznamenejme, že jde o mechanismus známý i z jiných oborů, jako je magnetismus apod. Hledání tzv. Higgsova bosonu, částice se spinem 0, jež by měla jako důsledek Higgsova mechanismu v přírodě existovat, je jedním z hlavních úkolů experimentální fyziky částic.

Teorie GWS do určité míry „sjednocuje“ elektromagnetické a slabé síly, ale toto sjednocení má spíše charakter mírumilovné koexistence, než skutečného sjednocení. K tomuto bodu se ještě vrátíme.

9. Silné síly

Cesta k dnešnímu chápání silných sil mezi protony, neutrony a dalšími hadrony trvala zhruba 20 let, od počátku 50. let až do roku 1973, kdy byla formulována kvantová chromodynamika (QCD). Nemáme zde prostor k podrobnější diskusi experimentálních objevů a teoretických myšlenek, jež vedly až ke QCD, zmíníme proto jen klíčové kroky.

Počátkem roku 1964 přišli George Zweig a Murray Gell-Mann s hypotézou, že pozorované vlastnosti kolem stovky baryonů (částic podobných nukleonu) a mezonů (částic podobných mezonu π), jež byly od konce 40. let objeveny, jsou projevem skutečnosti, že všechny tyto čas-

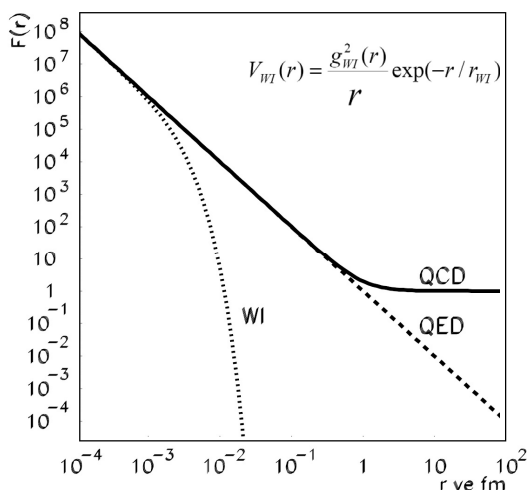
tice jsou složeny ze tří ještě elementárnějších objektů, které Zweig nazval „esa“ a Gell-Mann „kvarky“. Ujal se druhý název, což je dobře, neboť dnes těch vůní kvarků známe šest. Pro popis vlastností hadronů bylo třeba, aby kvarky měly spin $1/2$ a nesly neceločíselné (v jednotkách náboje pozitronu) elektrické náboje. Baryony jsou podle kvarkového modelu tvořeny trojicemi kvarků, zatímco mezony páry kvark-antikvark.

Kvarkový model poskytoval jednoduché vysvětlení pozorovaných hadronů, ale narážel na dva vážné problémy. Prvním byla skutečnost, že všechny známé částice měly celočíselné elektrické náboje. Pro to sice neexistoval žádný hlubší teoretický důvod, ale přesto řada fyziků právě z toho důvodu přijímala kvarkový model od počátku s nedůvěrou. Tato nedůvěra dále rostla s tím, jak selhávaly snahy řady experimentálních skupin najít kvarky jako volné částice.

Druhý problém se týkal kvantitativního popisu některých částic, jako byl například hyperon Ω^- . Potíž byla v tom, že tato částice se spinem $3/2$ se skládá ze tří s-kvarků, které jsou v přesně stejném spinovém stavu, což je v příkrém rozporu s Pauliho principem. Tento problém byl odstraněn zavedením nového kvantového čísla kvarků, které dostalo název „barva“ a které nabývalo tří hodnot. To umožnilo, aby se stavy tří s-kvarků v hyperonu Ω^- lišily právě v barvě a Pauliho princip byl respektován. V optické terminologii tento stav odpovídá „bezbarvé“ kombinaci tří s-kvarků.

Rozhodující krok pro budování teorie sil mezi kvarky učinil Yoichirio Nambu, který jako první pochopil, že barva neslouží jen pro uspokojení Pauliho principu, ale že hraje dynamickou roli. Nambu předpokládal, že síly mezi kvarky jsou zprostředkovány výměnou 8 vektorových bosonů, jež se dnes nazývají gluony. Jeho model poskytoval kvalitativní vysvětlení, proč v přírodě neexistují nejen kvarky, ale všechny takové kombinace kvarků a antikvarků, které jsou „barevné“. Nambuův model měl všechny základní rysy kvantové chromodynamiky. Nebyla to ovšem plnokrevná kvantová teorie pole, ale „jen“ model.

Ani model barevných kvarků však nebyl v druhé polovině 60. let minulého století všeobecně přijat, neboť teoretické předsudky na jedné straně a neúspěch při hledání kvarků na straně druhé byly pro mnohé fyziky vážnými argumenty pro jejich odmítnutí. K tomu pak ještě přistupovala celková atmosféra nedůvěry ke kvantové teorii pole, o níž jsme se již zmínili v části o kvantové elektrodynamice a skutečnost a že při snahách popsat srážky hadronů pomocí poruchové teorie selhávala nejen v principu, ale i v praxi. Řada fyziků odmítala samotnou představu, že nějaké částice by měly být elementárnější, než jiné a přijala doktrínu „jaderné demokracie“, jež hlásala, že všechny mezony a baryony jsou stejně „dobré“. Na počátku 70. let se dokonce zdálo, že i kvarkový model je v posledním tažení, neboť se objevily nové experimentální údaje, které naznačovaly vnitřní rozporuplnost jeho samotných základů.



Obr. 5. Srovnání závislosti silných (QCD), slabých (WI) a elektromagnetických (QED) sil mezi kvarky na vzdálenosti

10. Asymptotická volnost

Dramatická změna v pohledu na užitečnost neabelovských kalibračních teorií nastala, když na jaře 1973 Gross, Wilczek a Politzer ukázali, že v této třídě kvantových teorií pole se příslušný efektivní náboj, analogický efektivnímu elektrickému náboji QED, chová (za určitých okolností) zcela opačně než v QED a na malých vzdálenostech klesá až na nulu. Tato tzv. asymptotická volnost, je přitom přímým důsledkem samointerakce příslušných kalibračních bosonů. Při konstrukci teorie popisující interagující kvarky a gluony je třeba holý náboj se zmenšováním jeho poloměru zmenšovat a to podle vztahu podobného (I), kde je ovšem tentokrát $\beta < 0$. V těchto teoriích tedy vakuum holý náboj nestíní, ale naopak, antistíní! Stačí do vakua vložit infinitezimálně malý holý barevný náboj a to z něj udělá na konečných vzdálenostech konečný efektivní náboj. Tento pozoruhodný efekt je způsoben tím, že ve vakuu „žijí“ nejen virtuální kvark-antikvarkové páry, ale v důsledku samointerakce gluonů i páry virtuálních gluonů.

Vakuum neabelovských kvantových teorií pole se tedy chová podobně jako paramagnetikum, které také magnetické pole vloženého dipólu zesiluje.

11. Kvantová chromodynamika

Teorii silných sil mezi kvarky a gluony, jež se o tento objev opírala, formulovali okamžitě po objevu asymptotické volnosti Grosse, Wilczek, Politzer a Georgi. Její název kvantová chromodynamika (QCD) odráží skutečnost, že tato síla působí jen na částice nesoucí barvu. Poznání, že QCD netrpí problémy, kvůli nimž v polovině 50. let ochladla důvěra v kvantovou teorii pole, znamenalo dramatický přelom a návrat ke QFT jako základnímu teoretickému nástroji při popisu sil v mikrosvětě. V QCD je požadavek lokální kalibrační invariance aplikován na triplet barevných kvarků jedné vůně, jež se transformuje podle reprezentací grupy SU(3), jež má 8 generátorů. Těm odpovídá 8 nehmotných barevných kalibračních bosonů, nazývaných gluony. Gluony samy nesou barvu, proto spolu interagují, podobně jako IVB W^+ , W^- a Z .

V důsledku této samointerakce závisí efektivní barevný náboj v QCD na vzdálenosti způsobem naznačeným na obr. 4. Pokud by QCD existovala sama o sobě, pokračoval by jeho pokles s klesající vzdáleností až do nuly. Jak dále uvidíme, je ale možné, že na vzdálenostech cca 10^{-16} femtometru, nebo i větších, se silné síly „spojí“ s elektromagnetickými a slabými silami.

QCD také dokáže vysvětlit, proč v přírodě neexistují volné kvarky a další systémy kvarků a gluonů, které nejsou „bezbarvé“. Charakter silných sil mezi kvarky, znázorněný na obr. 5, je totiž takový, že na vzdálenostech větších než asi 1 femtometr přestanou klesat a jsou dále zhruba konstantní. I tato vlastnost je – i když velmi netriviálním – důsledkem samointerakce gluonů. Síly mezi pozovi-

rovatelnými hadrony, jež se obvykle nazývají jaderné, jsou v rámci QCD zbytkovými silami sil mezi kvarky a gluony, podobně jako síly mezi molekulami jsou zbytkovými silami elektromagnetických sil mezi elektrony a jádry.

Skutečnost, že kvarky na rozdíl od leptonů neexistují v přírodě jako volné částice, ale jenom jako součást složitějších systémů, a že má přesto smysl o nich mluvit jako o základních stavebních kamenech hmoty, může vyvolávat oprávněné námitky. Jak může „existovat“ něco, co nemůžeme, ani v principu, „vzít do ruky“? Tato námitka byla příčinou pochybností mnoha fyziků o „fyzikální realitě“ kvarků a vedla řadu z nich k přesvědčení, že kvarky jsou jen užitečnou mnemotechnickou pomůckou či matematickým pojmem, který nám usnadňuje některé úvahy.

Dnes je jasné, že kvarky je třeba brát vážně a pracovat s nimi téměř jako s leptony. Tento přístup se opírá o důležité experimentální zjištění. Ačkoliv izolované kvarky z protonu či neutronu vyrazit nelze, pozorujeme, že je-li energie vyraženého kvarku či gluonu dostatečně velká, vylétají ve směru kvarků či gluonů úhlově kolimované svazky částic, nazývané „jety“. Z měření úhlů, energií a dalších vlastností jetů usuzujeme na dynamiku samotných kvarků a gluonů. Jety dnes hrají při hledání zákonů mikrosvětla klíčovou roli, kterou v minulosti hrály jen částice samotné.

12. Jak dál?

Standardní model, jehož základy jsme v předchozích částech nastílnili, je až na stále otevřenou otázku existence Higgsova bosonu, experimentálně prověřen do značných podrobností a poskytuje odpovědi na mnoho otázek týkajících se struktury hmoty a zákonitostí, jež v mikrosvětě platí. Některé zásadní otázky ovšem ponechává nezodpovězeny:

- Jsou kvarky a leptony skutečně fundamentální, nebo i ony mají vnitřní strukturu?
- Proč existují právě tři generace kvarků a leptonů?
- Proč mají takové elektrické náboje a hmotnosti, jaké mají?
- Existují i další síly, o nichž dosud nic nevíme?
- Mají všechny čtyři známé síly společný původ?
- Jak může být gravitace zahrnuta do standardního modelu?

Kromě toho má SM i vážnou vadu na krásu. Obsahuje asi 20 volných parametrů (hmotností kvarků a leptonů, jejich elektrické, slabé a barevné náboje a několik dalších), jejichž hodnoty ze SM neplynou, ale je třeba je vzít z experimentu. To naznačuje, že náš dnešní SM je jen efektivní teorií, relevantní pro popis jevů, které jsme schopni pozorovat a že „pod ním“ existuje hlubší a základnější teorie. To nepřekvapuje, tak tomu ostatně bylo vždy. V minulosti byl ovšem další rozvoj teoretických představ obvykle motivován novými experimentálními poznatky, jež nebylo možné v rámci stávajících teorií vysvětlit. Dnes je situace taková, že neexistuje žádný jev nebo měření,

keré by nebylo možno vysvětlit v rámci SM, a které by rozhodujícím způsobem pomohlo orientovat teoretické úvahy jdoucí za SM. Tato situace je na jedné straně příznivá, neboť ukazuje, že základy dnešní SM jsou pevné, ale na druhé straně v minulosti to byla vždy experimentální hádanka, co motivovalo teoretický pokrok. V takové situaci je přirozené, že se hnacím motorem teorie v posledních zhruba 20 letech staly snahy vybudovat teorii, která by byla nejen matematicky konzistentní a v jistém smyslu „krásná“, ale která by také odpověděla aspoň na některé z výše uvedených otázek. V dalším nastíníme několik hlavních směrů, jimiž se současná teorie ubírá. Jak uvidíme, každý z nich narušuje jeden z pilířů, na nichž je dnešní SM vybudován.

13. Jsou kvarky a leptony skutečně elementární?

Tuto otázku si začali fyzikové klást koncem 70. let, poté, co byly objeveny první dvě částice z dnešní 3. generace: kvark b a lepton τ . Dvojnásobná replikace základních rysů první generace kvarků a leptonů vedla mnohé teoretiky k myšlence, že kvarky a leptony by mohly být složeny z ještě elementárnějších objektů, kterým se genericky říká preony. Tato představa byla dále motivována snahou pochopit vztah mezi elektrickými náboji kvarků a elektronu. Počátkem 80. let se objevila řada modelů, které se snažily tuto myšlenku různými způsoby konkretizovat a dát jí i dynamický obsah.

Jako příklad uvedme model, v němž jsou nejen leptony a kvarky, ale i kalibrační bosony složeny ze dvou fundamentálních fermionů se spinem $\frac{1}{2}$, tzv. rishonů (v Hebrejštině primární), z nichž jeden má elektrický náboj $\frac{1}{3}$ a druhý je elektricky neutrální. K nim existují v tomto modelu přirozeně i dva antirishony. Nebudeme se zde tímto modelem podrobněji zabývat, jen poznamenejme, že v něm může probíhat např. i proces $u + u \rightarrow e^+ + \bar{d}$, v němž se dva kvarky u přemění na pozitron e^+ a antikvark \bar{d} . Tento proces je přitom ve SM absolutně zakázán, neboť se v něm nezachovává baryonové číslo (viz kap. 3).

Model rishonů uvádíme jen jako příklad, kudy se úvahy o substruktuře kvarků a leptonů ubíraly. I když se nepodařilo na myšlence substrukturní kvarků a případně leptonů vybudovat skutečnou matematicky konzistentní a fyzikálně relevantní teorii, má jistě stále smysl tuto možnost zkoumat experimentálně. Zatím ovšem neexistují žádné experimentální příznaky, že kvarky a leptony nějakou substrukturu skutečně mají.

14. Teorie velkého sjednocení

Jedná se o třídu teorií, které se snaží sjednotit elektromagnetické, slabé a silné síly v rámci jedné kalibrační grupy. Prvním krokem v tomto směru byla teorie Glashowa, Weinberga a Salama z konce 60. let, která sjednoti-

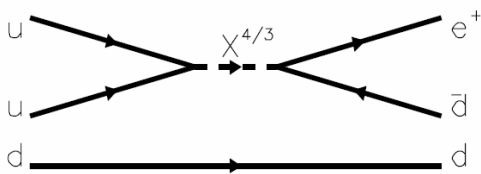
la elektromagnetické a slabé síly do jedné teorie, o níž jsme se již zmínili (teorie GWS). Krátce po formulaci QCD přišli v roce 1974 Sheldon Glashow s Howardem Georgi s radikální, přímo kacířskou, myšlenkou, jež spočívala v tom, že všechny kvarky a leptony jedné generace i jejich antičástice jsou jen různé stavy jednoho fundamentálního fermionu a elektromagnetické, slabé a silné síly jsou jen různé projevy téže „prasily“.

Tato myšlenka byla motivována chováním efektivních nábojů elektromagnetických, slabých a silných sil, znázorněných na obr. 4. Tvar křivek je dán teorií, ale jejich vertikální umístění odráží experimentální hodnoty efektivního elektrického, slabého a silného (barevného) náboje. Vidíme, že na vzdálenostech okolo 10^{-16} fm jsou všechny tři efektivní náboje stejné. Poznamenejme, že tato tzv. škála velkého sjednocení, je jen asi desettisíckrát delší než Planckova škála 10^{-33} cm, charakterizující gravitační síly.

Na vzdálenostech 10^{-30} cm podle teorií velkého sjednocení (GUT z anglického Grand Unified Theories) působí vedle elektromagnetických, slabých a silných sil i síly, zodpovědné za přechody kvark \leftrightarrow lepton a kvark \leftrightarrow antikvark. Tyto síly, jež jsou ve SM striktně zakázány, jsou zprostředkovány výměnou kalibračních bosonů, označovaných X. Protože působí jen na vzdálenostech menších než 10^{-15} fm, musí být velmi těžké, zhruba 10^{15} GeV, a nesou i exotické elektrické náboje: $\pm 5/3$, $\pm 4/3$, $\pm 1/3$. Konkrétní počet těchto těžkých kalibračních bosonů závisí na tom, kterou konkrétní grupu symetrie vezmeme. V současné době jsou nejjednodušší varianty GUT vyloučeny experimentem, ale přesto většina teoretiků je přesvědčena, že jejich základní myšlenka je správná. Mimo jiné i proto, že procesy narušující baryonové číslo jsou vedle narušení CP invariance druhým nezbytným předpokladem pro pochopení vzniku převahy hmoty nad antihmotou v našem vesmíru.

Sjednocení elektromagnetických, slabých a silných sil v rámci GUT hraje podle dnešních představ klíčovou roli i v teorii velkého třesku. Proces, při němž se z jedné „prasily“ vydělily elektroslabé a silné síly, byl zřejmě i hnacím motorem dramatické etapy vývoje ranného vesmíru, během níž v době, kdy bylo vesmíru asi 10^{-43} s, došlo k exponenciálnímu nárůstu jeho velikosti. Tato tzv. inflace vesmíru poskytuje základní rámec pro vyřešení několika závažných problémů standardního modelu velkého třesku, jako jsou problém horizontu, plochosti současného vesmíru a další. Pro moderní kosmologii jsou teorie velkého sjednocení nepostradatelné.

Generickým a dramatickým důsledkem GUT je předpověď, že proton není stabilní! Nejjednodušší proces, jenž vede k rozpadu protonu, je znázorněn na obr. 6: dva kvarky u, které spolu s kvarkem d tvoří proton, se přemění na pár pozitron a antikvark \bar{d} , jenž se následně spojí s kvarkem d a vytvoří neutrální mezon π^0 . Všimněme si, že jde o stejný proces, jako ve výše popsaném modelu substrukturní kvarků a leptonů. Na rozdíl od modelu rishonů však zde je dynamický důvod, proč tyto procesy jsou silně potlačeny. Rozpad protonu na mezon π^0 a pozitron je je-



Obr. 6. **Rozpad protonu v teoriích velkého sjednocení;** dvojice kvarků uu anihiluje na těžký kalibrační boson s nábojem $4/3$, jenž se poté přemění na pozitron a antikvark \bar{d} . Ten spolu s kvarkem d z původního protonu vytvoří mezon π^0

nom jeden z možných módů, ale mód velmi charakteristický, při němž se přemění asi 85 % klidové hmotnosti protonu na kinetickou energii jeho rozpadových produktů. Kdyby se tento proces podařilo využít ve velkém, bylo by o zdroj energie postaráno.

Tento a další módy rozpadu protonu se hledaly již od počátku 80. let v řadě experimentů na exotických místech, jako jsou doly či boční kaverny tunelu pod Mont Blancem. Přes veškerou snahu zatím žádný rozpad protonu zaznamenaný nebyl, což umožnilo stanovit spodní mez asi 10^{33} let na dobu jeho života. Vzhledem ke stáří vesmíru, jež se odhaduje na 13 miliard let a skutečnosti, že v našem těle máme zhruba 10^{29} protonů a neutronů, je jasné, že nám nebezpečí rozpadu nehrozí. Přesto, je-li v myšlence GUT zdravé jádro, proton se rozpadat musí. Kdo to experimentálně prokáže, má Nobelovu cenu jistou.

15. Supersymetrie

Skutečnost, že systémy identických bosonů a fermionů mají zásadně jiné vlastnosti symetrie, byla dlouho považována za projev principálního rozdílu mezi těmito dvěma třídami částic. V souvislosti s rozvojem GUT a snahami zahrnout do těchto teorií i gravitaci se však situace změnila. Obrovský rozdíl mezi škálou velkého sjednocení, tj. 10^{15} GeV, a škálou elektroslabého sjednocení, 10^3 GeV, nazývaný problém hierarchie, vyžadoval velmi jemné „vyladění“ parametrů GUT. Tomu se lze vyhnout za předpokladu, že ke každé částici SM, kvarkům, leptonům i kalibračním bosonům, existuje tzv. „supersymetrický partner“, částice, jejíž spin se liší o $1/2$. Tedy ke kvarkům a leptonům „skvarky“ a „sleptony“ se spinem 0, ke kalibračním bosonům „sbosony“ („wino“, „zino“ a „gluino“) se spinem $1/2$ a k Higgsovu bosonu „higgsino“ rovněž se spinem $1/2$.

Matematický formalismus, na němž je tato myšlenka založena, jsou tzv. gradované algebry, či „superalgebry“. Kvantová teorie pole, která myšlenku supersymetrie zahrnuje, byla v posledních letech intenzivně rozpracována. Její nejjednodušší varianta, která se nazývá „minimální supersymetrický standardní model“ (MSSM), představuje přirozené a minimální rozšíření dnešního SM. V této teorii se těžší supersymetrické částice rozpadají na lehčí a částice SM, přičemž nejlehčí supersymetrická částice musí být

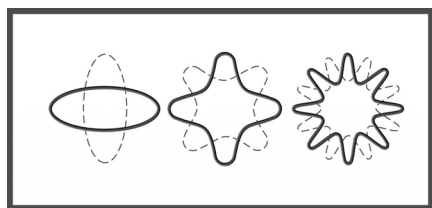
absolutně stabilní. Podobně jako u částic SM, samotná myšlenka supersymetrie neposkytuje žádnou informaci o tom, jaké mají být klidové hmotnosti supersymetrických partnerů standardních kvarků, leptonů a kalibračních bosonů. Hledání supersymetrických částic bylo a je spolu s hledáním Higgsova bosonu hlavním cílem většiny experimentů na urychlovačích. Přes veškerou snahu se zatím supersymetrické částice najít nepodařilo. Pokud existují, musí být proto těžké, spodní mez na nejlhčí z nich je asi 50 GeV. Narušení supersymetrie hmotnostmi částic je tedy značné a vzniká tak přirozená otázka, jaký mechanismus je za tento velký rozdíl zodpovědný.

Pátrání po supersymetrických částicích a prověřování dynamiky jejich produkce ve srážkách „normálních“ částic bude jedním z hlavních cílů experimentů na urychlovači LHC, jenž se buduje v Evropském středisku fyziky částic CERN v Ženevě a jenž bude uveden do provozu koncem roku 2008. Mezi teoretiky převažuje názor, že pokud je příroda skutečně supersymetrická, musí experimenty na LHC aspoň ty nejlhčí supersymetrické partnery částic SM najít. V každém případě je velká naděje, že do konce desetiletí budeme mít v této otázce jasno. Bude to zajímat i astrofyziky a kosmology, neboť nejlehčí neutrální supersymetrická částice, tzv. neutralino, je žhavým kandidátem na vysvětlení podstaty temné hmoty ve vesmíru, jednoho z ústředních problémů současné kosmologie. Ale to už bychom se dostali příliš daleko.

16. (Super)struny

Ve SM jsou základními objekty kvantovaná pole, závislé na prostoročasových souřadnicích. Koncem 60. let se zdálo, že některé vlastnosti protonů, neutronů a mezonů lze jednoduše vysvětlit, předpokládáme-li, že se chovají jako struny v třírozměrném prostoru o délce řádově femtometr. Brzy se ovšem ukázalo, že takto protony chápat nelze a strunový model hadronů byl opuštěn. Počátkem 80. let se struny do fyziky vrátily, ale nikoliv pro popis hadronů, ale jako základní objekt teorií, které se snažily do GUT zahrnout i gravitaci. Tyto struny měly ovšem rozměry Planckovy škály, tj. 10^{-33} cm, a byly tedy zhruba o 20 řádů menší než je rozměr protonu. Superstruny „nežijí“ také v obvyklém 3-rozměrném prostoru, ale ve vícerozměrném prostoru a obvykle zahrnují i supersymetrii. Existují přitom otevřené i uzavřené superstruny.

Protože my jsme schopni vnímat jen tři prostorové a jednu časovou dimenzi, musí být další dimenze „svinuty“ (odborně „kompaktifikovány“) na velmi malé ruličky, jejichž velikost je typicky 10^{-33} cm. Vibrační excitace takových strun (viz. obr. 7) se při pohledu z dálky, tj. s malou rozlišovací schopností, jeví jako bodové částice s různou klidovou hmotností závislé na vibračním módu. Kromě nejnižší mají vyšší excitace hodnoty hmotnosti řádově 10^{19} GeV a jsou tedy pro nás experimentálně nedostupné. Základní předností těchto teorií je, že mohou poskytnout klíč ke sjednocení teorie gravitace s kvantovou teorií. Klasická teorie gravitace je totiž přirozenou limitou

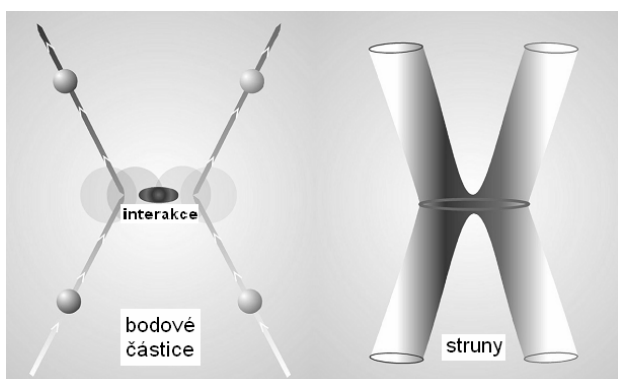


Obr. 7. Vibrační stavy jednorozměrné uzavřené struny v rovině; vlevo základní stav s nejnižší energií, uprostřed a vpravo první dva excitované stavy

kvantových teorií strun na velkých vzdálenostech. O teoriích, v nichž jsou struny a další dimenze velikosti Planckovy škály, pojednává kniha Briana Greena *Elegantní vesmír*⁵.

Základní předností teorie strun je v tom, že se v ní neobjevují nekonečna, o nichž jsme se zmínili v souvislosti s definicí efektivního elektrického náboje a které jsou důsledkem lokálního charakteru sil mezi bodovými částicemi. Jak ukazuje obr. 8, v teorii strun není žádná interakce bodová prostě proto, že samy základní objekty nejsou bodové.

Teorie superstrun doznala v posledních letech obrovského rozvoje při zkoumání jejích matematických aspektů. Došlo ovšem také k výraznému posunu, pokud jde o prediktivní sílu těchto teorií. Zatímco před dvaceti lety se zdálo, že, zjednodušeně řečeno, konzistentních teorií superstrun je jen několik, a že tedy ze samotné myšlenky superstrun dostaneme „Teorii všeho“ skoro jednoznačně, dnes je jasné, že je tomu spíše naopak. Teorie superstrun jsou matematicky tak mocné, že jsou v jistém smyslu schopné popsat téměř cokoliv, resp. korelovat teorie tak fyzikálně vzdálené, jako je kalibrační teorie ve čtyřech rozměrech s matematickými strukturami, které



Obr. 8. Rozptyl dvou uzavřených strun ve třech rozměrech (vpravo); na obrázku vlevo je analogický proces pro bodové částice

s prostoročasem vůbec nepracují!

Z Greeneovy knížky se čtenář také dozví, že teorie superstrun je velmi ambiciózní i pokud jde o oněch asi 20 volných parametrů SM (hmotností, nábojů a dalších), o nichž jsme se již zmínili. Ty všechny slibuje teorie superstrun spočítat ze svých „prvních principů“. Důležitou roli přitom má hrát geometrie a topologie prostoročasu s dalšími dimenzemi. Tak například počet generací kvarků a leptonů by měl být dán Eulerovým číslem charakterizujícím topologii variety šesti kompakťovaných prostoročných dimenzí. To všechno je možné, ale já si to představit neumím. Mimo jiné i proto, že supersymetrie do hry přináší řadu (stovky až tisíce) nových těžkých částic, jejich hmotnosti bude třeba také spočítat. Dosud neexistuje ani náznak, jak z teorie superstrun spočítat aspoň poměr hmotností elektronu a mionu.

Zdůrazněme, že další dimenze nikdy v obvyklém slova smyslu „neuvídíme“ a na jejich existenci můžeme usuzovat jedině srovnáním měření v našem třírozměrném prostoru s předpověďmi SM a teorií strun či jinou teorií pracující ve vícerozměrném prostoru.

17. Teorie s velkými dalšími dimenzemi

Skutečnost, že žijeme a jsme schopni vnímat právě tři prostorové a jednu časovou dimenzi, je tak zjevná, že dlouho nikoho ani nenapadlo formulovat fyzikální teorie v jiném prostoru. Až v roce 1919 přišel Theodor Kaluza^d s kacířskou myšlenkou, že prostor může být více než třírozměrný^e. Byl veden snahou odvodit Einsteinovu teorie gravitace i Maxwellovu teorii elektromagnetického pole z jednoho rámce. Podařilo se mu ukázat, že obě tyto teorie plynou z Einsteinových rovnic obecné teorie relativity formulovaných v pětirozměrném prostoročase a to dokonce bez přítomnosti hmotového členu. Kaluza ovšem pracoval v rámci klasické teorie pole a čtvrtá prostorová dimenze v jeho teorii byla do značné míry formální, bez hlubšího fyzikálního obsahu, neboť polní veličiny na ní nezávisely.

Na jeho práci navázal v roce 1926 Oskar Klein, který Kaluzovu myšlenku oblékl do kvantového hávu a přidal fyzikální obsah čtvrté prostorové dimenzi. Ta je podle něj svinuta do kruhu o velmi malém poloměru, řádově rovném Planckově délce 10^{-33} cm. Díky tomu jsou energie odpovídající excitacím v této dimenzi kvantovány v násobcích Planckovy hmotnosti, tj. 10^{19} GeV. Výsledná Kaluzova-Kleinova teorie se stala prototypem všech dalších pokusů formulovat zákony mikrosvěta ve vícerozměrném prostoročase, včetně teorie (super)strun. Skutečnost, že čtvrtá a další prostorové dimenze mají v těchto teoriích velikost Planckovy škály však prakticky vylučuje přímou detekci jejich projevů.

K důležitému posunu ve snaze sjednotit gravitační

^d Ještě před Kaluzou a ovšem i před formulací Einsteinovy teorie gravitace se o to pokusil v roce 1914 Nordström.

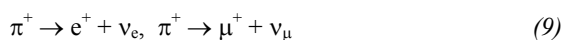
^e Vícerozměrný je vždy jen prostor, čas je ve všech moderních teoriích jednorozměrný.

sil s ostatními silami SM a vyřešit problém hierarchie došlo v roce 1998. Několik autorů tehdy přišlo s myšlenkou, že kromě tří obvyklých „rozvinutých“ dimenzí, existuje dalších n svinutých dimenzí, které mají ve srovnání s Planckovou délkou velký poloměr R a jimiž se šíří jen gravitace. V tomto rámci není Planckova délka fundamentální škálou, ale pouhý přelud, který vznikne, pokud gravitaci popisujeme ve třech prostorových rozměrech. Počet N dalších dimenzí a hodnota jejich poloměru R jsou v tomto přístupu volné parametry, které je třeba určit z experimentu.

Nemáme zde prostor na podrobnější rozbor této fascinující myšlenky, jen poznamenáme, že v rámci této představy hrají gravitační síly důležitou roli možná již na vzdálenostech 10^{-17} cm, jež budou brzy experimentálně dostupné na urychlovači LHC v CERN. Některé jejich projevy by byly vskutku dramatické a v mnohém by připomínaly okolnosti zrodu hypotézy neutrina počátkem 30. let. Při srážkách dvou protonů na LHC bychom například zjistili, že celková energie částic, které jsme schopni detegovat v koncovém stavu, není rovná celkové energii protonů před srážkou. Energie by se v našem třírozměrném prostoru nezachovávala, neboť v teoriích s velkými dalšími dimenzemi by část energie a hybnosti „odnesl“ graviton do dimenzí, kam my „nevidíme“.

18. První pozdrav z Nového světa?

V roce 2002 získali Nobelovu cenu za fyziku Raymond Davis a Masatoshi Koshiba za objevy, které se týkají vlastností neutrin a role, kterou neutrina v přírodě hrají. Jejich životní osudy a ságy jejich objevů jsou fascinující a zasloužily by si samostatný článek, my zde ovšem máme prostor jen na krátké shrnutí jejich hlavního důsledku. Tím je poznání, že neutrina mají nenulové klidové hmotnosti. Ve SM jsou přítom všechny tři neutrina nehmotná. Hodnoty uvedené v závorkách v tab. I jsou jen horní meze plynoucí z měření energií rozpadových produktů. Připomeňme, že elektronové neutrino ν_e a mionové neutrino ν_μ jsou stavy, které doprovázejí při rozpadech nabitých pionů elektron či mion



Na rozdíl od fotonu, jehož nulová klidová hmotnost je přímým důsledkem požadavku kalibrační invariance, u neutrin se žádný takový „vyšší princip“ najít nepodařilo. A protože co není zakázáno, je dovoleno, není existence nenulových klidových hmotností neutrin v rozporu s ničím posvátným.

Experimenty Davise a Koshiby ukázaly, že stavy označované ν_e , ν_μ a ν_τ nejsou vlastními stavy Hamiltoniánu, tj. nemají dobře definovanou klidovou hmotnost. Tu mají stavy označované ν_1 , ν_2 a ν_3 , jejichž lineárními kombinacemi stavy ν_e , ν_μ a ν_τ jsou (pro jednodušší případ smíšení dvou neutrin)

$$\nu_e \equiv \nu_1 \cos \theta + \nu_2 \sin \theta, \quad \nu_\mu \equiv -\nu_1 \sin \theta + \nu_2 \cos \theta \quad (10)$$

kde θ je tzv. směšovací úhel. Pokud jsou hmotnosti m_1 , m_2

a m_3 různé, dochází díky tomu k „oscilaci neutrin“, pozoruhodnému kvantovému jevu, při němž se např. stav ν_e , který vznikl při rozpadu pionu na pozitron, během časového vývoje mění na lineární superpozici ν_e a ν_μ (v případě, že uvažujeme jen dvě neutrina), až se z něj stane ν_μ a po čase zase zpět ν_e . Perioda této oscilace závisí na rozdílu hmotností $\Delta m^2 \equiv m_1^2 - m_2^2$ a úhlu θ .

Oscilace elektronového neutrina na mionové neutrino vysvětluje skutečnost, že ze Slunce k nám na Zemi dopadá jen asi polovina toku neutrin, který očekáváme na základě dnešních znalostí mechanismu spalování vodíku na hélium v jeho nitru. Tento tzv. deficit slunečních neutrin pozoroval Davis již od konce 60. let pomocí metody, která opírala o radiochemický proces vypírání atomů radonu z tetrachlorethylenu. Davis, který byl svým založením chemik, dokázal tímto způsobem neuvěřitelné: v nádrži s 400 tisíci litry tetrachlorethylenu našel jednou za zhruba 2 měsíce 10–20 atomů argonu, které vznikly v reakci $\nu_e + {}^{37}\text{Cl} \rightarrow {}^{38}\text{Ar} + e^-$. Jeho pozorování potvrdily a výrazně rozšířily experimenty Koshiby v Japonsku. Je krásnou ilustrací přísloví „šťěstí přeje připraveným“, že svůj první detektor Koshiba postavil ze zcela jiných důvodů než Davis: šlo mu o hledání rozpadu protonu, o němž jsme se již zmínili. Od spuštění v roce 1983 do roku 1995 Koshibův detektor žádný rozpad protonu nezaznamenal, ale za to zachytil a velmi přesně proměřil tok slunečních neutrin.

V současné době všechny experimenty s neutrinou, slunečními, z urychlovačů i reaktorů ukazují na to, že $\Delta m_s^2 \equiv m_1^2 - m_2^2 \cong 10^{-4}$ eV a $\Delta m_a^2 \equiv m_2^2 - m_3^2 \cong 10^{-3}$ eV. I když zatím neznáme absolutní hodnoty hmotností, z experimentů s β -rozpadem tritia je jasné, že ani jedna z hmotností m_1 , m_2 , m_3 nemůže být větší než asi 3 eV. To znamená, že ve druhé a třetí generaci jsou hmotnosti neutrálních leptonů o mnoho řádů (osm u druhé a devět u třetí) menší než hmotnosti jejich nabitých partnerů elektronu, mionu a tauonu. Ve srovnání s poměry hmotností kvarků s náboji $2/3$ a $-1/3$ je tento nepoměr zarážející. Existují argumenty, byť ne zcela přesvědčivé, že tato skutečnost je nepřímým důkazem správnosti myšlenek teorií velkého sjednocení a prvním experimentálním náznakem „nové fyziky“.

19. Závěr

Nových myšlenek a hypotéz o tom, jak je příroda na velmi malých vzdálenostech uspořádána a jakými zákony se tam řídí, je tedy dnes řada. Některé z nich jsou konzervativní, jiné přímo fascinující. Fyzika je ovšem empirická věda, a tak o tom, zda kvarky a leptony jsou složené z ještě menších částic, nebo zda v mikrosvětě vládne supersymetrie, superstruny či dokonce velké další dimenze, rozhodne nakonec experiment. Proto je s takovým napětím očekáváno spuštění urychlovače LHC v CERN, jež bude na dlouhou dobu jediným zařízením, na kterém bude možno projevy „nové fyziky“ pozorovat. Experimentální zařízení, pomocí nichž se budou projevy „nové fyziky“ hledat,

jsou ovšem neméně fascinující, než jevy, jež budou hledat. Základní informace o nich najde čtenář například v článku⁴.

Děkuji Pavlu Kolářovi za kritické přečtení článku a řadu užitečných připomínek.

S e z n a m z k r a t e k

- SM standardní model. Shrnutí současných znalostí o mikrosvětě a silách v něm působících. Zahnuje teorii elektroslabých sil Glashowa, Salama a Weinberga a kvantovou chromodynamiku, teorii silných sil. S ohledem na jeho experimentální prověřenost by bylo vhodnější říkat „standardní teorie“.
- IVB intermediaální vektorové bosony. Částice se spinem 1, které ve standardním modelu zprostředkují všechny síly.
- QED (z anglického „Quantum Electrodynamics“) – kvantová elektrodynamika, kvantová teorie pole popisující elektromagnetické síly.
- QFT (z anglického „Quantum Field Theory“) – kvantová teorie pole.
- CP (z anglického „Charge and Parity“) – operace zrcadlení prostorových souřadnic a současné záměny částice↔antičástice.
- QCD (z anglického „Quantum Chromodynamics“) – kvantová chromodynamika, kvantová teorie pole popisující silné síly.
- LEP (z anglického „Large Electron and Positron collider“) – kruhový urychlovač o obvodu 27 km v CERN, na němž se v letech 1989–2000 srážely protiběžné svazky elektronů a pozitronů s energiemi až 100 GeV. Ve čtyřech experimentech, které na tomto urychlovači běžely, byly hledány supersymetrické částice a Higgsova boson.
- GUT (z anglického „Grand Unified Theories“) – teorie „velkého sjednocení“, které sjednocují elektromagnetické, slabé a silné síly v rámci jedné neabelovské kalibrační teorie.
- MSSM (minimální supersymetrický standardní model) – minimální rozšíření dnešního standardního modelu o supersymetrické partnery kvarků, leptonů, kalibračních bosonů a Higgsova bosonu.
- LHC (z anglického „Large Hadron Collider“) – urychlovač, v jehož tunelu, kde byl dříve umístěn urychlovač LEP, se budou od roku 2008 srážet dva protiběžné svazky protonů, každý s energií 7000 GeV.

LITERATURA

1. Hořejší J.: <http://www-ucjf.troja.mff.cuni.cz/~horejsi/popular/smodel.ps>
2. Chýla J.: Pokroky matematiky, fyziky a astronomie 50, 2 (2005).
3. Chýla J.: Čs. čas. fyz. 53, 215 (2003).
4. Chýla J.: Čs. čas. fyz. 55, 293 (2005).
5. Greene B.: *Elegantní vesmír*. Edice Kolumbus, Mladá fronta, Praha 2001.

J. Chýla (*Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Quarks with Colour and Smell and What Next ?**

The current status of our knowledge of the structure of matter at the fundamental level and of the laws governing the microworld, encompassed in the Standard Model, is reviewed. The basic features of electromagnetic, weak and strong forces acting among the fundamental building blocks of matter, quarks and leptons, are all shown to result from a single guiding principle: the requirement for local gauge invariance. This principle is also behind the attempts at unifying these forces within the framework of the Grand Unified Theories. These theories, where quarks and leptons are merely different states of the same fundamental fermion, imply instability of protons and neutrons, the feature that may have played a crucial role at the early stage of the Big Bang. For about 30 years, much attention has also been devoted to theoretical development and experimental testing of the idea of supersymmetry. This idea, which relates fermions to bosons, assumes that all particles of the Standard Model have partners which differ in spin by 1/2. So far no supersymmetric partners of quarks, leptons or gauge bosons have been found, but experiments at CERN should answer in the near future the question whether nature is, indeed, supersymmetric. Supersymmetry is also an integral part of the string theories, which go even further beyond the Standard Model and assume that the basic structures of matter are not one-dimensional particles, but two-dimensional strings, moving, moreover, in space with more than three dimensions. The idea that the laws of nature may be simple when formulated in space with extra dimensions is the most fascinating consequence of the present particle theory since it provides the basic framework for unification of all forces, including gravity.

CÍLENÝ POSUN ČTECÍHO RÁMCE – TRANSLACE ALTERNATIVNÍCH PRODUKTŮ

ZDENA SMÉKALOVÁ a TOMÁŠ RUML

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3,
166 28 Praha 6
smekaloz@vscht.cz, tomas.ruml@vscht.cz

Došlo 12.3.06, přijato 11.5.06.

Klíčová slova: posun čtecího rámce, translace, ribosom, mRNA, retrovirus

Obsah

1. Úvod
2. Typy cíleného posunu čtecího rámce
3. Mechanismus posunu čtecího rámce
 - 3.1. Cílený (+1) posun čtecího rámce u prokaryot
 - 3.2. Cílený (+1) posun čtecího rámce u eukaryot
 - 3.3. Cílený (–1) posun čtecího rámce u eukaryot
 - 3.4. Role mRNA
 - 3.5. Role modifikovaných tRNA
 - 3.6. Inhibice peptidyltransferasy
4. Uměle stimulovaný (–1) posun čtecího rámce
5. Závěr

1. Úvod

Přestože translace mRNA je velmi přesným a dobře regulovaným procesem, dochází k chybám i na této úrovni^{1–3}. K zařazení nesprávné aminokyseliny do molekuly proteinu dochází s četností nižší než $3 \cdot 10^{-3}$. Ve většině případů má záměna jedné aminokyseliny minimální vliv na funkci či aktivitu daného proteinu, což může být jedním z důvodů, proč nedošlo k vývoji přesnějšího mechanismu výběru aminoacyl-tRNA při translaci. Translační chyby se změněným smyslem mohou být způsobeny buď vazbou nesprávné aminokyseliny na tRNA pomocí aminoacyl-tRNA synthetasy nebo inkorporací nesprávné, tj. kodonu neodpovídající, tRNA do aminokyselinového (A) místa ribosomu. Taková tRNA se zpravidla páruje s kodonem pouze dvěma bázemi, což může mít v důsledku degenerovaného genetického kódu za následek zařazení strukturálně podobné (někdy i těžce) aminokyseliny vzhledem k aminokyselině kódované.

Vážnější jsou chyby vedoucí k předčasné terminaci translace, například spontánní disociací peptidyl-tRNA

z peptidového (P) místa ribosomu v důsledku zařazení nesprávné aminoacyl-tRNA. Chyby vedoucí ke změně čtecího rámce mívají rovněž fatální důsledky pro syntézu funkčního proteinu. Důvodem je kompletní změna sekvence od místa posunu a předčasná terminace v důsledku častého výskytu stop kodonů v posunutých, nekódujících čtecích rámcích. Četnost výskytu chyb v důsledku posunu čtecího rámce je nižší, asi $3 \cdot 10^{-5}$, než výskyt chyb se změněným smyslem nebo disociací peptidyl-tRNA^{2–4}.

Určité motivy mRNA účinně stimulují děje podobné translačním chybám, jejichž četnost je pak o několik řádů vyšší. Jistý podíl ribosomů pak pokračuje v translaci ve čtecím rámci posunutém o (–1) nebo (+1) nukleotid nebo dokonce po vynechání určitého úseku mRNA. Jiné motivy mRNA stimulují pročtení stop kodonu^{2–6}. Účinnost posunu čtecího rámce se pohybuje v rozmezí od 1 % do 50 % v závislosti na strukturálních motivech mRNA, které místu posunu čtecího rámce předcházejí nebo je následují. Tyto sekvence zpomalují proces translace, a tak zvyšují pravděpodobnost posunu čtecího rámce, který je při normální rychlosti translace velmi nepravděpodobný. Jde tedy o kineticky řízené procesy².

2. Typy cíleného posunu čtecího rámce

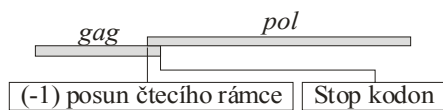
Typy posunu čtecího rámce lze klasifikovat podle mechanismu (posun o jeden nukleotid ve směru nebo proti směru translace) nebo podle polohy místa posunu v genu a s tím souvisejícího vlivu na předčasnou terminaci a vznik funkčního proteinu. Dle jejich fyziologického významu klasifikujeme posuny čtecích rámců do tří tříd².

Třída 1

K posunu čtecího rámce první třídy dochází před 3' koncem genu. Většina ribosomů překládá celý gen v jednom čtecím rámci a k terminaci je využit stop kodon daného genu. Malé procento ribosomů však před koncem prvního genu změni čtecí rámec a pokračuje v translaci v novém (posunutém) čtecím rámci stovky až tisíce nukleotidů za stop kodon genu překládaného v původním čtecím rámci. Účelem takového posunu čtecího rámce je syntéza proteinů, které sdílejí stejnou N-terminální část. C-Terminální prodloužení může způsobit pozměněnou biologickou aktivitu nebo jinak ovlivnit funkci N-terminální části.

Velmi detailně je posun čtecího rámce tohoto typu prostudován u retrovirů, kde se uplatňuje při regulaci vzájemného poměru strukturálních proteinů tvořících schránku kapsidy a retrovirových enzymů, jichž je zapotřebí řádově menší množství. Zralý virion obsahuje strukturální proteiny tvořící kapsidu: matrixový, kapsidový, nukleokapsidový, které jsou společné všem retrovirům a některé další proteiny specifické pro jednotlivé retroviry. Tyto proteiny jsou

Uspořádání genů *gag* a *pol* v genomu HIV-1 po přepisu do mRNA:



Polyproteinové prekurzory:



Obr. 1. Schematické znázornění uspořádání genů *gag* a *pol* v genomu viru lidské imunodeficiencie (HIV-1); gen *gag* kóduje základní polyproteinový prekurzor Gag (A), při jehož syntéze nedochází k posunu čtecího rámce. Produkty genu *pol* jsou syntetizovány ve fúzi s produktem genu *gag* za vzniku polyproteinu Gag-Pol (B), v důsledku posunu čtecího rámce před koncem genu *gag* o jeden nukleotid zpět

ve virionu přítomny v ekvimolárním množství, neboť vznikají specifickým štěpením společného polyproteinového prekurzoru (Gag). Všechny retroviry obsahují také enzymy: proteasu, reversní transkriptasu a integrasu^{7,8}, které jsou kódovány společným genem (*pol*) a vznikají tedy také nejprve ve formě prekurzoru. Obecně, genom retrovirů obsahuje geny *gag*, *pol* (obr. 1) a *env* (kódující transmembránové glykoproteiny, které vznikají ze sestřižené RNA a nepodléhají tedy posunu čtecího rámce, proto o nich není v tomto přehledu pojednáno). U většiny retrovirů vzniká prekurzor retrovirových enzymů (z genu *pol*) ve formě fúzního produktu s polyproteinem Gag, tedy jako Gag-Pol.

Při translaci většina ribosomů využije k terminaci stop kodon genu *gag* a syntetizuje pouze polyprotein Gag. U 5–20 % ribosomů dochází před koncem genu *gag* k posunu čtecího rámce o jeden nukleotid zpět, a tak se stop kodon genu *gag* dostává mimo čtecí rámec. Tyto ribosomy pokračují v translaci genu *pol*, za vzniku fúzního polyproteinu Gag-Pol. Tento mechanismus zajišťuje stejnou *N*-terminální část polyproteinů Gag i Gag-Pol, která je nezbytná pro jejich inkorporaci do nezralé virové částice. Účinnost posunu čtecího rámce je u jednotlivých druhů retrovirů dána fyziologicky, a tak je zajištěn správný poměr strukturních proteinů a enzymů, jehož zachování je nezbytné pro vznik zralé infekční virové částice.

Tento typ (–1) posunu čtecího rámce se uplatňuje také při expresi minoritního kapsidového proteinu bakteriofága T7, infikujícího *Escherichia coli*². Vzniká tak alternativní forma hlavního kapsidového proteinu. Podobný jev byl pozorován např. u hlavního kapsidového proteinu bakteriofága A2 *Lactobacillus* A2 (cit.⁹).

Třída 2

Posun čtecího rámce druhé třídy má jiný účel než

první typ a výsledkem je zkrácená forma proteinu. V původním čtecím rámci vzniká funkční protein, ale ribosomy posunuté do nového čtecího rámce syntetizují kratší formu s odlišnou funkcí. Např. expresí genu *dnaX* *E. coli* v původním čtecím rámci vzniká protein DnaX, který má 640 aminokyselin a tvoří τ podjednotku DNA polymerasy III. Přibližně polovina ribosomů je po inkorporaci 430. aminokyseliny posunuta do čtecího rámce (–1), ve kterém připojí jedinou aminokyselinu a poté dojde k terminaci na kodonu UGA za vzniku γ podjednotky enzymu^{5,10}.

Třída 3

K posunu čtecího rámce třetího typu dochází krátce po iniciaci translace a pouze protein syntetizovaný v posunutém čtecím rámci je biologicky aktivní. Ribosomy, které pokračují v translaci v původním čtecím rámci, produkují nefunkční protein. Příkladem je exprese genu *prfB*, který kóduje uvolňovací faktor 2 (RF2) *E. coli*. Posun čtecího rámce zde umožňuje autoregulaci exprese genu (viz níže).

3. Mechanismus cíleného posunu čtecího rámce

Elongaci polypeptidového řetězce, při níž dochází k posunu čtecího rámce, lze zjednodušeně popsat kroky:

- vazba aminoacyl-tRNA do A (aminokyselinového) místa ribosomu,
- vznik peptidové vazby katalyzovaný peptidyltransferasou,
- translokace peptidylu z A do P (peptidového) místa ribosomu,
- uvolnění deacylované tRNA z E („exit“) místa ribosomu.

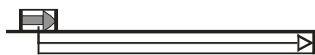
Třída 1:



Třída 2:



Třída 3:



Obr. 2. Tři třídy cíleného posunu čtecího rámce; šedé šipky v horním rámečku představují oblast mRNA (černá čára) překládanou ribosomy v původním čtecím rámci. Černé šipky ve spodních rámečcích reprezentují úsek překládaný v posunutém čtecím rámci. Translační produkty představované silnými šedými šipkami jsou syntetizovány v přebytku

Obecné principy (+1) i (–1) cíleného posunu čtecího rámce byly popsány na základě výsledků studia virů a retrotransponů (krátké úseky DNA, které se přemisťují v genetickém materiálu pomocí reversní transkriptasy). K cílenému posunu čtecího rámce je třeba dvou motivů na mRNA: tzv. „klouzavé sekvence“ mRNA, kde je posun tRNA zvýhodněn, a stimulatoru zvyšujícího účinnost celého děje pravděpodobně dočasným zastavením pohybu ribosomu. Stimulátorem bývá pomalu překládaná oblast mRNA, což mohou být: kodon pro vzácnou tRNA („hungry codon“), nedokonale rozpoznávaný stop kodon, oblast interakcí mRNA-rRNA nebo oblast sekundárních a terciárních struktur mRNA.

Dosud nejlépe odpovídá všem studovaným příkladům cílených posunů čtecího rámce tzv. integrovaný model^{11,12}. Oba typy cíleného posunu čtecího rámce (+1) i (–1) jsou řízeny kineticky a proběhnou pouze v případě, že ribosom je přechodně zastaven díky přítomnosti *cis*-signálů na mRNA (sekundární a terciární struktury mRNA vyskytující se na dané molekule). Typ posunu je ovlivněn způsobem obsazení vazebných míst ribosomu molekulami tRNA. K (–1) posunu dochází v okamžiku, kdy je P i A místo ribosomu obsazeno, zatímco k (+1) posunu dojde pouze, když A místo není obsazeno molekulou tRNA.

Lze předpokládat, že mutace nebo sloučenina ovlivňující vazbu a selekci aminoacyl-tRNA do A místa by měla ovlivnit účinnost buď (–1) nebo (+1) posunu čtecího rámce, nikdy ne obou současně. Tento předpoklad byl experimentálně ověřen, a tak byla platnost integrovaného modelu prokázána¹².

Selekce a vazba aminoacyl-tRNA

Eukaryotní elongační faktor eEF1 α , který je spolu s aminoacyl-tRNA a GTP součástí ternárního komplexu, umožňuje vazbu aminoacyl-tRNA do A místa ribosomu. Mutace zpomalující recirkulaci eEF1 α z ternárního komplexu posouvá rovnováhu ve prospěch ribosomů s obsazeným P místem a prázdným A místem, a tak zvyšuje pravděpodobnost (+1) posunu čtecího rámce. Naopak při mutaci vazebného místa pro GTP v eEF1 α setrvává ternární komplex v A místě déle, což podporuje (–1) posun čtecího rámce.

Množení tzv. kvasinkového viru („yeast killer virus“), které je závislé na (–1) posunu čtecího rámce, je inhibováno anisomycinem, tj. antibiotikem, které specificky inhibuje vstup aminoacyl-tRNA do A místa ribosomu. Předpokládá se, že anisomycin také zvyšuje účinnost opravného mechanismu v A místě, a tak se podílí na zachování původního čtecího rámce.

Vytvoření peptidové vazby a translokace

Před translokací je A i P místo ribosomu obsazeno tRNA, zatímco po translokaci je A místo volné, v místě P je peptidyl-tRNA a deacylovaná tRNA je v místě E. Sparomycin je antibiotikum inhibující tvorbu peptidové vazby, čímž prodlužuje dobu setrvání ribosomu na „klouzavé sekvenci“ s oběma místy (P i A) obsazenými tRNA. Spar-

omycin tak v souladu s integrálním modelem zvyšuje účinnost (–1) posunu čtecího rámce.

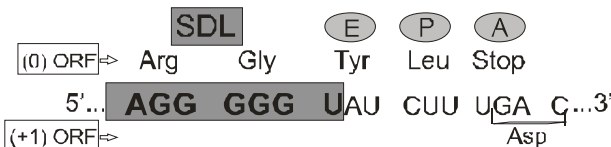
Inhibice translokace sníží množství ribosomů vhodných pro (+1) posun čtecího rámce. Množství ribosomů vhodných pro (–1) posun čtecího rámce by mělo naopak vzrůstat, neboť aminokyselinové místo zůstává obsazeno. Zjištění, že ke zvýšení účinnosti (–1) posunu nedochází, potvrzuje, že ribosom po vytvoření peptidové vazby již nemůže z termodynamického hlediska posunout čtecí rámec.

3.1. Cílený (+1) posun čtecího rámce u prokaryot

Dobře popsaným příkladem (+1) posunu čtecího rámce u prokaryot je posun nutný k translaci *prfB* genu *E. coli*, který kóduje uvolňovací faktor 2 (RF2)^{2,4,5} nutný k uvolnění nově syntetizovaného polypeptidového řetězce na stop kodonu. Aby ribosom syntetizoval aktivní RF2 správné délky, musí v pozici 26 od iniciačního kodonu zabránit terminaci posunem čtecího rámce o 1 nukleotid ve směru translace. Ribosomy pak přeloží ještě dalších 340 kodonů v novém čtecím rámci za vzniku funkčního uvolňovacího faktoru RF2. Posun čtecího rámce umožňuje autoregulační mechanismus. Pokud je hladina RF2 v buňce vysoká, převládá terminace translace *prfB* genu v důsledku vazby RF2 na UGA kodon v pozici 26 původního čtecího rámce. Vzniká tak zkrácený neaktivní protein, který je rychle degradován. Je-li hladina RF2 v buňce nízká, ribosomy překonají terminační kodon posunem čtecího rámce, což vede k produkci aktivního RF2. Pozoruhodná je účinnost tohoto jevu, jež se může pohybovat v rozmezí od 30 až do 100 %.

Analýzy mutantů se změnami v okolí místa posunu čtecího rámce *prfB* genu ukázaly, že tento jev závisí na kombinaci tří elementů (obr. 3):

- slabý terminační kodon UGA následovaný cytosinem,
- poslední smysluplný kodon původního otevřeného čtecího rámce CUU, který umožňuje slabé párování G s U v poslední pozici,



Obr. 3. Úsek mRNA genu *prfB* *E. coli*, kde dochází k posunu čtecího rámce o +1 nukleotid ve stavu, kdy se terminační kodon UGA nachází v A místě ribosomu; sekvence podobná Shine-Dalgarnově sekvenci (SDL) překrývá svým 3'-koncovým nukleotidem UAU kodon pro tyrosin, který je při posunu čtecího rámce v E místě ribosomu. Peptidová sekvence nad sekvencí mRNA odpovídá původnímu čtecímu rámci (0); nový čtecí rámec (+1) začíná aspartátem

- sekvence připomínající Shine-Dalgarnovu sekvenci (SD-like sequence, SDL).

Bylo prokázáno, že triplet UGA je nejslabším terminačním kodonem, jehož účinnost je modifikována následujícími bázemi. C v této pozici nejúčinněji zeslabuje stop signál¹³. Sekvence podobná Shine-Dalgarnově (SDL), AGG GGG, je komplementární ke 3' konci 16S rRNA stejně jako Shine-Dalgarnova sekvence, která určuje iniciaci translace. Na rozdíl od dobře prostudované Shine-Dalgarnovy sekvence, která leží před překládanou oblastí, je SDL umístěna uvnitř kódující sekvence mRNA. Poslední nukleotid SDL je totožný s prvním nukleotidem E místa ribosomu v okamžiku, kdy se terminační UGA kodon nachází v A místě téhož ribosomu (obr. 3). Bylo potvrzeno, že vzdálenost mezi SDL sekvencí a místem posunu je kritická pro zachování vysoké účinnosti posunu čtecího rámce. Vzdálenost iniciační Shine-Dalgarnovy sekvence od iniciačního místa je větší než vzdálenost SDL od místa posunu čtecího rámce, a proto dřívější hypotézy předpokládaly, že interakce SDL s komplementární sekvencí ribosomální RNA způsobuje pnutí v ribosomu, které „táhne“ peptidyl-tRNA do (+1) místa. Poslední studie však prokázaly přímou souvislost mezi obsazením E místa deacylovanou tRNA a účinností posunu čtecího rámce⁴. Interakce SDL s ribosomální RNA způsobí uvolnění deacylované tRNA z E místa, a tak na ribosomu zůstane pouze jedna tRNA, peptidyl-tRNA. Takový ribosom je pak velmi náchylný k posunu do (+1) čtecího rámce. Takto bylo prokázáno, že obsazení E místa má nezbytnou úlohu pro zachování čtecího rámce.

Výskyt SDL uvnitř kódující sekvence byl potvrzen i v *dnaX* genu *E. coli*. Vzdálenost SDL od místa posunu čtecího rámce v tomto genu je na rozdíl od výše uvedeného příkladu (pro (+1) posun) větší než vzdálenost iniciační Shine-Dalgarnovy sekvence od iniciačního kodonu, a proto její interakce s 16S rRNA stimuluje posun peptidyl-tRNA do (-1) místa. Předpokládá se, že SDL sekvence se vyskytuje i u dalších genů, které obsahují místa posunu čtecího rámce.

3.2. Cílený (+1) posun čtecího rámce u eukaryot

U eukaryot bylo popsáno několik případů posunu čtecího rámce o 1 nukleotid ve směru translace. Komplexním příkladem je (+1) posun v genu pro inhibitor (označovaný jako „antizym 1“) ornithin dekarboxylasy (ODC), která se účastní syntézy životně nezbytných polyaminů. ODC katalyzuje první krok biosyntézy polyaminů tj. přeměnu ornithinu na putrescín. Putrescín následně slouží jako prekurzor pro syntézu polyaminů spermidinu a sperminu. Vysoké koncentrace polyaminů v buňce mohou být toxické, jsou spojovány se vznikem neurologických disfunkcí, Alzheimerovy choroby či rakovinného bujení, a proto je nutný citlivý regulační mechanismus zajišťující jejich optimální koncentrace.

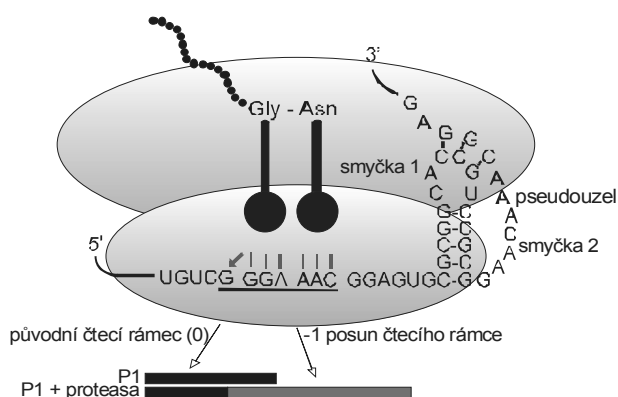
Úloha antizymu v regulaci hladiny buněčných polyaminů spočívá v jeho schopnosti vázat a inhibovat ornithin dekarboxylasu a směřovat ji k degradaci do proteasomů³.

mRNA antizymu obsahuje dva překrývající se čtecí rámce; první má dva iniciační signály, ale jeho translaci nevzniká žádný protein, zatímco druhý čtecí rámec nemá iniciační signál, ale kóduje aktivní domény antizymu. Syntéza funkčního antizymu vyžaduje iniciaci translace na jednom z iniciačních míst prvního čtecího rámce a (+1) posun čtecího rámce na kodonu, který těsně předchází stop kodonu prvního čtecího rámce. V důsledku vysoké koncentrace polyaminů (spermidin, spermin), které zvyšují účinnost takového posunu čtecího rámce až na 30 %, vzrůstá koncentrace aktivního antizymu (viz níže). Tak je zajištěn zpětnovazebný mechanismus regulace hladiny polyaminů v buňce.

Místo posunu čtecího rámce savčí mRNA pro antizym je tetraplet UCCU uvnitř sekvence 5'UCCUGA3'. Pro posun čtecího rámce je důležité, aby 3' báze tetrapletu byla zároveň první bází stop kodonu. Nezbytný je také pseudouzel (viz kap. 3.4), jehož začátek se nachází 3 nukleotidy za stop kodonem, a rovněž specifická sekvence na 5' straně místa posunu čtecího rámce. Tyto motivy mRNA kódující antizym jsou nezbytné pro posun čtecího rámce, ke kterému však v nepřítomnosti polyaminů nedochází vůbec nebo jen s minimální účinností. Zvyšování koncentrace polyaminů v buňce vede ke stimulaci posunu čtecího rámce tohoto genu a jeho účinnost může dosáhnout až 30 %. Přesný mechanismus stimulace posunu čtecího rámce polyaminy není dosud objasněn. Předpokládá se, že indukce posunu čtecího rámce je zprostředkována přímo složkami translačního aparátu buňky, například ribosomy. Je zajímavé, že tento neobvyklý způsob regulace translace – nutnost posunu čtecího rámce pro syntézu funkčního antizymu – je zachován od kvasinek po obratlovce, stejně jako sekvence, na kterých k posunu dochází¹⁴.

3.3. Cílený (-1) posun čtecího rámce u eukaryot

Cílený posun čtecího rámce o (-1) nukleotid byl popsán nejprve u retrovirů (první třída cíleného posunu čtecího rámce, viz výše), ale později také u koronaviřů, rostlinných a kvasinkových virů, bakterií a nedávno i u savčích genu *Edr*¹⁵. K tomuto posunu jsou rovněž nezbytné dva motivy mRNA, heptanukleotidová klouzavá sekvence, za níž následuje sekundární nebo terciární struktura mRNA¹⁶. Vzdálenost obou sekvencí 5–9 nukleotidů je pro účinnost posunu důležitá. Klouzavá sekvence má obecný sled nukleotidů X-XXY-YYZ, kde X mohou být jakékoli tři shodné nukleotidy, Y značí A nebo U a Z je A, U nebo C. K posunu čtecího rámce dochází, když jsou kodony XXY-YYZ obsazeny peptidyl-tRNA a aminoacyl-tRNA v odpovídajících místech ribosomu (integrováný model, viz výše). Triplety čtecích rámců jsou v textu odděleny pomlčkami. Při posunu obě tRNA simultánně přerušují párování, ribosom se posune o 1 nukleotid zpět a obě tRNA se párují v -1 ORF (XXX-YYY). První dvě báze obou antikodonů tak zůstávají spárované, což je postačující pro zařazení příslušných aminokyselin do sekvence rostoucího peptidu. Poté se vytvoří peptidová vazba, dojde k translakaci



Obr. 4. Model (-1) cíleného posunu čtecího rámce Beet western yellow viru (BWYV) s typickou „klouzavou“ sekvencí a pseudouzlem oddělenými šestinukleotidovou sekvencí⁶; nejčastější pseudouzlel se skládá ze dvou vlásenek a dvou smyček, přičemž báze druhé smyčky se mohou v některých případech párovat s bázemi první vlásenky a tvořit intramolekulární triplex (např. u HIV-1). Obdélníky ve spodní části obrázku schematicky znázorňují translační produkty původního čtecího rámce P1 a fúzní polyprotein, který je syntetizován v důsledku cíleného (-1) posunu čtecího rámce

a translace pokračuje v -1 čtecím rámci. Pravděpodobnost procesu je zvýšena přítomností sekundární nebo terciární struktury mRNA, která způsobí pozastavení ribosomu na klouzavé sekvenci^{6,17-19}. Takovou strukturou bývá nejčastěji pseudouzlel¹, viz níže (obr. 4).

3.4. Role mRNA

Pseudouzlel, prvek terciární struktury RNA^{1,20}, je obecně odvozen od prvků sekundárních struktur RNA. Pseudouzly, které se uplatňují v místech posunu čtecího rámce, jsou odvozeny od vlásenkové smyčky RNA (pseudouzly typu H) a vznikají párováním bází mezi úsekem smyčky ve vlásence a vzdálenějším jednořetězcovým úsekem téže molekuly RNA (obr. 4, cit.²¹).

Ribosomální proteiny S3, S4 a S5, které obklopují vstupní místo mRNA do ribosomálního komplexu mají helikasovou aktivitu, váží helikální oblasti mRNA a separují její řetězce při vstupu do ribosomu. Navržená teorie předpokládá, že strukturní motivy podporující posun čtecího rámce znemožňují účinnou interakci s těmito „rozplétacími“ proteiny. Zjednodušeně lze konstatovat, že struktura pseudouzlu blokuje vstup mRNA do vstupního žlábků ribosomu, protože čelní část pseudouzlu má rozměry 37×18 Å, zatímco vstupní brána do ribosomálního tunelu mezi S3, S4 a S5 proteiny je zúžena na 17×20 Å (cit.^{22,23}). Po translokaci je tak pohybu mRNA kladen značný odpor, což může vyústit v jeden z následujících dějů:

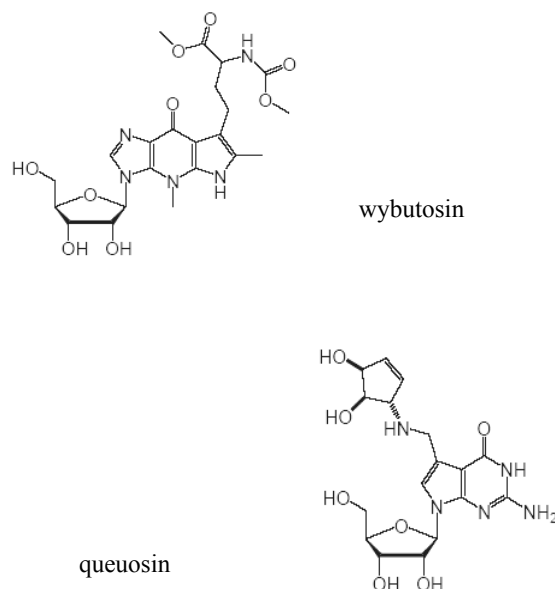
- rozpletení pseudouzlu,
- disociace komplexu ribosom a mRNA,
- (-1) posun čtecího rámce.

Dosud není objasněno, čím je řízen výběr těchto tří možností. Mechanismus posunu čtecího rámce využívá řada virů k syntéze proteinů nezbytných pro tvorbu nových virových částic. Přítomnost a stabilita pseudouzlu je významná pro účinnost posunu čtecího rámce, a proto lze očekávat, že účinného narušení struktury pseudouzlu může být v budoucnu využito k antivirové terapii¹⁶.

3.5. Role modifikovaných tRNA

V eukaryotních buňkách se vyskytují tRNA (pro Asn, Asp, His, Phe a Tyr) s modifikovanými bázemi ve 3' pozici antikodonu, např. wybutosin (Y) v případě Phe tRNA a queuosin (Q) u Asn tRNA (obr. 5). Změny modifikace bází v antikodonové smyčce tRNA mohou ovlivnit účinnost (-1) posunu čtecího rámce.

Signály pro posun čtecího rámce u retrovirů i vyšších eukaryot obsahují kodony pro tyto aminokyseliny. Bylo experimentálně prokázáno, že v buňkách infikovaných retroviry (Human T-cell Leukemia Virus, Human Immunodeficiency Virus, Rous Sarcoma Virus) většina Phe tRNA nebo Asn tRNA postrádá tyto modifikované báze v antikodonové smyčce. Phe tRNA a Asn tRNA bez modifikovaných bází se označují jako tzv. „shifty“ (od shift = posun) tRNA, protože stimulují posun čtecího rámce na klouzavých sekvencích obsahujících odpovídající kodony^{24,25}. Předpokládá se, že nepřítomnost modifikovaných bází v antikodonové smyčce přispívá k posunu čtecího rámce, neboť zde poskytuje více prostoru, což umožňuje větší flexibilitu antikodonu. Modifikace ostatních bází



Obr. 5. Struktura wybutosinu a queuosinu, nukleotidů s vysoce modifikovanými bázemi

v antikodonové smyčce hraje také důležitou úlohu v regulaci posunu čtecího rámce²⁶. Bylo také prokázáno, že mnoho nádorových buněk obsahuje vysoké hladiny těchto nemodifikovaných bází. Udržování tRNA ve vysoce modifikovaném stavu by tak mělo inhibovat nejen retroviry, ale také růst neoplazií. Tyto možnosti terapie jsou předmětem intenzivního studia^{24,27}.

3.6. Role inhibice peptidyltransferasy

Inhibitory peptidyltransferasy specificky ovlivňují účinnost (–1) cíleného posunu čtecího rámce, a tím např. i poměr polyproteinů Gag/Gag-Pol v retrovirech²⁸. Inhibitor peptidyltransferasy, sparsomycin, postačuje k zabránění propagace kvasinkových virů L-A a M1 (cit.²⁹). Mutace ribosomálního proteinu L3 a nepřítomnost proteinu L41 vede k inhibici peptidyltransferasy *Saccharomyces cerevisiae* a následně ke zvýšené účinnosti (–1) posunu čtecího rámce³⁰. Předpokládá se, že snížení aktivity peptidyltransferasy má za následek prodloužení zdržení ribosomu (> 20⁻¹ s) na „klouzavé“ sekvenci ve chvíli, kdy je P i A místo obsazeno, a tak je poskytnuto více času k posunu čtecího rámce. Celková rychlost elongace se ale nezmění, protože děj limitující rychlost je stále přítomnost aminoacyl-tRNA v A místě ribosomu (8⁻¹ s) a disociace EF-Tu-GDP z ribosomu (4⁻¹ s) – data pro ribosomy *E.coli*, u eukaryot se předpokládá analogie³⁰.

4. Uměle stimulovaný (–1) posun čtecího rámce

K posunu čtecího rámce může docházet i tehdy, když stimující strukturální elementy jsou přítomny na dvou různých RNA (*trans*-elementy). Nedávný výzkum ukázal, že oligonukleotidy komplementární k úseku začínajícímu čtvrtým nukleotidem za „klouzavou“ sekvenci zvyšují účinnost (–1) posunu čtecího rámce z bazální hladiny ~1 % až na 40 %. Tyto experimenty byly provedeny s použitím „klouzavých“ sekvencí vyskytujících se přirozeně u retrovirů. Účinnost posunu čtecího rámce na studovaných sekvencích s přirozenými stimulatory (pseudouzly) je 10–20 %. Bylo tedy prokázáno, že stimulaci posunu čtecího rámce lze navodit i použitím komplementárního oligonukleotidu, který působí jako překážka v pohybu ribosomu³¹.

Stimulace posunu čtecího rámce ve specifickém místě pomocí malých oligonukleotidů (15–25 nukleotidů) poskytuje možnost terapeutického využití. Mnoho chorob je způsobeno delecemi nebo insercemi v genech, jejichž důsledkem je nesprávný čtecí rámec. K těmto mutacím, podobně jako k ribosomálním posunům čtecího rámce, často dochází na homopolymerních úsecích^{31,32}. Oligonukleotidy by tedy teoreticky mohly být použity pro cílený posun ribosomu zpět do správného čtecího rámce.

5. Závěr

Možnost alternativního využití genetické informace cíleným posunem čtecího rámce umožňuje kontrolu genové exprese. Nejlépe je tento proces prostudován u virů, kde zajišťuje optimální poměr strukturálních proteinů kapsidy k retrovirovým enzymům. Byla také vyslovena domněnka, že by ribosomální posun čtecího rámce mohl být dalším nástrojem genetické variability, poskytující organismu evoluční výhodu např. v důsledku stimulace exprese proteinů s modifikovanými vlastnostmi, což organismu umožní obývat jak prostory původní, tak nové ekologické niky³.

Výsledky mnoha studií přesvědčivě ukázaly, že sekvence, na kterých dochází k popsáným cíleným (–1) posunům čtecího rámce, vykazují společné rysy, které je možno nalézt v databázích známých prokaryotických i eukaryotických sekvencí^{33,34}. Tímto postupem bylo identifikováno velké množství potenciálních signálů pro posun čtecího rámce, jejichž výskyt je 2–6× vyšší než náhodný. Některé z nich jsou navíc konzervativní mezi homologními geny různých druhů. Problémem zůstává nastavení vhodných parametrů vyhledávání, neboť i přes řadu úspěchů vede predikce často k falešně pozitivním výsledkům či naopak při aplikaci striktních kritérií nejsou identifikována místa, na nichž ke změně kódování skutečně dochází^{32,34,35}. Jedná se o mechanismus, který lze cíleně regulovat a představuje tak nové možnosti terapeutického zásahu.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů MŠMT: 1M6837805002 a MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie I*. Rosypal, Brno 1998.
2. Farabaugh P. J.: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64, 131 (2000).
3. Namy O., Rousset J. P., Naphthine S., Brierley I.: *Mol. Cell* 13, 157 (2004).
4. Márquez V., Wilson D. N., Tate W. P., Triana-Alonso F., Nierhaus K. H.: *Cell* 118, 45 (2004).
5. Farabaugh P. J.: *Microbiol Rev* 60, 103 (1996).
6. Alam S. L., Atkins J. F., Gesteland R. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14177 (1999).
7. Flint S. J., Enquist L. W., Krug R. M., Racaniello V. R., Skalka A. M.: *Principles of Virology*. ASM Press, Washington DC 2000.
8. Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E.: *Retroviruses*. CSHL Press, New York 1997.
9. García P., Rodríguez I., Suárez J. E.: *J. Bacteriology* 186, 1714 (2004).
10. Larsen B., Wills N. M., Gesteland R. F., Atkins J. F.: *J. Bacteriology* 176, 6842 (1994).
11. Plant E. P., Muldoon Jacobs K. L., Harger J. W., Meskauskas A., Jacobs J. L., Barter J. J., Petrov A. N., Dimnan J. D.: *RNA* 9, 168 (2003).

12. Harger J. W., Meskauskas A., Dinman J. D.: Trends Biochem. Sci. 27, 448 (2002).
13. Tate W.P., Mansell J. B., Mannering S. A., Irvine J. H., Major L. L., Wilson D. N.: Biochemistry (Mosc) 64, 1342 (1999).
14. Ivanov I. P., Matsufuji S., Murakami Y., Gesteland R. F., Atkins J. F.: EMBO J. 19, 1907 (2000).
15. Shigemoto K., Brennan J., Walls E., Watson C. J., Stott D., Rigby P. W. J., Reith A. D.: Nucleic Acids Res. 29, 4079 (2001).
16. Dinman J. D., Richter S., Plant E. P., Tailor R. C., Hammell A. B., Rana T. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 5331 (2002).
17. Paul C. P., Barry J. K., Dinesh-Kumar S. P., Brault V., Miller W. A.: J. Mol. Biol. 310, 987 (2001).
18. Kontos H., Naphthine S., Brierley I.: Mol. Cell. Biol. 21, 8657 (2001).
19. Lopinski J. D., Dinman J. D., Bruenn J. A.: Mol. Cell. Biol. 20, 1095 (2000).
20. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, NY, USA 2002.
21. Giedroc D. P., Theimer C. A., Nixon P. L.: J. Mol. Biol. 298, 167 (2000).
22. Barry J. K., Miller W. A.: Proc Natl Acad Sci USA 99, 11133 (2002).
23. Yusupova G. Z., Yusupov M. M., Cate J. H. D., Noller H. F.: Cell 106, 233 (2001).
24. Carlson B. A., Kwon S. Y., Chamorro M., Oroszlan S., Hatfield D. L., Lee B. J.: Virology 255, 2 (1999).
25. Carlson B. A., Kwon S. Y., Lee B. J., Hatfield D.: Mol. Cells 10, 113 (2000).
26. Pande S., Vimaladithan A., Zhao H., Farabaugh P. J.: Mol. Cell. Biol. 15, 298 (1995).
27. Carlson B. A., Mushinski J. F., Henderson D. W., Kwon S. Y., Crain P. F., Lee B. J., Hatfield D. L.: Virology 279, 130 (2001).
28. Dinman J. D., Kinzy T. G.: RNA 3, 870 (1997).
29. Dinman J. D., Ruiz-Echevarria M. J., Czaplinski K., Peltz S. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 6606 (1997).
30. Meskauskas A., Harger J. W., Muldoon Jacobs K. L., Dinman J. D.: RNA 9, 982 (2003).
31. Howard M. T., Gesteland R. F., Atkins J. F.: RNA 10, 1653 (2004).
32. Olsthoorn R. C. L., Laurs M., Sohet F., Hilbers C. W., Heus H. A., Pleij C. W. A.: RNA 10, 1702 (2004).
33. Hammell A. B., Tailor R. C., Peltz S. W., Dinman J. D.: Genome Res. 9, 417 (1999).
34. Wilson G. M., Brewer G.: Genome Res. 9, 393 (1999).
35. Baranov P. V., Gurvich O. L., Fayet O., Prère M. F., Miller W. A., Gesteland R. F., Atkins J. F., Giddings M. C.: Nucleic Acids Res. 29, 264 (2001).

Z. Smékalová and T. Ruml (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Programmed Translational Frameshifting – Translation of Alternative Products**

Programmed ribosomal frameshifting, one of the alternative decoding events, occurs with the frequency significantly higher than the incidence of common translational errors of this type. In general, there are at least two motives involved in the frameshifting: the slippery sequence, where the shift of the ribosome takes place, and a cis element situated several nucleotides downstream of the slippery sequence, which enhances the event efficiency. This review is devoted to the mechanisms and examples of the frameshifting in a variety of organisms. The importance of this mechanism for their life cycle is discussed with respect to potential therapeutic applications.

VLASTNOSTI A MODIFIKÁCIA POLY(3-HYDROXYBUTYRÁTU)

GIZELA MIKOVÁ A IVAN CHODÁK

Ústav polymérov, Centrum excelentnosti CEDEBIPO,
Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 842 36 Bra-
tislava, Slovenská republika
upolgimi@savba.sk

Došlo 8.8.05, prepracované 12.4.06, prijaté 14.6.06.

Kľúčové slová: poly(3-hydroxybutyrát), syntéza, starnutie,
termická degradácia, zmesi, modifikácia

Obsah

1. Úvod
2. Štruktúra poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB)
3. Syntéza PHB
 - 3.1. Mikrobiologická syntéza
 - 3.2. Chemická syntéza
4. Vlastnosti PHB
 - 4.1. Termická degradácia
 - 4.2. Vlastnosti v tuhom stave
 - 4.2.1. Vplyv postupov spracovania na vlastnosti PHB
 - 4.2.2. Starnutie PHB fyzikálnymi procesmi
 - 4.3. Biodegradácia
5. Modifikácia PHB
 - 5.1. Kopolymerizácia
 - 5.2. Chemická modifikácia
 - 5.3. Fyzikálna modifikácia
6. Aplikácie materiálov na báze PHB
7. Záver

1. Úvod

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) patria k najvýznamnejším biologicky syntetizovaným polymérom. Sú to biopolyestery 3-hydroxykyselín so širokospektrálnymi vlastnosťami¹. Izolujú sa vo forme vysoko a nízkomolekulových frakcií z bakteriálnych membrán², rastlinných³ a živočíšnych tkanív⁴. Prvým objaveným a zároveň štruktúrne najjednoduchším PHA je poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), ktorý je aj najviac preštudovaný. Okrem zdravotnej nezávadnosti pre ľudský organizmus má PHB výborné bariérové vlastnosti pre plyny, čo ho predurčuje na priemyselné využitie v obalovom priemysle. Napriek tomu sa čistý homopolymér v tomto odvetví zatiaľ prakticky nevyužíva najmä pre jeho niektoré nevýhodné vlastnosti. Štú-

dium tohto biopolyesteru je vysoko aktuálne vzhľadom na potrebu jednak zefektívniť jeho výrobu a jednak modifikáciou upraviť vlastnosti polyméru tak, aby vyhovovali i náročným vysokotonážnym aplikáciám. Práca prináša prehľad o vlastnostiach a možných spôsoboch modifikácie tohto biodegradovateľného polyesteru.

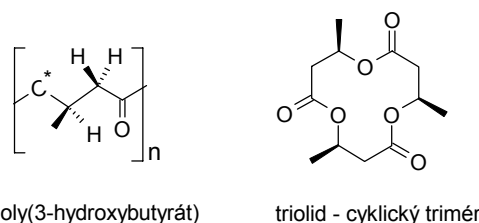
2. Štruktúra poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB)

Vysokomolekulový PHB bol objavený Lemoignenom v rokoch 1923–1927 ako produkt biosyntézy určitých druhov baktérií. Až oveľa neskôr (1983), Reusch a spol. izolovali deriváty s krátkymi reťazcami vo forme komplexov s kalcium polyfosfátom z *Escherichia coli*⁵. V biologických štruktúrach sa hydroxybutyrát (HB) vyskytuje v princípe v dvoch formách⁶:

- forma homopolyméru (PHB a *mcl* PHB (*medium chain length PHB*) – makromolekuly so „stredne dlhými reťazcami“), s funkciou zásobovania organizmu energiou a uhlíkom,
- forma hydroxybutyrátových reziduí s nižšou mólovou hmotnosťou (cyklické oligolidy a ich deriváty), ktoré môžu tvoriť komplexy s inými biomakromolekulami ako napr. s kalcium polyfosfátom, alebo proteínmi a majú funkciu prenášača iónov. Okrem spomínaných cyklických foriem sa HB nachádza aj v krvi cicavcov vo forme 3- alebo 4-hydroxybutánovej kyseliny (4-HB), pričom 4-HB derivátu sa pripisuje funkcia neurónového prenášača⁷.

Vysokomolekulový poly(3-hydroxybutyrát) je lineárny polyester, ktorého makromolekula je tvorená opticky aktívnymi jednotkami kyseliny D(–)-3-hydroxybutánovej (obr. 1). Vyskytuje sa v závitnicovej konformácii. Kým sekundárnu štruktúru PHB vyjadruje ľavotočivá 2_1 závitnica v g^+g^{+t} konformácii⁸, štruktúra oligolidov pozostáva z pravotočivých 3_1 závitnicových konformácií.

Z makroskopického pohľadu je PHB semikryštalický polymér so stupňom kryštalinity v rozsahu 55–85 % (cit.⁹). Ortorombická základná kryštalická bunka má rozmery $a = 0,576$ nm, $b = 1,320$ nm, $c = 0,596$ nm a obsahuje dve



Obr. 1. Schéma monomérskej jednotky PHB a cyklického triméru HB

antiparalelne orientované helikálne makromolekuly. Čiasťočne planárna cik-cakovitá štruktúra môže vzniknúť po mechanickom namáhaní (dlžení) z amorfnej fázy medzi lamelami tvorenými závitnicovými konformáciami¹⁰. PHB tvorí nezvyčajne tenké lamelárne kryštály, ktoré sú organizované do doštičkovitých tvarov, alebo sféruľitov, v závislosti od zdroja rastu kryštálov (roztok, tavenina). Hrúbka lamiel sa pohybuje v rozpätí 4–7 nm s prevládajúcim rozmerom 5 nm (cit.⁶).

3. Syntéza PHB

Viacere typy mikroorganizmov vytvárajú v podmienkach nevyváženého rastu zásobné materiály na báze uhlíka. Takýmto spôsobom syntetizujú poly(3-hydroxybutyrát) rôzne druhy baktérií (napr. *Bacillus magaterium*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans*), kyanobaktérií a rias. Tento fenomén možno prirovnať k vytváraniu zásobného glykogénu cicavcami alebo škrobu rastlinami.

Vzhľadom na prítomnosť C₃ metylového uhlíka v poly(3-hydroxybutyráte) sa polymér vyskytuje vo forme dvoch opticky aktívnych izomérov (*R*)- a (*S*)-. Mikrobiologicky syntetizovaný PHB obsahuje čisto (*R*)-izomérmu jednotky a je izotaktický. Na druhej strane chemicky syntetizovaný PHB, ktorý pozostáva z (*R*)- aj (*S*)-monomérmu jednotiek, je väčšinou ataktický, alebo syndiotaktický v závislosti od podmienok syntézy. Podiel (*R*)-izoméru v poly[(*R,S*)-3-hydroxybutyráte] sa pohybuje v rozsahu od 6 do 94 % (cit.¹¹).

3.1. Mikrobiologická syntéza

Nutnou podmienkou akumulácie PHB v biomase je nevyváženosť vyživovacieho roztoku v zmysle nedostatku, alebo nadbytku niektorého z komponentov (C, H, N, O, P). Biosyntéza PHB začína konverziou uhlíkového substrátu (glukóza, glycerol, metanol, etanol, kyselina octová¹²) na

Tabuľka I

Zloženie polyhydroxyalkanoátov (PHA) akumulovaných *A. eutrophus* z rôznych zdrojov uhlíka¹⁵

Zdroj uhlíka	Obsah PHA [hmot. %]	Zloženie polyméru [mol. %]	
		3-HB	4-HB
Cl(CH ₂) ₃ COOH	27	89	11
HO(CH ₂) ₃ COOH	30	67	33
HO(CH ₂) ₃ COOH + CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	43	82	18
HO(CH ₂) ₄ OH	8	75	25

HB – hydroxybutyrát

acetát, ktorý sa môže v organizmoch transportovať pomocou koenzýmu A (CoA). Reverzibilnou kondenzačnou reakciou dvoch molekúl acetyl-CoA vzniká acetoacetyl-CoA, ktorý sa následne redukuje na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. Jeho polymerizáciou vzniká PHB so zachovanou konfiguráciou na asymetrickom uhlíku.

V závislosti od zdroja a prostredia rastu baktérií možno týmto spôsobom syntetizovať rôzne druhy polyhydroxyalkanoátov (tabuľka I). Zloženie konečného produktu (homopolymér, kopolymér, alebo zmesi viacerých PHA) ako aj jeho výťažok závisí od prirodzenej variability syntetizujúcich organizmov. Manipuláciou genómu bunky hostiteľa a prídavkom prekursorov možno eliminovať, inhibovať, alebo inak modifikovať prebiehajúce bioprocesy a tak zabezpečiť kontrolu dĺžky polymérneho reťazca¹³. Biosyntézou vzniká vysomolekulový PHB s hmotnostným priemerom mólovej hmotnosti M_w až do $1,3 \cdot 10^7$ g mol⁻¹ (cit.¹⁴).

Prvým krokom izolácie PHB z biomasy je deštrukcia bunkovej membrány, ktorá môže prebehnúť mechanicky, chemicky, alebo enzymaticky¹⁵. Narušenie membrán, ktoré *in vivo* tvoria bariéru medzi homoregiónmi obsahujúcimi PHB (natívne granule) a ostatným okolím, zároveň dáva priestor heteronukleácii, čím sa z plne amorfného PHB stáva semikryštalický polymér¹⁶. Rýchlosť kryštalizácie potom závisí od stupňa poškodenia membrány.

Následne sa polymér rozpustí vo vhodnom rozpúšťadle (napr. chloroform, metylénchlorid, 1,2-dichlórétán, pyridín) a hrubé nečistoty (zvyšky bunkových stien) sa oddelia filtráciou a na základe rozdielu hustôt centrifugáciou. Konečné čistenie sa uskutočňuje extrakciou za použitia vhodných zmesí typu voda/organické rozpúšťadlo.

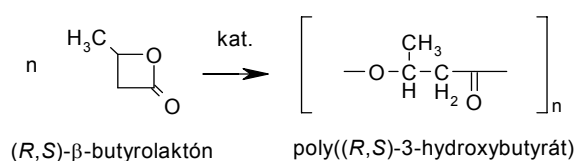
3.2. Chemická syntéza

Organická syntéza PHB je založená na polymerizácii (*R* a/alebo *S*)-β-butyrolaktónu, pri ktorej dochádza k otvoreniu kruhu cyklickej zlúčeniny (*ring-opening polymerization*) (obr. 2). Reakcia je katalyzovaná prevažne organokovovými katalyzátormi na báze hliníka a zinku^{17,18}. Zmenou alkylového reťazca laktónu alebo prítomného katalyzátora možno pripraviť rôzne kopolyméry hydroxyalkanoátov (HA) alebo ich homopolyméry s rôznou takticitou. Mólove hmotnosti takto pripravených polymérov však bežne dosahujú polovičné až tretinové hodnoty v porovnaní s biosyntetizovaným produktom.

4. Vlastnosti PHB

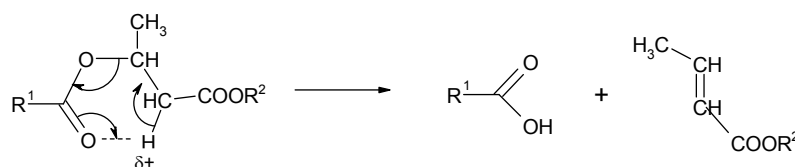
Vzhľadom na semikryštalický charakter a podobnosť mechanických vlastností je biologicky syntetizovaný PHB najčastejšie porovnávaný so syntetickým izotaktickým polypropylénom (iPP). Avšak iPP má neporovnateľne vyššiu ťažnosť vplyvom posunutia T_g do oblasti teplôt pod 0 °C. V tabuľke II sú uvedené niektoré fyzikálne vlastnosti PHB a iPP v porovnaní s inými biopolymermi.

Najhúževnatejším polymérom z uvedených materiá-



Obr. 2. Chemická syntéza poly(3-hydroxybutyrátu)

lov je poly(ϵ -kapolaktón) (PCL) a naopak najpevnejším polyglykolid (PGA). Je nutné poznamenať, že dôležitým faktorom, ktorý do veľkej miery vplýva na výsledné mechanické vlastnosti, je mólová hmotnosť polyméru. Napríklad zmenou mólovej hmotnosti (M_w) PLLA z 50 000 na 200 000 g mol⁻¹ možno dosiahnuť materiál s pevnosťou v ťahu od 15,5 do 150 MPa. O niečo menší efekt možno pozorovať u PHB, keď zmena M_w z 300 000 na 100 000 g mol⁻¹ vedie k zníženiu pevnosti z 30 na 10 MPa (cit.²⁰). Na druhej strane modul pružnosti a ťažnosť viac závisia od doby skladovania materiálu po pretavení, počas ktorej polymér krehne. V porovnaní s polymérmi uvedenými v tabuľke II má PHB niekoľko nežiadúcich vlastností, a to nízku deformovateľnosť a nízku termickú stabilitu už v blízkosti teploty topenia (PCL a PLLA degradujú pri teplotách nad 200 °C). Vlastnostiam PHB v tavenine ako aj v tuhej fáze sa budú venovať nasledujúce kapitoly.



$\text{R}^1, \text{R}^2 =$ zvyšok polymérneho reťazca

Obr. 3. Cis-eliminácia poly(3-hydroxybutyrátu)

Tabuľka II

Fyzikálne vlastnosti niektorých biopolymérov¹⁹ a izotaktického polypropylénu (iPP)

Polymér	E [GPa]	σ_p [MPa]	ϵ_p [%]	T_g [°C]	T_m [°C]
PHB ^a	3,5–4,0	40	5–8	5–15	168–182
PLA ^b	0,4–3,5	21–60	2,5–6	45–60	150–160
PGA ^c	6,0–7,0	60–100	1,5–20	35–45	220–233
PCL ^d	0,21–0,44	21–42	300–1000	–60	58–65
iPP	1,5	38	400	–10	176

^a poly(3-hydroxybutyrát), ^b semikryštalický poly(L-laktid), ^c polyglykolid, ^d poly(ϵ -kapolaktón), E – Youngov modul pružnosti, σ_p – pevnosť v ťahu (napätie pri pretrhnutí), ϵ_p – ťažnosť (predĺženie pri pretrhnutí), T_g – teplota sklovitého prechodu, T_m – teplota topenia

4.1. Termická degradácia

Závažným problémom pri spracovaní PHB je jeho rýchla termická degradácia už okolo teploty topenia (170 až 180 °C). Keďže teplota spracovania sa väčšinou pohybuje v rozsahu 10–15 °C nad T_m polyméru, je nevyhnutné počítať s dôsledkom degradácie na výsledné vlastnosti materiálu.

Vo všeobecnosti pyrolýzu polyesterov popisujú dva mechanizmy^{21,22}: cis-eliminácia a transesterifikácia. Pri teplotách nad 300 °C môže dochádzať k neselektívnym radikálovým reakciám. Cis-eliminácia (obr. 3) je dominantná pre estery s aktivovanými C–H väzbami prítomnosťou karboxylových skupín, ktoré zvyšujú ich kyslosť.

Medzi degradačnými produktami PHB prevláda kyselina krotónová. Analýza termodegradačných produktov potvrdila prítomnosť PHB oligomérov a kyseliny izokrotónovej pri teplote okolo 300 °C (cit.²³).

Dôležitými parametrami, ktoré popisujú efekt termickej degradácie na vlastnosti polyméru, sú zmeny mólovej hmotnosti polyméru a reologické vlastnosti pri teplotách okolo teploty topenia. Výsledky GPC analýz PHB vzoriek v teplotnom intervale 170–200 °C poukázali na zaujímavý fakt. Po počiatočnom poklese M_w s časom tavenia došlo k miernemu nárastu M_w pred ďalším poklesom. Tento „skok“ sa pripísal polykondenzácii pôvodných hydroxylových a karboxylových koncových skupín a tiež tých, ktoré vznikli počas degradácie²⁴. Tento efekt nebol pozorovaný na základe stanovenia indexov toku taveniny, pretože sa objavuje veľmi skoro v perióde „zahrievania“. Vysvetlenie pomocou krátkodobej polykondenzácie podporuje aj

Tabuľka III
Hodnoty aktivačnej energie (E_a) termickej degradácie PHB

E_a [kJ mol ⁻¹]	Metóda
111 ± 7	TGA ²⁵
235	DSC ²²
247 ± 19	GPC ²⁴
380 ± 20	Py-MS, DTG ²²

pozorovanie tvorby vody počas termickej degradácie PHB vo vákuu²³.

Kinetika termickej degradácie PHB, keďže nezávisí od koncentrácie zložiek, sa odvodzuje od kinetiky nultého poriadku. Rýchlosť štiepenia reťazca je vyjadrená rovnicou:

$$1/P_{n,t} - 1/P_{n,0} = kt$$

kde $P_{n,t}$ a $P_{n,0}$ sú číselné priemerné polymerizačné stupne v čase t a v čase 0 s.

Z priebehu izotermickej degradácie (170, 250, 290 °C) v dusíkovej atmosfére sa zistil iba malý úbytok hmotnosti napriek rapidnému poklesu priemerného polymerizačného stupňa²⁵. Vypočítané hodnoty aktivačnej energie (E_a – teplotný koeficient) sú konštantné počas zmien hmotnosti, čo indikuje, že reakčný mechanizmus sa nemení s teplotou ani so stupňom degradácie. Napriek tomu sa hodnoty E_a uvedené v literatúre značne líšia (tabuľka III).

Väčšina hodnôt je oveľa vyššia ako hodnoty vypočítané z plynovej pyrolýzy aktivovaných ($E_a = 157$ kJ mol⁻¹) a neaktivovaných ($E_a = 190$ kJ mol⁻¹) esterov²².

Vzhľadom na náhodné štiepenie reťazca *cis*-elimináciou, je obtiažne stabilizovať PHB konvenčnými metódami. Zaujímavé výsledky sa dosiahli použitím sieťovacích systémov pozostávajúcich z organického peroxidu, napr. dikumylperoxidu (DCP) ako zdroja voľných radikálov a triallylkyanurátu (TAK) ako multifunkčnej nenasytenej zlúčeniny²⁶. Kombinácia TAK/DCP významne ovplyvnila charakteristiky prietoku taveniny PHB, čas tečenia sa predĺžil 20 násobne.

4.2. Vlastnosti v tuhom stave

4.2.1. Vplyv postupov spracovania na vlastnosti PHB

Postupy spracovania PHB majú výrazný vplyv na morfológiu a mechanické vlastnosti polymérneho produktu. Lisovanie poskytuje ťažný materiál, ktorý ale následným skladovaním pri laboratórnych podmienkach krehne. Hodnoty mechanických vlastností sa pohybujú okolo hodnôt 3,5 GPa (modul pružnosti), 40 MPa (pevnosť v ťahu) a ťažnosť s dobou skladovania klesne až na hodnoty pod 5 %. Podobné vlastnosti možno očakávať i pri spracovaní polyméru inými postupmi používanými pre termoplasty, napr. extrudovanie alebo vstrekovanie.

Dôležitým postupom najmä z hľadiska zníženia efektu termickej degradácie na výsledné vlastnosti materiálu je

extrúzia pod teplotou topenia PHB (*solid state technology*), kde dôležitú úlohu zohráva teplota spracovania²⁷. So zvyšujúcou sa teplotou dochádza k väčšej plastickej deformácii počas spracovania a k zvýšeniu kompaktnosti polymérneho prášku. Spracovaním PHB pri 120 °C sa dosiahne materiál s pevnosťou v ťahu do 60 MPa a predĺžením 18 %. Porovnaním dynamicko-mechanických vlastností vzoriek pripravených z taveniny a pod T_m možno povedať, že vplyvom nižšej teploty spracovania dochádza k posunu T_g smerom k vyšším hodnotám a k znižovaniu maxima v závislosti stratového faktora od teploty, čo naznačuje intenzívnejšie interakcie medzi kryštalickou a amorfnou fázou v materiáli pripravenom technológiou „solid state“.

V prípade PHB osobitný význam môžu mať postupy prípravy vlákien a fólií. Tvorba anizotropnej štruktúry vlákna prebieha z taveniny aj z roztoku, pričom v druhom prípade je výhodná prítomnosť zbytkových rozpúšťadiel vo vlákne, vzhľadom na ich plastifikačný účinok. Z technologického hľadiska sa zdá byť najvhodnejším spôsobom prípravy zvlákňovanie z gélu (napr. 1,2-dichlóretán)²⁸. Vlákna pripravené týmto spôsobom sa vyznačujú vysokou tuhosťou a pevnosťou (pevnosť v ťahu $\sigma_p = 103$ až 360 MPa) v závislosti od použitej úpravy po zvlákňovaní (dĺženie, temperovanie). Pevnosť v ťahu dlžených vlákien z taveniny sa pohybuje v rozpätí 40–250 MPa a predĺženie pri pretrhnutí dosahuje hodnoty až do 70 % (cit.²⁹).

4.2.2. Starnutie PHB fyzikálnymi procesmi

Zaujímavým faktorom, ktorý do značnej miery limituje využitie PHB, je fenomén starnutia. Tento jav spočíva v tom, že s dobou skladovania materiálu pri podmienkach okolia dochádza k výrazným zmenám vo fyzikálnych vlastnostiach polyméru, čo má za následok krehnutie polymérneho materiálu. Nárast modulu pružnosti a pevnosti v ťahu s dobou starnutia sprevádza pokles hodnôt predĺženia pri pretrhnutí. Tento efekt vysvetľujú dve teórie:

a) Teória fyzikálneho starnutia

Fyzikálne starnutie je relaxačný proces amorfných polymérov. Keďže vibračný pohyb segmentov je pod T_g obmedzený, konformačné zmeny vo veľkom merítku nie sú možné. Napriek tomu, ak sa materiál rýchlo ochladí z taveniny do skelného stavu, amorfné reťazce nedosiahnu rovnovážny voľný objem a ak sa materiál následne skladuje pri teplotách okolo T_g , pomalým reorganizovaním reťazcov voľný objem klesá. V semikryštalických polyméroch kryštály slúžia ako fyzikálne sieťovadlá, ovplyvňujú správanie sa interlamelárneho amorfného materiálu a spôsobujú, že fyzikálne starnutie sa pozoruje aj pri teplotách o niečo vyšších ako T_g . Efekt fyzikálneho starnutia sa dá úplne zvrátiť regenerovaním voľného objemu. Regenerovanie sa dosiahne jednoducho zahrievaním materiálu nad T_g , alebo mechanickým namáhaním. Keďže tieto postupy neovplyvňujú na kryštalinitu, reverzibilný charakter fyzikálneho starnutia ho dovoľuje rozlíšiť od progresívnej kryštalizácie.

Idea, že proces fyzikálneho starnutia je zodpovedný za krehnutie PHB, bola zvažovaná viacerými autormi^{30–32}. Pokles maximálnej hodnoty stratového faktora ($\tan \delta = f(T)$) s dobou skladovania, stanovený z DMTA, indikuje prítomnosť relaxačného deja, podobného, ako sa pozoruje u amorfných polymérov, ale zároveň nevyučuje aj vplyv iného procesu, zodpovedného za zníženú pohyblivosť reťazcov v amorfnej fáze³⁰.

Koning a Lemstra³¹ starnutý materiál pred charakterizáciou mechanických vlastností temperovali pri 70 °C, tj. pri teplote dostatočnej na zvrátenie fyzikálneho starnutia a zároveň príliš nízkej na to, aby spôsobila iné morfológické zmeny v materiáli. Takýmto spôsobom sa podarilo do určitej miery zregenerovať predĺženie z 8 na 12 %, zatiaľ čo pôvodný proces starnutia zredukoval túto veličinu z 45 na 8 %. Z výsledkov je zrejmé, že fyzikálne starnutie je faktor, ktorý sa podieľa na unikátnom správaní sa PHB, ale len v malej miere.

b) Teória sekundárnej kryštalizácie

Počas spracovania PHB nedochádza k ukončeniu kryštalizácie medzi spracovateľskými cyklami a následne prebieha progresívna kryštalizácia. Keďže rýchlosť tohto procesu je limitovaná pri izbovej teplote kvôli blízkosti T_g , sekundárna kryštalizácia PHB zahŕňa najmä proces „zdokonaľovania“ lamiel, ktorý spôsobuje redukciiu amorfnó–kryštalickej medzifázy³³ a tým sa zvyšuje pnutie v amorfnej fáze. Napriek tomu, okrem dokryštalizovania už vzniknutých kryštálov, skladovanie PHB sprevádza aj vývoj nových kryštálov, ktoré sa topia pri 77 °C (cit.³⁴). Dilatometricky stanovený nárast kryštalinity o 7 % z pôvodných 56 % v priebehu 8 dní od spracovania polyméru potvrdzuje priebeh progresívnej kryštalizácie. Po 1 mesiaci skladovania dochádza k ukončeniu kryštalizácie a zároveň, ako udávajú autori, tento čas korešponduje s konečnými zmenami mechanických vlastností³¹. Časový súlad však nebol pozorovaný inými autormi³⁵, ktorí uvádzajú nárast kryštalinity len po dobu niekoľkých hodín starnutia PHB.

Mechanizmus sekundárnej kryštalizácie podporujú aj výsledky získané modelovaním procesov³⁶. Počas starnutia dochádza k tvorbe helikálnych štruktúr na okrajoch reťazcov spojovacích makromolekúl, ktoré sa postupne zabudovávajú do kryštalickej fázy. Takýto systém je stabilizovaný silnými intermolekulovými interakciami medzi helixami kryštalickej fázy. Skrátenie okrajov reťazcov je kompenzované natiahnutím stredových segmentov reťazcov, čím sa zvyšuje pnutie v molekule.

4.3. Biodegradácia

Jednou zo základných vlastností PHB je jeho environmentálna kvalita, ktorá o.i. zahŕňa schopnosť materiálu biodegradovať vo vhodnom prostredí. Enzymatická degradácia mikrobiálneho poly(3-hydroxybutyrátu) je pomerne rýchly proces (tabuľka IV), pričom na jeho rýchlosť vplyva niekoľko faktorov. Okrem biodegradačného prostredia, významnú úlohu zohráva kryštalinita polyméru³⁷, pretože

Tabuľka IV

Úplná biodegradácia jednoduchého kryštálu¹⁴ a PHB materiálu⁴⁰ v rôznych prostrediach

Prostredie	Vzorka	Doba [týždeň]
Inkubované depolymerázou	kryštál	0,3
Pôda (25°C)	odliatok 1 mm	76
	fólia 75 µm	12
Riečne sedimenty (20°C)	odliatok 1 mm	39
	fólia 75 µm	8

PHB depolymeráza prednostne hydrolyzuje reťazce v amorfnej fáze a až následne dochádza k degradácii kryštalickej fázy. Napriek tomu Rosa a spol. nepozorovali žiadnu koreláciu medzi kryštalinitou polymérov a ich biodegradáciou^{38,39}, ak sa biodegradácia uskutočnila v pôdnom komposte bez dodatočného naočkovania kompostu rozkladným enzýmom. Dôležitejšiu úlohu ako kryštalinita má v tomto prípade teplota biodegradácie, keď teplota vyššia ako 25 °C (46 °C) podporuje rast termofilných organizmov, ktorým PHB slúži ako zdroj výživy³⁸. Rýchlosť biodegradácie polyesterov navyše možno zvýšiť termickým kondicionovaním vzoriek pred samotnou biodegradáciou³⁹.

Mechanizmus enzymatického pôsobenia v procese degradácie sa pokúsili objasniť Seebach a spol. použitím PHB depolymerázy z *Alcaligenes faecalis*⁶. Autori vychádzajú z modelu aktívnych miest depolymerázy, ktorá pôsobí ako *endo* esteráza, čiže k štiepeniu reťazca nedochádza na koncoch reťazca, ale vo vnútri, a to výlučne medzi dvoma (*R*)-HB jednotkami. Tento fakt je dôvodom, prečo je syndiotaktický polymér stabilný voči enzymatickej degradácii, kým u ataktického PHB (racemická zmes (*R,S*)-HB jednotiek) môže dôjsť k enzymatickej hydrolyze iba v prípade, ak sa vyskytnú v reťazci vedľa seba dve (*R*)-HB jednotky.

5. Modifikácia PHB

Existuje viacero metód ako ovplyvniť vlastnosti PHB, v podstate ich možno rozdeliť do dvoch základných skupín, na fyzikálne a chemické. Medzi chemické metódy patrí kopolymerizácia alebo modifikačné postupy, ktoré vedú k zmene chemickej štruktúry homopolyméru napr. očkovanie, sieťovanie a pod. Na druhej strane častými fyzikálnymi metódami modifikácie PHB sú temperácia materiálu, aditívacia polyméru s nízkomolekulovými a príprava zmesí s vysokomolekulovými zlúčeninami.

5.1. Kopolymerizácia

Štatistické kopolyméry pripravené zamenou metylvej skupiny PHB za etylóvu, alebo dlhší substituent sa

syntetizovali s cieľom zvýšiť ťažnosť a tým aj húževnatosť polymérneho materiálu. Veľká pozornosť sa v tomto smere venuje kopolyméru hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátom [poly(HB-*co*-HV)] alebo hydroxyhexanoátom^{41,42}. Začlenenie jednotiek HV vedie k poklesu hodnôt modulov, k zvyšovaniu predĺženia pri pretrhnutí v závislosti od obsahu HV v kopolyméri a k tiež miernemu zlepšeniu termickej stability.

Často používaným postupom, ktorý v konečnom dôsledku môže viesť k syntéze PHB kopolymérov, je transesterifikácia alifatickými diolmi. V prvom kroku reakcie dochádza k tvorbe PHB-diolu, a to buď degradačnou reakciou (alkoholýza polyméru^{43,44}), alebo syntézou z nízkomolekulových HB zlúčenín (butyrolaktón⁴⁵, etyl-HB⁴⁶). Takto pripravené telechelické polyméry majú dobre definované reakčné koncové skupiny a sú vhodné na prípravu vysokomolekulových blokových kopolymérov procesom spájania reťazcov vhodnými činidlami^{44–49}.

Mechanické vlastnosti získaných materiálov priamo závisia od obsahu kryštalickej frakcie (*hard segment*) PHB-diolu v blokovom kopolyméri. Všeobecne možno povedať, že s narastajúcim obsahom PHB-diolu dochádza k zvýšeniu pevnosti v ťahu a znižovaniu predĺženia pri pretrhnutí. Na druhej strane typ nekryštalizujúceho segmentu (*soft segment*, napr. dioly na báze kyseliny polyadipovej, polyetylénoxidu, alebo polykaprolaktónu) má iba malý vplyv na modul pružnosti. Dĺžka reťazca *soft* segmentu nepriamo ovplyvňuje morfológiu a mechanické vlastnosti kopolyméru. *Soft* segmenty sú ďalej rozhodujúce z hľadiska degradovateľnosti, chemickej a biologickej funkčnosti materiálu.

5.2. Chemická modifikácia

V literatúre sú popísané viaceré spôsoby chemickej modifikácie PHB, hoci celkový počet prác zďaleka nedosahuje množstvo prác publikovaných napr. pre polyolefíny.

Reaktívne sieťovanie polyméru organickými peroxidmi za prítomnosti koagenta sieťovania sa zdá byť do istej miery vhodnou cestou ako ovplyvniť mechanické vlastnosti a zároveň prispieť ku termickej stabilizácii PHB²⁶. Prítomnosť siete spôsobuje, že termická degradácia porušuje väzby v polyméri s relatívne menším efektom na prietok taveniny. Koncové skupiny tvorené termickou degradáciou PHB sú predovšetkým krotonylové a karboxylové skupiny. Snaha polymerizovať vznikajúce krotonylové skupiny použitím oxidačného činidla by mohla viesť ku konverzii nenasýtených väzieb na glykolové jednotky, ktoré môžu ďalej kondenzovať s karboxylovými skupinami. Praktickejšou alternatívou je sieťovanie iniciované zdrojom voľných radikálov, predovšetkým termickým rozkladom organických peroxidov. Iniciácia γ žiarením nie je vhodná, pretože spôsobuje degradáciu PHB⁵⁰, ako autori ukazujú na výraznom poklese mólovej hmotnosti, čím sa vysvetľuje aj značný pokles pevnosti v ťahu.

Reakcie iniciované voľnými radikálmi možno využiť aj na iné typy modifikácie. Napríklad PHB materiály očko-

vané maleinanhydridom^{51,52} pripravené v prítomnosti benzoylperoxidu ako iniciátora vykazujú zvýšenú termickú stabilitu v porovnaní s homopolymérom. Teplota rozkladu sa zvýši o 20 °C a inkorporácia maleinanhydridových skupín dokonca urýchli biodegradáciu PHB.

Z hľadiska modifikácie sú zaujímavé PHA obsahujúce funkčnú skupinu (halogén, nitril), alebo nenasýtenú väzbu na relatívne dlhom bočnom reťazci. Takéto PHA sú syntetizované baktériami typu *Pseudomonas Oleovorans*. Zlepšenie ich elastických vlastností sa dá dosiahnuť okrem sieťovania peroxidmi a sírou (vulkanizácia) aj kvantitatívnou konverziou dvojitych väzieb na epoxidové skupiny (epoxidácia), ktoré sa ďalej môžu sieťovať vhodným sieťovacím činidlom^{53,54}.

5.3. Fyzikálna modifikácia

Jednoduchým spôsobom fyzikálnej modifikácie je temperovanie materiálu pri teplotách pod T_m polyméru. Počas nekontrolovanej kryštalizácie PHB sa tvoria defektné kryštály s rôznou teplotou topenia (80–180 °C), čo indikuje pomerne širokú distribúciu hrúbky lamiel. Temperovaním sa táto distribúcia zúži. Navyše ak sa materiál pred skladovaním temperuje dostatočne dlhý čas, rekryštalizácia v dôsledku starnutia polyméru prebieha v menšej miere. Maximálnym prínosom tejto modifikácie sa zdá byť dosiahnutie limitnej hodnoty ťažnosti 30 %, a to temperovaním PHB pri teplote 150 °C (cit.⁵⁵).

Miešanie PHB so zlúčeninami s nízkou mólovou hmotnosťou, alebo s polyméromi je ďalšia cenovo relatívne nenáročná a technologicky jednoduchá cesta ako zlepšiť niektoré fyzikálne vlastnosti PHB. Ovplyvnenie procesu kryštalizácie PHB sa rieši prídavkom nukleačných činidiel ako nitríd bóru, sacharín, alebo chlorid amónny⁵⁶, ktoré zvyšujú nukleačnú hustotu, a tým minimalizujú časové cykly počas spracovania polyméru. Dochádza k tvorbe väčšieho počtu menších kryštalitov, čo má za následok zvýšenie húževnatosti materiálu.

Priama cesta pre získanie húževnatejšieho materiálu v porovnaní s čistým PHB spočíva v použití plastifikátorov. V závislosti od typu a obsahu aditíva dochádza k posunu T_g smerom k nižším hodnotám a k nárastu predĺženia v niektorých prípadoch až na hodnoty nad 250 % pri približne 30% obsahu plastifikátora (napr. oxopropylglycerol, dibutylsebakát)^{57,58}. Z hľadiska termických vlastností PHB niektoré plastifikátory pôsobia prodegradačne (glycerol), triacetát glycerolu je z tohto pohľadu inertný⁵⁹.

Miešanie poly(3-hydroxybutyrátu) s inými biodegradovateľnými polyméromi je často využívanou metódou na prípravu materiálu s cieľenými mechanickými vlastnosťami. Pearce a spol. študovali miešateľnosť zmesí bakteriálneho izotaktického PHB a syntetického ataktického PHB metódou DSC. Zistili, že zmesi sú miešateľné nad 60 % syntetického polyméru a fázové správanie sa je vysoko citlivé na parametre ako postup prípravy vzoriek, mólová hmotnosť ai.⁶⁰ Na druhej strane zmesi PHB/polyhydroxyvalerát (PHV) obsahujú oddelené fázové domény v tavenine, ktoré následne kryštalizujú ako PHB

a PHV typy sféruilitov⁶¹.

Abe a spol.⁶² použili vo svojej práci poly[(*R,S*)-3HB-*b*-6HH] ako kompatibilizátor pre nemiešateľné zmesi PHB a P6HH (poly-6-hydroxyhexanoát). Prídavok malého množstva kopolyméru do zmesi spôsobil zmenšenie veľkosti dispergovaných P6HH domén. Predĺženie pri pretrhnutí trojzložkových zmesí sa zvýšilo až na 68 % oproti pôvodnému PHB, zmesi sa správali flexibilnejšie a húževnatejšie.

Ďalšie biodegradovateľné zmesi tvorí PHB s polyvinylalkoholom (PVA)⁶³. Komerčný PVA je fakticky kopolymér vinylalkoholu a vinylacetátu pripravený z polyvinylacetátu (PVAc) hydrolýzou. Vlastností zmesi závisia od obsahu zvyškového vinylacetátu, ktorý v konečnom dôsledku ovplyvňuje tiež miešateľnosť/kompatibilitu s PHB. Zjavne slabé mechanické vlastnosti sa pripisujú prodegradačnému účinku glycerolu, ktorý bol v systéme použitý ako plastifikátor.

Miešateľnosť zmesí PHB/polyetylén glykol (PEG) sa potvrdila na základe analýz DSC⁶⁴. V dôsledku zvyšovania obsahu PEG v zmesi došlo k poklesu T_m PHB. Hodnoty indexu toku taveniny potvrdili zlepšenie termickej stability polyméru a tým aj zlepšenie spracovateľnosti. Zmesi PHB/polyetylén oxid sú miešateľné⁶⁵, alebo čiastočne miešateľné v tavenine v závislosti od zloženia zmesi⁶⁶.

PHB a poly(ϵ -kaprolaktón) (PCL) tvoria nemiešateľné zmesi a hodnoty modulov pružnosti a pevnosti v ťahu tohto systému prechádzajú minimom, čo je príznačné pre nekompatibilné zmesi⁶⁷. Ak sa na kompatibilizáciu takejto zmesi použije kopolymér poly(HB-*co*-CL), so zvyšovaním jeho obsahu v systéme sa teplota topenia PHB posunie smerom k nižším hodnotám a naopak T_m PCL smerom k vyšším hodnotám⁶⁸.

V literatúre sú popísané aj zmesi poly(3-hydroxybutyrátu) s inými biopolymérami; napr. Koyama a Doi zistili, že PHB a poly(D,L-laktid) tvoria miešateľné zmesi v amorfnej fáze. K tomuto záveru dospeli na základe stanovenia jednej T_g pre celý koncentračný rozsah zmesí⁶⁹. Na druhej strane, nemiešateľné, ale kompatibilné zmesi boli pripravené s poly(butylénsukcinát-*co*-butylénadipátom) a poly(butylénsukcinát-*co*- ϵ -kaprolaktónom)⁷⁰. Tieto zmesi sa študovali predovšetkým vzhľadom na ich biodegradabilitu.

Na rozdiel od vyššie uvedených zmesí, pri ktorých sa primárne kladie dôraz na ich biodegradovateľnosť, zmesi PHB s nebiodegradovateľnou zložkou sú zaujímavé predovšetkým z hľadiska ekonomického, pričom PHB sa kvalifikuje ako materiál z obnoviteľných zdrojov, ktorý dodáva zmesi niektoré špecifické charakteristiky, napr. zlepšené bariérové vlastnosti. Širší prehľad o vlastnostiach zmesí obsahujúcich mikrobiálny PHB prináša prehľadový článok Ha a spol. (cit.⁷⁰).

6. Aplikácie materiálov na báze PHB

Napriek rozsiahlej snahe mnohých autorov stabilizovať poly(3-hydroxybutyrát) a zvýšiť húževnatosť materiá-

lov na báze PHB sa polyester v praxi zatiaľ využíva iba ako kopolymér s hydroxyvalerátom [poly(HB-*co*-HV)]. Koncentrácia HV jednotiek ovplyvňuje vlastnosti a degradačné schopnosti materiálu, takže určuje spôsob vhodnej aplikácie. Papier s nanosom kopolyméru poly(HB-*co*-HV) je úplne biodegradovateľný a recykluje sa oveľa ľahšie ako konvenčne fóliovaný papier⁷¹. Jedna z najjednoduchších aplikácií poly(HB-*co*-HV) je biodegradovateľná náhrada za polyolefinové kontajnery, plastové fólie a tašky. Jedným z prvých komerčne dostupných produktov na trhu boli degradovateľné šampónové fľaše⁷².

Potenciálne využitie čistého PHB je v súčasnosti najviac orientované do oblastí, kde sa nekladie dôraz na húževnatosť materiálu, ale predovšetkým na jeho čistotu. Z dôvodu vysokej biokompatibility materiálov na báze PHB je ich možné využitie zamerané predovšetkým do oblasti humánnej medicíny a farmakológie^{73–75}, či už vo forme matric slúžiacich ako kostra pre rast a rozmnožovanie buniek v tkanivovom inžinierstve alebo v oblasti riadeného uvoľňovania liečiv. Ďalšími oblasťami, v ktorých by PHB mohlo nájsť uplatnenie, sú poľnohospodárstvo a spotrebný priemysel. V poľnohospodárstve je to predovšetkým forma matric pre živiny a pesticídy⁷⁶. Imobilizované zlúčeniny v matrici pôsobia dlhšie, ich uvoľňovanie je regulované a rastlina ich efektívnejšie využíva.

7. Záver

Poly(3-hydroxybutyrát) by mohol byť cenným materiálom pre vysokotonážne využitie, predovšetkým v obalovom priemysle z hľadiska jeho environmentálnej kvality za predpokladu, že sa podarí zlepšiť niektoré vlastnosti (termická stabilita, húževnatosť) a prípadne znížiť cenu polyméru. Cesta, naznačená v predloženej práci spočíva v modifikácii polyméru, či už chemickou, alebo fyzikálnou metódou, prípadne kombináciou oboch postupov. Možno predpokladať, že synergickým pôsobením viacerých postupov sa podarí získať materiál vhodný i pre vysokotonážne náročné použitie.

LITERATÚRA

- Steinbüchel A., Valentin H. E.: FEMS Microbiol. Lett. 128, 219 (1995).
- Maskey R. P., Kock I., Shaaban M., Grün-Wollny I., Helmke E., Mayer F., Wagner-Döbler I., Laatsch H.: Polym. Bull. 49, 87 (2002).
- Poirier Y.: Curr. Opin. Biotechnol. 10, 181 (1999).
- Doepner B., Thierfelder S., Hirche H., Benndorf K.: J. Physiol. 500, 85 (1997).
- Reusch R., Sadoff H.: J. Bacteriol. 156, 778 (1983).
- Seebach D., Fritz M. G.: Int. J. Biol. Macromol. 25, 217 (1999).
- Cook C. D., Aceto M. D., Coop A., Beardsley P. M.: Psychopharmacology 160, 99 (2002).
- Kyles R. E., Tonelli A. E.: Macromolecules 36, 1125 (2003).

9. Xu J., Gou B. H., Yang R., Wu Q., Chen G. Q., Zhang Z. M.: *Polymer* 43, 6893 (2002).
10. Orts W. J., Bluhm T. L., Hamer G. K., Marchessault R. H.: *Macromolecules* 23, 5368 (1990).
11. Kemnitzer J. E., McCarthy S. P., Gross R. A.: *Macromolecules* 25, 5927 (1992).
12. Ackermann J. U., Babel W.: *Polym. Degrad. Stab.* 59, 183 (1998).
13. Aldor I. S., Keasling J. D.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 475 (2003).
14. Noda I., Marchessault R. H., Terada M., v kniže: *Polymer Data Handbook* (Mark J. E., ed.), str. 586. Oxford University Press, New York 1999.
15. Anderson A. J., Dawes E. A.: *Microbiol. Rev.* 54, 450 (1990).
16. Koning G. J. M., Lemstra P. J.: *Polymer* 33, 3292 (1992).
17. Benvenuti M., Lenz R. W.: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 29, 793 (1991).
18. Jaimes C., Couve J., Crette S., Sledz J., Schue F.: *Eur. Polym. J.* 32, 1175 (1996).
19. Van de Velde K., Kiekens P.: *Polymer Testing* 21, 433 (2002).
20. Špitalský Z., Lacík I., Lathová E., Janigová I., Chodák I.: *Polym. Degrad. Stab.* 91, 856 (2006).
21. Kopinke F. D., Mackenzie K.: *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 40-41, 43 (1997).
22. Kopinke F. D., Remmler M., Mackenzie K.: *Polym. Degrad. Stab.* 52, 25 (1996).
23. Grassie N., Murray E. J., Holmes P. A.: *Polym. Degrad. Stab.* 6, 47 (1984).
24. Grassie N., Murray E. J., Holmes P. A.: *Polym. Degrad. Stab.* 6, 95 (1984).
25. Aoyagi Y., Yamashita K., Doi Y.: *Polym. Degrad. Stab.* 76, 53 (2002).
26. Billingham N. C., Henman T. J., Holmes P. A., v kniže: *Developments in Polymer Degradation* (Grassie N., ed.), kap. 3, str. 81. Elsevier Applied Science, London 1987.
27. Lüpke T., Radusch H. J., Metzner K.: *Macromol. Symp.* 127, 227 (1998).
28. Gordeyev S. A., Nekrasov Yu. P., Shilton J.: *J. Appl. Polymer Sci.* 81, 2260 (2001).
29. Yamane H., Terao K., Hiki S., Kimura Y.: *Polymer* 42, 3241 (2001).
30. Scandola M., Cerrorulli G., Pizzoli M.: *Macromol. Chem. Rapid Commun.* 10, 47 (1989).
31. Koning G. J. M., Lemstra P. J.: *Polymer* 34, 4089 (1993).
32. Hurrell B. L., Cameron R. E.: *Polym. Int.* 45, 308 (1998).
33. Koning G. J. M., Scheeren A. H. C., Lemstra P. J., Peeters M., Reynaers H.: *Polymer* 35, 4598 (1994).
34. Biddlestone F., Harris A., Hay J. N., Hammond T.: *Polym. Int.* 39, 221 (1996).
35. Chodák I., v kniže: *Degradable Polymers, Principles and Applications* (Scott G., ed.), kap. 9, str. 295. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht/Boston/London 2002.
36. Špitalský Z., Bleha T.: *Macromol. Biosci.* 4, 601 (2004).
37. Abe H., Doi Y.: *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 185 (1999).
38. Lotto N. T., Calil M. R., Guedes C. G. F., Rosa D. S.: *Mater. Sci. Eng., C* 24, 659 (2004).
39. Rosa D. S., Calil M. R., Guedes C. G. F., Rodrigues T. C.: *J. Polym. Environ.* 12, 239 (2004).
40. Lapčík L., Raab M.: *Nauka o materiálech*. Univerzita Tomáše Bati, Zlín 2001.
41. He J.-D., Cheung M. K., Yu P. H., Chen G.-Q.: *J. Appl. Polymer Sci.* 82, 90 (2001).
42. Yoshie N., Saito M., Inoue Y.: *Polymer* 45, 1903 (2004).
43. Hirt T. D., Neuenschwander P., Suter U. W.: *Macromol. Chem. Phys.* 197, 1609 (1996).
44. Li J., Li X., Ni X. P., Leong K. W.: *Macromolecules* 36, 2661 (2003).
45. Hiki S., Miyamoto M., Kimura Y.: *Polymer* 41, 7369 (2000).
46. Saad G. R., Lee Y. J., Seliger H.: *Macromol. Biosci.* 1, 91 (2001).
47. Andrade A. P., Witholt B., Hany R., Egli T., Li Z.: *Macromolecules* 35, 684 (2002).
48. Hirt T. D., Neuenschwander P., Suter U. W.: *Macromol. Chem. Phys.* 197, 4253 (1996).
49. Saad G. R., Seliger H.: *Polym. Degrad. Stab.* 83, 101 (2004).
50. Luo S., Netravali A. N.: *J. Appl. Polymer Sci.* 73, 1059 (1999).
51. Chen Ch., Fei B., Peng S., Zhuang Y., Dong L., Feng Z.: *J. Appl. Polymer Sci.* 84, 1789 (2002).
52. Chen C., Peng S., Fei B., Zhuang Y., Dong L., Feng Z., Chen S., Xia H.: *J. Appl. Polymer Sci.* 88, 659 (2003).
53. Lee M. Y., Cha S. I., Park W. H.: *Polymer* 40, 3787 (1999).
54. Park W. H., Lenz R. W., Goodwin S.: *Polym. Degrad. Stab.* 63, 287 (1999).
55. Koning G. J. M.: *Dissertation*. Technical University Eindhoven, Eindhoven 1993.
56. Barham P. J.: *J. Mater. Sci.* 19, 3826 (1984).
57. Savenkova L., Gerberga Z., Nikolaeva V., Dzene A., Bibers I., Kalnin M.: *Process Biochem.* 35, 573 (2000).
58. Bibers I., Tupureina V., Dzene A., Savenkova L., Kalnis M.: *Macromol. Symp.* 170, 61 (2001).
59. Janigová I., Lacík I., Chodák I.: *Polym. Degrad. Stab.* 77, 35 (2002).
60. Pearce R., Jesudason J., Orts W., Marchessault R. H., Bloembergen S.: *Polymer* 33, 4647 (1992).
61. Gassner F., Owen A. J.: *Polym. Int.* 39, 215 (1996).
62. Abe H., Doi Y., Kumagai Y.: *Macromolecules* 27, 6012 (1994).
63. Yoshie N., Azuma Y., Sakurai M., Inoue Y.: *J. Appl. Polymer Sci.* 56, 17 (1995).
64. Zhang Q., Zhang Y., Wang F., Liu L., Wang C.: *J. Mater. Sci. Technol.* 14, 95 (1998).

65. Park S. H., Yoon J. S., Lee H. S., Choi S. J.: *Polymer Eng. Sci.* 35, 1636 (1995).
66. He Y., Asakawa N., Inoue Y.: *Polymer Int.* 49, 609 (2000).
67. Kumagai Y., Doi Y.: *Polym. Degrad. Stab.* 36, 241 (1992).
68. Kim B. O., Woo S. I.: *Polymer Bulletin* 41, 707 (1998).
69. Koyama N., Doi Y.: *Can. J. Microbiol.* 41, 316 (1995).
70. Ha Ch. S., Cho W. J.: *Prog. Polym. Sci.* 27, 759 (2002).
71. Hocking P. J., Marchessault R. H., v kniže: *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers* (Griffin G. J. L., ed.), kap. 4, str. 48. Blackie Academic & Professional, London 1994.
72. www.usask.ca/agriculture/plantsci/classes/plsc416/projects_2002/immell/applications.html, stiahnuté 16. júla 2005.
73. Williams S. F., Martin D. P., Horowitz D. M., Peoples O. P.: *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 111 (1999).
74. Eligio T., Rieumont J., Sánchez R., Silva J. F. S.: *Angew. Makromol. Chem.* 270, 69 (1999).
75. Hoffman A. S.: *Advanced Drug Delivery Reviews* 43, 3 (2002).
76. Savenkova L., Gereberga Z., Muter O., Nikolaeva V., Dzene A., Tupureina V.: *Process Biochem.* 37, 719 (2002).

G. Miková and I. Chodák (*Polymer Institute, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic*): **Properties and Modification of Poly(3-hydroxybutanoate)**

Poly(3-hydroxybutanoate) (PHB) is a biodegradable polyester, conventionally processable due to its thermoplasticity. Even though PHB has many advantages over other plastics, its wide use is hindered by unacceptable brittleness, high price and a high sensitivity to thermal degradation. The present paper provides an overview of basic properties of PHB and of possible ways of their modification, which could lead to a material with improved properties, suitable for application on a larger scale.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze nabízí zaměstnání

Pozice: referentka na studijním oddělení děkanátu Fakulty chemické technologie VŠCHT Praha
Pracovní náplň: doktorské studium, agenda vědy a výzkumu

Požadavky: úplné střední vzdělání, pasivní znalost a.j., dobrá znalost práce s PC (Excel, Word), komunikativnost, vstřícnost, přátelský přístup

Co nabízíme: příjemný pracovní kolektiv, práce s mladými lidmi, možnost využití školních rekreačních zařízení, příspěvek k důchodovému pojištění, pravidelné nabídky kulturních akcí

Nástup: 1.5. 2007

Úvazek: 40 hodin/týden

Platové zařazení B4, podle tarifních tříd VŠCHT Praha

Nabídky se stručným životopisem, doloženým vzděláním a přehledem dosavadní praxe zasílejte na adresu:

Vysoká škola chemicko – technologická v Praze

Ing. Pavla Vlčková

Personální odbor

Technická 5

166 28 Praha 6

SOUČASNÉ TRENDY V ANALÝZE EUKARYOTICKÝCH PROTEOMŮ, GLYKOMŮ A LIPIDOMŮ

PETR MAN^a a KAREL BEZOUŠKA^{a,b}

^a Mikrobiologický ústav AV ČR Praha, Videňská 1083, 142 20 Praha 4, ^b Katedra biochemie přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Hlavova 8, 128 40 Praha 2
bezouska@biomed.cas.cz

Došlo 12.9.05, přijato 18.11.05.

Klíčová slova: proteomika, eukaryotické organismy, glykomika, lipidomika

Obsah

1. Úvod
2. Specifika eukaryotické proteomiky
3. Nové postupy eukaryotické proteomiky
4. Hlavní strategie glykomiky
5. Analýza glykosylací
6. Určení typu glykosylace
7. Nalezení glykosylačních míst a určení typu glykanů
8. Lipidomika
9. Závěr

1. Úvod

Cílem proteomiky je dynamické sledování veškerého souboru proteinů určité buňky, tkáně, nebo organismu. Nedávné desáté výročí tohoto nového experimentálního oboru představujícího důležitý milník na cestě od genetické informace k jejímu vyjádření v proteinech a současné systémové analýze veškerých fenotypových znaků vedlo k řadě diskusí a úvah o výsledcích, možnostech, omezeních a perspektivách současné proteomiky¹. Zdaleka nejžhavější diskuse se přitom odehrávaly v oblasti proteomiky eukaryotických organismů. Je to způsobeno zejména tím, že zatímco při analýze genové exprese u bakterií často vystačíme s klasickou dvojrozměrnou proteinovou mapou používanou v biochemii již od poloviny 70. let minulého století², je taková analýza jen ve výjimečných případech dostačující při zkoumání proteomů u eukaryotických organismů. Abychom mohli pochopit obtížnost vytyčení základní výzkumné linie v eukaryotické proteomice, o níž se tak vášnivě diskutuje v akademickém sektoru, v laboratořích proteomických firem, i na půdě mezinárodních proteomických organizací jako jsou Human Proteome

Organization (HUPO)³ popř. právě ustavovaná European Proteomic Association (EuPA)⁴, musíme se nejprve zabývat některými specifiky eukaryotické proteomiky. Jde zejména o proteomiku člověka a jiných modelových organismů, jejichž genom již byl úplně nebo z velké většiny sekvenován.

2. Specifika eukaryotické proteomiky

Eukaryotická proteomika bývá často uváděna jako pokračování a vyústění eukaryotické genomiky, od níž převzala některé pohledy a přístupy. Přitom je však nezbytné si uvědomit, že z metodického hlediska představují proteiny naprosto svébytnou třídu biologických makromolekul značně odlišných od DNA. Proteiny nelze na rozdíl od DNA molekul namnožit *in vitro*, proto jsou dodnes proteomické experimenty závislé na izolacích proteinů z přirozených zdrojů, jejichž dostupnost je mnohdy omezená.

Expresí relativně malého počtu genů (asi 40 000 genů u člověka) vzniká ohromný počet proteinových molekul v důsledku existence genových polymorfismů, splicingových variant a posttranslačních modifikací (viz níže). Předpokládá se, že lidský proteom obsahuje přes milion různých proteinových molekul, byť stále nejsou k dispozici údaje pro kvalifikovanější odhad jejich počtu⁵.

V analyzovaných vzorcích eukaryotických proteomů se mohou proteiny vyskytovat v koncentracích, pohybujících se v rozmezí 10 řádů – zatímco koncentrace albuminu v lidském séru je 50 mg ml⁻¹, koncentrace interleukinu-6 v témže materiálu činí 2 pg ml⁻¹ (cit.^{6,7}). Tento ohromný koncentrační rozsah klade nejen mimořádné nároky na dynamický rozsah analytických metod, ale komplikuje i separační postupy, při nichž se separační účinnost často zhoršuje vlivem nejhojněji zastoupených proteinů.

Nedávné výzkumy dále ukazují, že za fyziologických podmínek se v buňce vyskytuje značné procento proteinů ve formě proteinových komplexů. Odhaduje se, že např. v kvasinkové buňce se může vyskytovat až polovina všech přítomných proteinů ve formě proteinových komplexů, z nichž 40 % je již detailně charakterizováno⁸. Kromě jednoduchých (binárních, ternárních nebo kvarterních) proteinových komplexů jsou fyziologicky velmi významné i dosti složité proteinové komplexy – např. ribosom obsahuje několik molekul ribonukleových kyselin a kolem stovky různých proteinů⁹.

Samostatnou kapitolou významně komplikující výzkum eukaryotických proteomů jsou potom posttranslační modifikace proteinů. Těch je dnes již popsána více než stovka a každým rokem přibývá kolem desítky nových. Jednou z nejsložitějších posttranslačních modifikací v proteomice je glykosylace, které jsou věnovány kapitoly

4–7 tohoto pojednání. Stejně rozmanité mohou být ovšem asociace proteinů s nepolárními lipidy, ať již jde o kovalentní lipidové modifikace, nebo asociace membránových proteinů s lipidy plasmatických membrán a membránových mikrodomén. Tomuto aspektu je věnována kapitola 8 tohoto přehledu.

Všechny výše uvedené charakteristiky eukaryotických proteomů kladou nejen vysoké nároky na použité analytické metody z hlediska jejich citlivosti, dynamického rozsahu a robustnosti, ale často vytyčují vysloveně protichůdné požadavky. Pro dokonalou separaci proteinových směsí je nezbytné pracovat s izolovanými polypeptidy za denaturujících podmínek, přitom se však ztrácí informace o biologických účincích proteinů a jejich uspořádání ve funkčně významných proteinových komplexech. Pro separaci a analýzu proteinových komponent eukaryotických proteomů je nezbytné z nich odstranit chemické substituenty vzniklé při posttranslačních modifikacích, ty však často definují jejich unikátní funkčně významné isoformy. To vše způsobuje, že v eukaryotické proteomice zatím neexistuje jediná všemi uznávaná centrální metoda nebo strategie výzkumu, jakou je např. amplifikace a sekvenování DNA v genomice. O různých přístupech a různých vědeckých školách v eukaryotické proteomice pojednává následující kapitola.

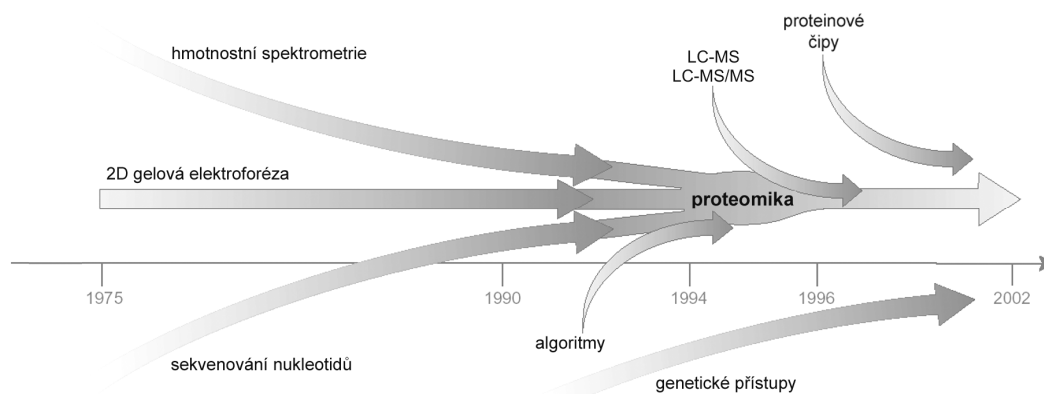
3. Nové postupy eukaryotické proteomiky

Přehled jednotlivých technik postupně aplikovaných ve výzkumu eukaryotických proteomů je znázorněn na obr. 1. Ačkoliv byla dvojrozměrná gelová elektroforéza dlouho hlavním a jediným nástrojem tohoto oboru^{10,11}, počátkem 90. let bylo zřejmé, že již nedostačuje zvýšeným nárokům a často protichůdným potřebám jednotlivých experimentů. Klíčovým problémem se tehdy jevila sekvenční identifikace proteinových skvrn na dvojrozměrných mapách, která zůstávala nezbytnou podmínkou korelace proteinových map s biologii specifických proteinů obsaže-

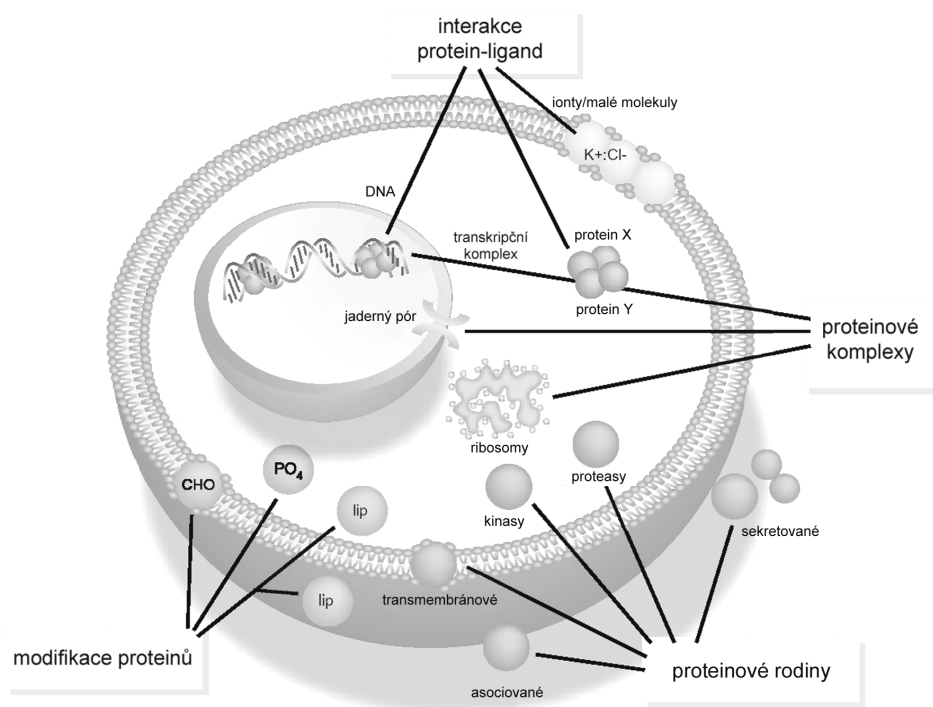
ných v databázích genetických sekvencí. V té době již bylo evidentní, že metody chemie proteinů, např. kvantitativní aminokyselinová analýza nebo *N*-terminální Edmanovo sekvenování, pro svou pomalost, pracnost a vysoké nároky na čistotu analyzovaných proteinů při řešení tohoto problému příliš nepomohou. Rychlého rozšíření však naopak dosáhly metody hmotnostní spektrometrie proteinů, jakmile byl v polovině 80. let rozřešen problém způsobu ionizace velkých, netěkavých proteinových molekul. Velmi oblíbeným nástrojem eukaryotické proteomiky se v tomto ohledu stala zejména metoda peptidového mapování založená na štěpení proteinů přímo v gelu a následné analýze hmotnostní spektrometrií – nejčastěji spojením ionizace MALDI^{12,13} a průletového analyzátoru. Tato metoda ve spojení s programy prohledávajícími databáze proteinových a nukleotidových sekvencí dnes umožňuje rutinně identifikovat protein ze skvrny obsahující nanogramová množství proteinu. Na začátku 90. let bylo dalším významným pokrokem uvedení hmotnostně spektrometrické techniky založené na ionizaci elektrosprejem¹⁴ do eukaryotické proteomiky, zejména poté, co byl Huntem a spol. prokázány možnosti této techniky založené na separacích na kapilárách spojených s tandemovou hmotnostní spektrometrií (odtud zkratka LC-MS/MS) při analýze složitých směsí peptidů eluovaných z molekul transplantačních antigenů¹⁵.

V současné době je v eukaryotické proteomice používán velmi široký soubor různých metodik. Jsou založené buď na výše popisovaných biochemických separacích spojených s hmotnostně spektrometrickou identifikací ať již v uspořádání „s gelem“ nebo „bez gelu“, popř. na analýze proteinových profilů s využitím jiných nástrojů kvantitativní proteomiky, jako je použití izotopových proteinových značek¹⁶, popřípadě proteinových čipů různé konstrukce^{17–19}. Charakteristický je vysoký stupeň automatizace a robotizace, a to zejména ve firemních laboratořích, které dnes do oblasti eukaryotické proteomiky velmi masivně investují.

Výše popsanými analytickými nástroji řeší současná



Obr. 1. Technologie současné eukaryotické proteomiky



Obr. 2. Hlavní cíle eukaryotické proteomiky

eukaryotická proteomika několik okruhů otázek, jak je znázorněno na obr. 2. Oblastí aktivně rozvíjenou zejména farmaceutickými firmami je sledování interakcí protein-ligand (v daném případě protein-léčivo), pro což jsou vyvíjeny nové bioafinitní techniky včetně některých umožňujících vyhodnotit i slabé biologické interakce s disociačními konstantami milimolárního řádu. Velkou oblastí zájmu nadále zůstává analýza proteinových komplexů a proteinových profilů jednotlivých organel, jako je jádro nebo jaderná obálka^{20,21}. Oblíbeným předmětem eukaryotické proteomiky je dále výzkum dynamiky jednotlivých rodin funkčně významných proteinů s jejich intracelulárními, jadernými a membránovými formami, a dále detailní výzkum funkčního významu proteinových modifikací, zejména fosforylací, glykosylací (viz. kapitoly 4–7) a lipidových modifikací (kapitola 8). Jednotlivé dílčí poznatky jsou potom integrovány do globálního obrazu eukaryotické buňky a jejích změn v průběhu klíčových fyziologických (buněčný cyklus, apoptóza) nebo patologických (infekce, nádorová transformace) procesů.

4. Hlavní strategie glykomiky

Posttranslační modifikace proteinů představují dnes jeden z nejsložitějších problémů komplikující proteomické analýzy. Důvodem pro to je jak ohromný celkový počet těchto modifikací mnohonásobně přesahující celkový počet proteinů a jejich variant, tak zásadní význam těchto

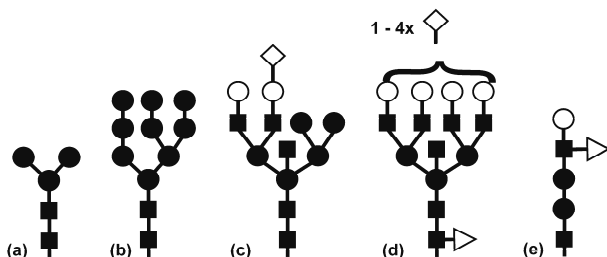
modifikací pro funkci bílkovin (ovlivňují zejména rozpustnost proteinů, jejich stabilitu, transport do specifických organel, enzymovou aktivitu, schopnost vázat ligandy a účastnit se předání signálu). Za jednu z nejvýznamnějších a nejsložitějších modifikací lze považovat glykosylace proteinů. Stejně tak jako se proteomika zabývá studiem proteinového komplementu genomu, je hlavním posláním glykomiky studovat glykosylace proteinů a lipidů. Cílem je získat znalosti o tom, jak glykosylace ovlivňuje funkci těchto molekul a také jak se mění glykosylace v různých stavech buňky nebo organismu. Tyto poznatky se poté dají aplikovat např. na diagnostiku onemocnění spjatých s chybnou glykosylací^{22–26}. Prvním krokem je detailní popis glykosylací proteinů a s tím související rozvoj metodik umožňující rychlé a jednoznačné analýzy.

Základní poznatky o glykosylacích

Glykosylace plní zejména funkci ochrannou – brání proteolýze, působení nízkých či extrémně vysokých pH a ochraňuje proteiny před volnými radikály. Dále také u řady proteinů napomáhají zaujmout správnou prostorovou strukturu, zajišťují dobrou rozpustnost, ovlivňují aktivitu enzymů, určují směřování uvnitř buňky a stabilizují proteiny uvolňované z buňky ven²⁵. Sacharidy se také uplatňují při interakcích mezi různými buňkami, v mechanismu mikrobiální infekce, nebo mají podpůrnou funkci při interakci receptoru s ligandem²⁷.

Odlišujeme dva základní druhy glykosylace *N*- a *O*-typu. U *N*-glykosylací je sacharid vázán na volný amidový dusík aminokyseliny asparaginu, který se navíc vyskytuje v tripletu asparagin, následovaný libovolnou aminokyselinou (pozice N+1) a hydroxyaminokyselinou (pozice N+2) – (Asn-Xaa-Ser/Thr). Je známo, že v pozici N+1 nemůže být prolin nebo kyselina asparagová. Tato pravidla jsou odvozena z faktu, že glykosylovány jsou v naprosté většině triplety, které se nalézají v β -strukturách nebo smyčkách a amidová skupina asparaginu zde tvoří vodíkový můstek s kyslíkem serinu nebo threoninu. Přítomnost prolinu by tvorbě tohoto můstku stericky bránila a skutečně není popsán žádný protein mající glykosylovaný triplet Asn-Pro-Ser/Thr. Při pohledu na pozici N+2 je zajímavé, že jsou známy proteiny, u nichž dochází k *N*-glykosylaci na tripletu Asn-Xaa-Cys (plasmový protein C a von Willebrandův faktor, aspartátové proteasy kvasinek). Z toho vyplývá, že kritéria pro připojení sacharidové struktury nejsou tolik striktní a hydroxyaminokyselina může být nahrazena cysteinem. Z pohledu sacharidu vycházíme u savčích *N*-glykosylací ze základní struktury – 2 *N*-acetylglukosaminy a 3 mannosy (obr. 3a). Od této struktury pak navázáním různých monosacharidových jednotek odvozujeme skupinu mannosových, komplexních a hybridních oligosacharidů (obr. 3b, 3c a 3d). Vedle variací co do počtu navázaných monosacharidů se však můžeme setkat i se strukturami zakončenými sulfátem či fosfátem. U vývoje nižších organismů a rostlin pak můžeme nalézt i struktury zcela odlišné od výše uvedených (obr. 3e).

Z hlediska biosyntézy je *N*-glykosylace kotranslačním jevem, neboť k připojení oligosacharidu k proteinu dochází v endoplasmatickém retikulu ještě před ukončením jeho biosyntézy. Výchozí oligosacharid je větvený, je charakteristický vysokým obsahem mannosy, a na jedné větvi je zakončen lineární sekvencí tří glukosylových zbytků. V endoplasmatickém retikulu a následně v Golgiho komplexu se postupně odštěpují glukosové a některé mannosové zbytky, a připojují se jiné monosacharidové jednotky. Evolučně původnější jsou struktury mannosového typu, u vyšších organismů je pak existence mannosových struktur známkou urychlené sekrece nebo metabolické poruchy^{29,30}.



Obr. 3. Schématické znázornění hlavních *N*-vázaných oligosacharidových struktur; a) „jádro“ skládající se ze dvou *N*-acetyl-D-glukosaminů a tří D-mannos, b) příklad struktury s vysokým obsahem mannosy, c) hybridní struktura, d) komplexní struktura, e) příklad neobvyklého typu *N*-vázaného sacharidu. Symboly: ■ – *N*-acetyl-D-glukosamin, ● – D-mannosa, ○ – D-galaktosa, ◇ – kyseliny sialové, ▷ – L-fukosa

Zatímco *N*-glykosylace se řídí výše uvedenými pravidly, u glykosylací *O*-typu se doposud žádná pravidla nepodařilo nalézt. Sacharidová struktura (mono-, di-, tri-, či oligosacharid) je vázána přes hydroxyskupinu serinu nebo threoninu. Jsou však popsány i *O*-glykosylace na tyrosinu, hydroxyprolinu a hydroxylysinu. Základních osm savčích struktur představujících tzv. jádro, tvoří *N*-acetylglukosamin a na něj vázaný jeden či dva sacharidy (galaktosa, *N*-acetylglukosamin, *N*-acetylglukosamin). Od těchto osmi struktur se dále odvíjejí nejrůznější typy oligosacharidů. *O*-Glykosylace se většinou neobjevuje na proteinech osamoceně, ale v určitých shlucích v oblastech bohatých na výskyt serinu a threoninu. Funkčně se *O*-glykosylace uplatňuje v tvorbě krevních skupin, účastní se na vývoji krevních buněk, a řada *O*-glykoproteinů se podílí na ochraně epitelu³¹.

5. Analýza glykosylací

Při analýze glykosylací je cílem:

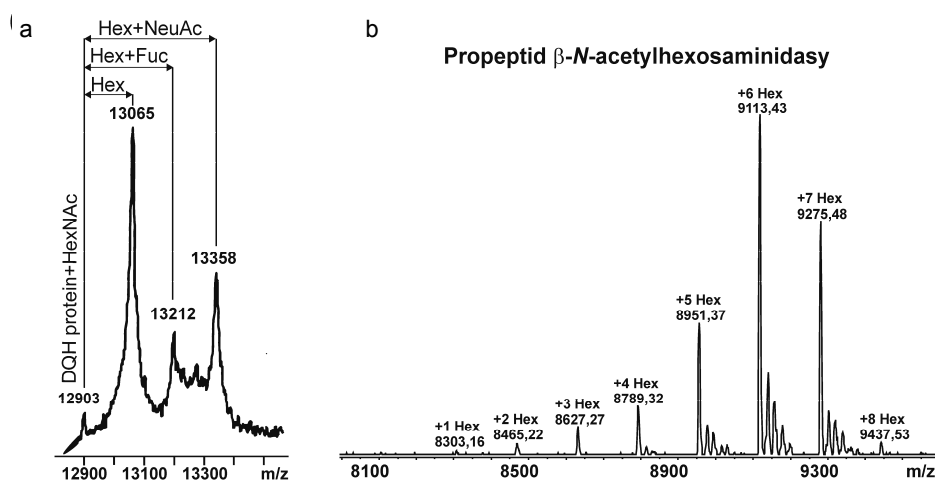
- zjištění, zda daný protein je či není glykosylován,
- určení typu glykosylace,
- nalezení glykosylačních míst,
- určení typu struktury a mikroheterogenity na jednotlivých místech.

V následujících kapitolách jsou probrány metodiky, které se k výše jmenovaným analýzám používají. Zvláštní důraz pak je kladen na hmotnostně spektrometrické techniky, které se dají považovat za nejuniverzálnější nástroj.

Detekce glykoproteinů

Prvním a nejsnáze rozlišitelným znakem glykoproteinů je jejich charakteristická migrace při polyakrylamidové elektroforéze. U jednorozměrných gelů vidíme, že se daný pruh nesoustředí do tenké zóny, ale tvoří širší pruh. Na dvourozměrných gelech se glykoproteiny buď separují do řady bodů o stejné molekulové hmotnosti, ale mírně odlišném isoelektrickém bodu (pI) nebo tvoří tzv. „smear“ – protáhlý pás ve směru pI.

Další variantou detekce glykoproteinů je oxidace kyselinou jodistou nebo manganistanem a modifikace oxidovaného sacharidu buď barvivem Fuchsinem, fluorescenční značkou nebo biotinem s hydrazidovou skupinou. Zatímco modifikace biotinem a následná detekce streptavidinem konjugovaným s křenovou peroxidasou je určena pouze pro vzorky na poly(vinylidendifluoridové) membráně, dají se značení barvivem či fluorescenční značkou použít jak na membráně, tak v gelu. Detekční limity se pohybují mezi 25–100 ng pro barevné značení, 5–25 ng pro fluorescenci a 20–100 ng pro biotinylation. Jinou technikou, která nám navíc poskytne informaci o terminálních sacharidových jednotkách, je převrstvení proteiny schopnými sacharidy navázat³². V řadě případů však nejrychlejší odpověď poskytne analýza celého proteinu hmotnostní spektrometrií na MALDI nebo ESI-FT-ICR. Není-li pro-



Obr. 4. Příklady hmotnostních spekter glykoproteinů – identifikace glykoforem; a) DQH-protein nesoucí *O*-glykosylaci, měřeno v lineárním módu technikou MALDI-TOF; b) propeptid β -*N*-acetylhexosaminidasy nesoucí *O*-glykosylaci. Spektrum naměřené na ESI-FT-ICR odhaluje zastoupení jednotlivých glykoforem (od jedné hexosy až po 8 hexosy)

tein glykosylován, získá se jeden ostrý pík (pokud neuvažujeme výskyt vícenásobně nabitých iontů). Je-li protein glykosylován, projeví se klasická mikroheterogenita již na proteinovém spektru, ve kterém odhalíme sérii píků, jejichž vzdálenost odpovídá určitému sacharidu (hexose, deoxyhexose, kyselině sialové apod.) (obr. 4, cit. ^{33,34}). Zde je nutno říci, že hmotnostní spektrometrie není schopná odlišit od sebe např. jednotlivé hexosy. Ty mají totiž stejné složení a tím i stejnou molekulovou hmotnost. Proto rozeznává pouze sacharidy lišící se složením – hexosu od deoxyhexosy, hexosu od *N*-acetylhexosaminu apod. MALDI matrice používané pro analýzu malých glykoproteinů (do 10 000 Da) jsou kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) nebo kyselina 3-hydroxy- α -kyano-skořicová (HCCA)³⁵. Pro větší proteiny je pak praktičtější využívat kyselinu sinapovou (SA), 2,4,6-trihydroxyacetofenon (THAP) nebo kyselinu 2-(4-hydroxyfenylazo)benzoovou (HABA).

6. Určení typu glykosylace

Nejpoužívanějším přístupem je enzymová deglykosylace *N*-glykosidasou F (PNGasa F). Ta odštěpuje celou sacharidovou strukturu a zároveň s tím mění původně glykosylováný asparagin na aspartát. Byl-li protein *N*-glykosylován, projeví se deglykosylace jednak snížením molekulové hmotnosti a zároveň zaostřením pásu na gelové elektroforéze. Nevýhodou je, že řada proteinů po totální deglykosylaci zcela ztrácí své původní vlastnosti a snadno se sráží. PNGasa F navíc špatně odštěpuje glykany, které jsou fukosylovány na kotevním *N*-acetylglukosaminu. Alternativou k PNGase F je využití endoglykosidas (Endo H, Endo F1-3), které štěpí vazbu mezi *N*-acetylglukosaminu, z nichž jeden je vázán na asparagin. Výsledkem pak je protein, který na všech původně glykosylova-

ných místech nese jeden *N*-acetylglukosamin. Výhodou je, že takto deglykosylované proteiny si mnohdy zachovávají své původní vlastnosti. Při použití endoglykosidas je navíc možné přibližně určit typ *N*-vázaných oligosacharidů na daném proteinu. Zatímco Endo F1 odštěpuje sacharidovou strukturu u vysoce mannosových a hybridních glykanů, F2 funguje především u dvojitých a trojitých komplexních a pouze slabě u vysoce mannosových struktur, F3 je vhodná pro dvojitou a tříčlennou strukturu, které jsou navíc fukosylovány. Endo H neodštěpuje pouze složené oligosacharidy³⁶.

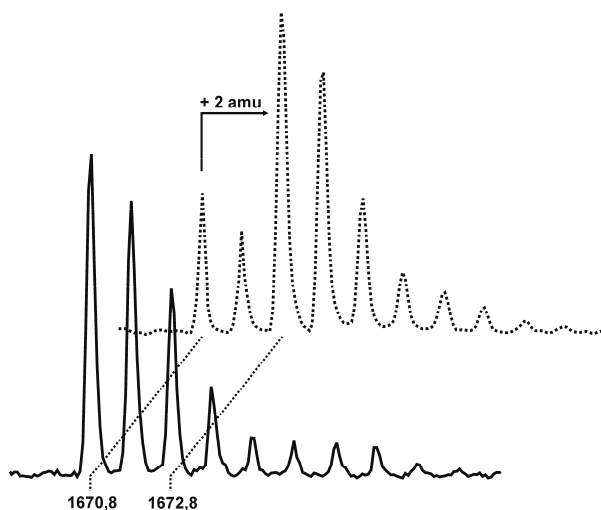
U *O*-glykosylaci bohužel neexistuje žádný univerzální přístup. *O*-Glykosidasy jsou vhodné pouze pro odštěpení malého počtu nepřilíš složitých sacharidových sekvencí, a pro složitější struktury je nutná kombinace se specifickými exoglykosidasami.

Pokud enzymová štěpení neposkytují požadovaný výsledek, lze využít i řadu chemických metod. Pravděpodobně neznámější je hydrazinolýza. K odsolenému a čistému glykoproteinu se přidá bezvodý hydrazin a reakční směs se nechá inkubovat 4 h při 95 °C (odštěpí se *N*- i *O*-vázané sacharidy) nebo 5 hodin při 60 °C (mělo by dojít k selektivnímu odštěpení pouze *O*-vázaných sacharidů). Vzhledem k nebezpečnosti bezvodého hydrazinu je nutné pracovat s náležitou opatrností. Po skončení reakce je hydrazin odpařen na vakuové odparce a uvolněné sacharidové struktury se *N*-acetylují acetanhydridem v hydrogenuhlíčitanu sodném³⁷. Hlavní nevýhodou hydrazinolýzy je destrukce proteinové části a navíc u *O*-glykoproteinů není často deglykosylace úplná. Alternativou pro deglykosylaci je působení trifluormethansulfonové kyseliny, které ponechává aminokyselinový skelet glykoproteinu, avšak zcela ničí všechny sacharidové komponenty. U *N*-glykosidicky vázaných struktur zůstává připojen pouze první *N*-acetylglukosamin³⁸. Další možností je selektivní *O*-deglyko-

sylace v alkalickém prostředí hydroxidu amonného, uhličitanu amonného nebo hydroxidu sodného v koncentraci do 0,1 M. Reakce (jedná se o β -eliminaci) probíhá za teplot kolem 50 °C po dobu 10–18 h. Jelikož samotná eliminace by vedla k degradaci uvolněných glykanů (tzv. peeling), přidává se do reakce borohydrid sodný, který z uvolněných glykanů tvoří alditoly³⁹. Pokud má být β -eliminace použita také pro uvolnění *N*-vázaných glykanů, používá se 1 M hydroxid a teploty kolem 100 °C. Je však třeba dodat, že chemické deglykosylace vždy vyžadují velká množství vzorku a optimalizaci reakčních podmínek pro daný glyko-protein.

7. Nalezení glykosylačních míst a určení typu glykanu

Pro nalezení glykosylačních míst existuje řada různých strategií. Základem je identifikace všech teoreticky možných *N*-glykosylačních míst v dané proteinové sekvenci⁴⁰ a dále pokus o nalezení potenciálních *O*-glykosylačních míst^{41–43}. Klasická strategie spočívá v deglykosylaci PNGasou F a využití přeměny asparaginu nesoucího *N*-vázaný glykan na aspartát. Deglykosylovaný protein je následně štěpen proteasou Asp-N, která působí na *N*-konci kyseliny asparagové. Jelikož enzymová deglykosylace vnesla do sekvence nová zásahová místa pro tuto proteasu, objevíme ve spektrech deglykosylovaného proteinu nové peptidy. Pro jejich snazší identifikaci lze využít deglykosylaci ve směsi normální vody a vody obohacené o kyslík



Obr. 5. Detail isotopové obálky isotopicky neznačeného (plná čára) a značeného (tečkovaná čára) peptidu při enzymové deglykosylaci; jde o deglykosylaci PNGasou F ve směsi H_2^{16}O a H_2^{18}O (30:70). Charakteristický isotopový profil (posun m/z o 2 hmotnostní jednotky) dovoluje jednoznačně identifikovat peptidy, které původně nesly *N*-vázaný oligosacharid

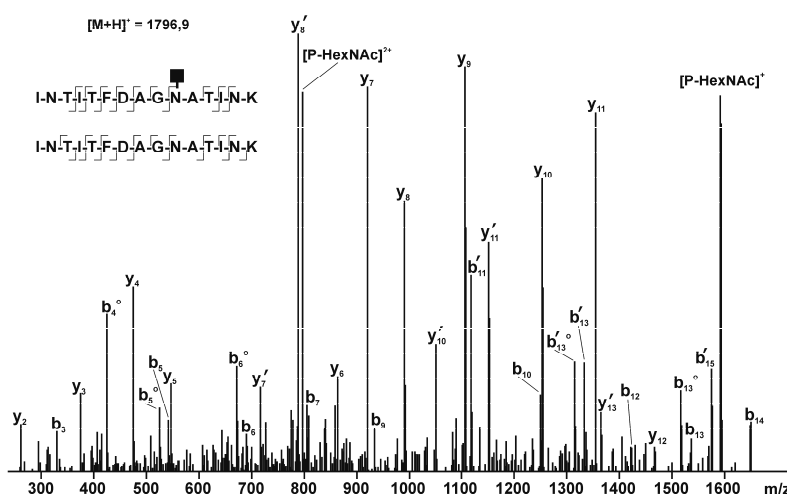
^{18}O (směs by měla obsahovat minimálně 50 % H_2^{18}O). Jelikož se při deglykosylaci na asparagin přenáší hydroxyskupina z reakčního prostředí, inkorporuje se ^{16}OH i ^{18}OH . To se následně v hmotnostních spektrech projeví na isotopové obálce daného peptidu (obr. 5, cit.^{26,44}).

Nalezení všech *N*-glykosylačních míst však většinou není otázkou jednoho pokusu, a tak je třeba kombinovat značení ^{18}O spolu se štěpením několika různými proteasami (trypsin, chymotrypsin, Asp-N, Glu-C, atd.) a měřením jak peptidových map, tak kolizních spekter peptidů. Při použití endoglykosidas H nebo F nám zůstává kotevní *N*-acetylglukosamin připojený na daný peptid. Z kolizních spekter pak můžeme přesně identifikovat, na kterém asparaginu je glykan připojen (obr. 6).

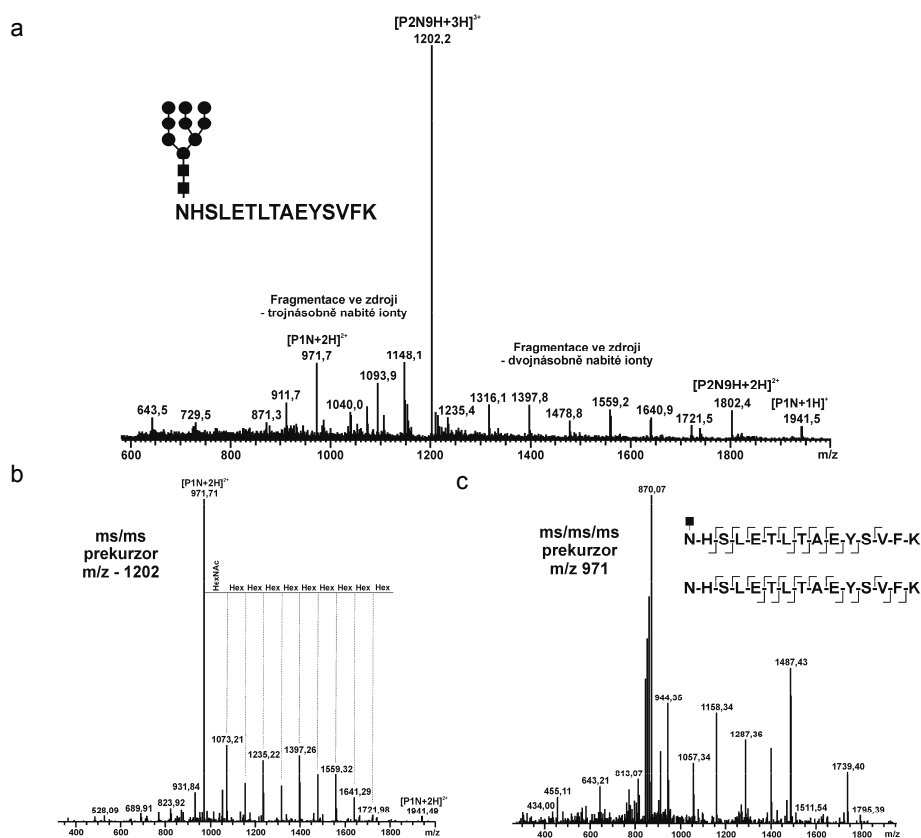
S rozvojem nových hmotnostně spektrometrických technik si můžeme dovolit hledat glykosylační místa i na celém glykosylovaném proteinu. Protein je nejprve štěpen vybranou proteasou a z naměřených celých hmotností glykopeptidů nebo jejich kolizních spekter můžeme nejen identifikovat, zda je dané místo glykosylováno, ale rovnou určujeme, jaký typ oligosacharidu je na jednotlivých místech připojen. Navíc ještě získáváme informaci o mikroheterogenitě daného glykosylačního místa (výskyt různých forem určitého typu oligosacharidu). Pro identifikaci na základě celých hmot je vhodná technika MALDI-TOF, avšak nejlepší výsledky lze dosáhnout při spojení mikrokapilární HPLC s iontovou cyklotronovou rezonancí, kde dosahuje přesnosti měření pod 1 ppm a identifikace jsou tak zcela jednoznačné. Pro interpretaci spekter směsí peptidů a glykopeptidů je vhodné využít specializované software, které glykopeptidy snadno a rychle identifikují^{45,46}. Při využití ionizace MALDI se jako nejvhodnější matrice doporučují DHB a HCCA pro glykopeptidy bez náboje a THAP pro glykopeptidy obsahující negativně nabitou skupinu (kyselina sialová, sulfát).

Pro měření kolizních spekter je nejčastěji využíváno spojení mikrokapilární HPLC s iontovou pastí nebo s hmotnostním spektrometrem q-TOF. Výhodou q-TOF je možnost selektivní detekce glykopeptidů. Na instrumentu (operujícím v LC-MS/MS módu) je nastavena jenná fragmentace ve zdroji (dochází k disociaci monosacharidových jednotek) a pokud jsou detegovány diagnostické ionty (např. o m/z 204, 292, 366), jsou provedeny MS/MS experimenty s glykopeptidy, které se právě eluují z kolony a jsou původci zmiňovaných ztrát monosacharidů⁴⁷. Na iontové pastí lze tento experiment provést dvěma způsoby. První vychází z faktu, že drobná štěpení se ve zdroji objeví i za normálních podmínek a navíc, že iontová past je velmi rychle skenující instrument. Bez problémů pak naměříme MS/MS spektra ze všech fragmentů vzniklých ve zdroji. Z glykopeptidů obsahujících vysoký počet sacharidových jednotek získáme informaci o typu připojené struktury a ze štěpení peptidu nesoucího pouze prvou sacharidovou jednotku určíme pozici, ve které je sacharid připojen (obr. 7).

Druhý způsob využívá následné fragmentace, kdy v prvním MS/MS je štěpen celý glykopeptid a v následných kolizních experimentech (MS^3 – MS/MS/



Obr. 6. Kolizní spektrum peptidu nesoucího *N*-vázaný *N*-acetylhexosamin; ve spektru jsou označeny *b*- a *y*-ionty vzniklé fragmentací peptidových vazeb. Ve spektru vidíme jak ionty nesoucí sacharid, tak ionty, které jej ztratily (označeny čárkou). Kroužek označuje ionty vzniklé z příslušného štěpného iontu ztrátou vody. Na sekvencích peptidu v levé horní části obrázku jsou vyznačena místa štěpení. P – peptid. Spektrum bylo naměřeno na kvadrupólové iontové pasti



Obr. 7. Analýza glykopeptidů tandemovou hmotnostní spektrometrií; a) ESI-MS spektrum glykopeptidu nesoucího strukturu s vysokým obsahem mannosy - schematicky znázorněno v levé části panelu; symboly vysvětleny v obr. 1. Hlavní pík náleží trojnásobně nabitému iontu. Dále jsou ve spektru vidět fragmenty vzniklé ve zdroji. b) MS/MS spektrum z glykopeptidu znázorněného v levé části panelu a). V kolizním spektru vidíme fragmentaci glykosidických vazeb, zcela chybí štěpení vazeb peptidových. Z daného spektra lze vyčíst informaci o typu oligosacharidové struktury. c) Štěpení třetího stupně z hlavního iontu MS/MS spektra uvedeného v panelu b). Jde v podstatě o MS^3 experiment. Z tohoto spektra lze již určit aminokyselinovou sekvenci peptidu a také lokalizovat místo *N*-glykosylace. Prekurzorem je peptid nesoucí pouze kotevní *N*-acetylhexosamin. Na sekvencích v pravé části panelu c) jsou vyznačena místa štěpení

MS) jsou fragmentovány vybrané štěpné ionty naměřené v MS/MS experimentu. Nejlépe se tento typ experimentu provádí na lineární iontové pasti, která se vyznačuje vysokou citlivostí v MSⁿ módu a má ještě rychlejší sken než kvadrupólová iontová past. Poměrně nová instrumentace kombinující kvadrupólovou iontovou past s ionizací TOF a MALDI se pak vyznačuje specifickou vlastností, že již v MS/MS spektru glykopeptidu nalezneme štěpné ionty odpovídající fragmentaci jak sacharidové složky, tak i peptidových vazeb⁴¹. Všechny výše uvedené techniky jsou snadno aplikovatelné na glykopeptidy s *N*-vázanými glykany. Pokud však máme nalézt *O*-glykosylační místa, dostáváme se do oblasti, která již tak triviální není. Jeden způsob spočívá v rozštěpení proteinu bromkyanem (štěpí za methioninem) a následném Edmanově odbourávání získaných štěpů. V místě, kde je glykosylovaný serin nebo threonin, chybí signál pro fenylthiohydantoinový (PTH) derivát dané aminokyseliny, a glykosylovaná PTH-aminokyselina protéká na začátku gradientové eluce, téměř v mrtvém objemu⁴⁹. Využití iontové pasti nebo q-TOF pro identifikaci míst *O*-glykosylace je možné, i když identifikace *O*-glykosylačních míst v peptidech, kde se nalézá více než jedno místo, je značně obtížná. Místo toho je možno využít elegantní řešení, které nabízí kombinace disociačních technik dostupných na spektrometrech s iontovou cyklotronovou rezonancí. Jde o disociace infračerveným laserem (IRMPD), která poskytuje podstatě stejné výsledky jako klasická kolizně indukovaná disociace, je však možno ji nastavit tak, že probíhá pouze selektivní fragmentace glykosidových vazeb, zatímco peptidové vazby zůstávají nedotčeny. IRMPD tak lze využít k určení typu glykanu, který je k danému glykopeptidu připojen. Druhá technika, disociace záchytem elektronu (ECD), pak zcela selektivně fragmentuje pouze peptidové vazby a ponechává glykosyl nedotčen. Z ECD spekter lze poté jednoznačně identifikovat pozice, které byly glykosylovány^{50–52}. Na FT-ICR přístrojích vybavených navíc předřazeným kvadrupólem lze provést alternativu této metodiky, a to kombinací kolizně indukovaného štěpení s různými energiemi a ECD.

Výše uvedené postupy v sobě kombinují nalezení glykosylačních míst a přibližné určení typu oligosacharidové struktury. Pro přesný a detailní popis glykanu je však nutno použít jiných technik. V první řadě je nutno glykan odštěpit a zbavit proteinové komponenty. S čistým oligosacharidem je možno provádět celou řadu analýz:

- fluorescenční značení následované chromatografií (HPLC), kapilární elektroforézou (CE) nebo gelovou elektroforézou (PAGE),
- vysokoúčinnou iontově výměnnou chromatografií na aniontovém měničích spojenou s pulsní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD),
- postupné odštěpování s použitím exoglykosidas a měření MS,
- permethylaci následovanou MS a MS/MS analýzou,
- MS a MS/MS analýzy nederivatizovaných oligosacharidů,

– nukleární magnetickou rezonancí.

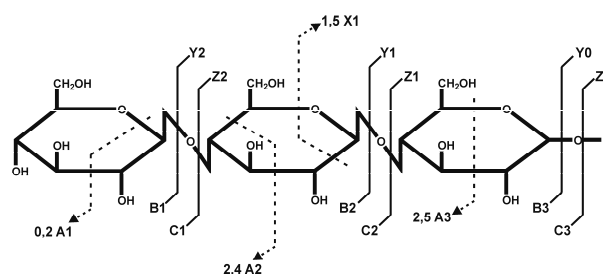
Musíme však poznamenat, že vzhledem ke striktně daným pravidlům pro biosyntézu *N*-vázaných sacharidů, není mnohdy nezbytně nutné znát přesnou strukturu glykanu. Platí totiž jednoduché pravidlo, že čím více se o určité glykosylaci chceme dozvědět, tím více musíme připravit daného glykoproteinu.

Princip fluorescenčního značení a následné separace (HPLC, CE, PAGE) spočívá v modifikaci oligosacharidů, jejich rozdělení a porovnání se známými standardy. Jako fluorescenční značky mohou sloužit např. kyselina 2-amino-benzoová (2-AA) nebo kyselina 8-aminonafalen-1,3,6-trisulfonová (ANTS).

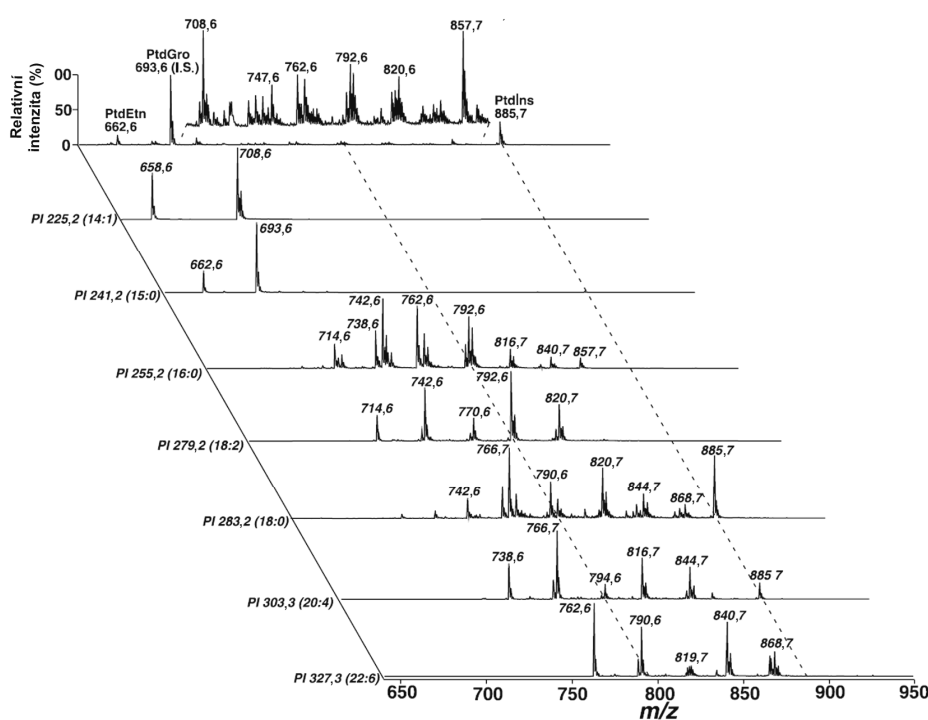
Technika kapalinové chromatografie na anexech s pulsní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD) velmi účinně separuje sacharidy v alkalickém prostředí a dokáže rozdělit glykany nejen podle různého obsahu jednotlivých sacharidů, ale také odlišného větvení. Pro identifikaci se zde opět využívá porovnání se standardy. Výhodou jak fluorescenčního značení s HPLC, tak i HPAEC-PAD je možnost poměrně přesné kvantifikace separovaných glykanů.

Při postupném odštěpování s použitím exoglykosidas je vhodné začít s izolovaným a přečištěným oligosacharidem. Volbou exoglykosidas s různou specifitou a měřením MS zjišťujeme, jak jsou jednotlivé monosacharidové jednotky spojeny a postupně oligosacharid odbouráváme^{53,54}. Při využití kombinace derivatizace následované analýzou MS zjistíme nejen jaká je molekulová hmotnost oligosacharidu, ale získáme také detailní informaci o větvení. Derivatizace (permethylace) se provádí methyljodidem v dimethylsulfoxidu za přítomnosti NaOH. Hlavním důvodem pro derivatizaci je zajištění stability při ionizaci tvrdými ionizačními technikami a druhým důvodem je umožnit vyčíst z MS/MS spekter informaci o větvení. Při štěpení oligosacharidy nejčastěji praskají v místě glykosidové vazby (fragmenty B a Y) (obr. 8, cit.⁵⁵). Toto štěpení však není dostatečně informativní a nejzajímavější z hlediska strukturního jsou tzv. fragmentace přes kruh (obr. 8). Ty vznikají buď při vysokoenergetických štěpeních nebo při ionizaci rychlými atomy (FAB)⁵⁶.

V mnoha případech je při měření oligosacharidů vhodné provádět analýzu v negativním módu. Glykany



Obr. 8. Schématické znázornění štěpení oligosacharidů; názvy iontů podle Domon a Costello. Nejčastější je tvorba iontů B a Y. Nejvíce informativní jsou fragmentace přes kruh – vznikají ionty A a X



Obr. 9. Příklad úplné lipidomické analýzy pro cholinové fosfolipidy⁷¹; v horní části obrázku je sumární spektrum, v drahách fosfolipidy s různými mastnými kyselinami

nesoucí záporně nabitou skupinu se zde mnohem lépe ionizují a i u neutrálních oligosacharidů mnohdy dostaneme informativnější rozpadová spektra než v módu pozitivním^{57–60}. V pozitivním módu se oligosacharidy převážně nabíjejí nikoliv protonací, ale ionty alkalických kovů. Nejintenzivnější signál dostáváme pro molekulu modifikovanou sodíkem a druhý nejintenzivnější signál pro molekulu modifikovanou draslíkem. U glykanů s negativní skupinou můžeme naměřit i sodnou sůl daného sacharidu, která je navíc nabitá sodíkem. Z těchto důvodů je mnohdy obtížné určit, jaká je skutečná molekulová hmotnost analyzovaného sacharidu, a proto se používá kationizace lithiovými ionty. Lithné ionty (ve formě hydroxidu lithného) se přidávají v koncentraci od 0,5 do 5 mmol l⁻¹. Vyšší koncentrace již působí nežádoucí potlačení signálu. Optimální koncentrace kolem 1 mmol l⁻¹ nezaručí, že glykany naměříme pouze jako lithiované, avšak silně oslabí signál molekul modifikovaných sodíkem a téměř zcela potlačí signál molekul modifikovaných draslíkem. Hojně se využívají i další způsoby kationizace, a to zejména při kolizních experimentech, kdy je cílem dosáhnout selektivní tvorby určitých diagnostických štěpných iontů (přidávky iontů Cs⁺, Ag⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺)^{61,62}. Zatímco kationizace se používá pro analýzy v pozitivním módu, přidávky aniontů (např. Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻) jsou využívány pro měření v módu negativním a pro podpoření tvorby diagnostických fragmentů v MS/MS spektrech⁶³.

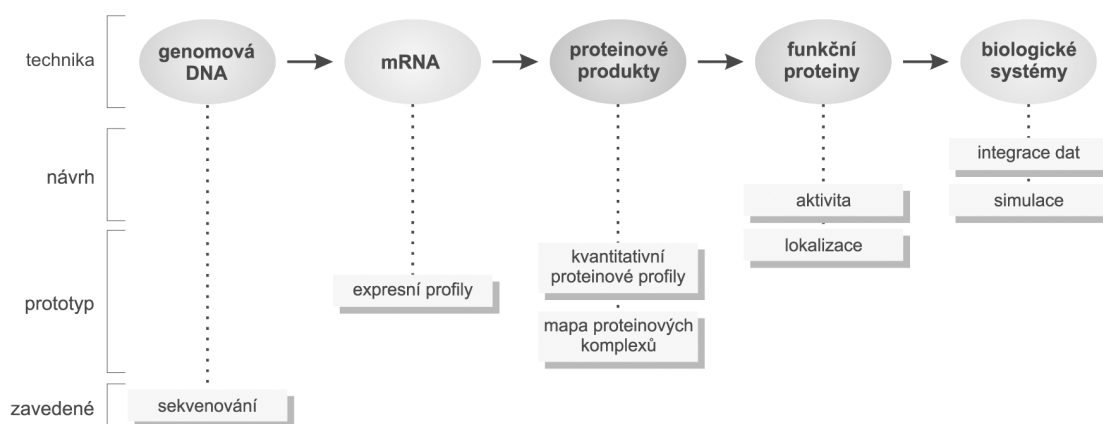
Nejpřímochařejším typem analýzy, který můžeme na oligosacharidových strukturách provádět, je NMR. Ta naprosto bezchybně určí nejen monosacharidové složení,

ale poskytne i detailní informaci o vazbách mezi jednotlivými sacharidy⁶⁴. Nevýhodou však jsou vysoké nároky NMR na čistotu a množství vzorku, kterým je v řadě případů obtížné vyhovět.

Pro analýzu složitých směsí oligosacharidů je možno také využít spojení HPLC-MS. Pro chromatografii se nejčastěji využívají kolony naplněné normální fází (aminové nebo diolové kolony). Je třeba uvážit, že oligosacharidy s redukující skupinou se mohou na amino kolonu částečně chemicky vázat, proto je upřednostňována kolona diolová. Velmi populární jsou také nosiče na bázi porezního aktivního uhlí^{65,66}.

8. Lipidomika

Veškeré metodické přístupy eukaryotické proteomiky jsou založené na analýzách přírodních látek hydrofilní povahy, ať již jde o vlastní proteiny, nebo jejich modifikace nabitými a polárními skupinami, jako jsou fosfáty nebo sacharidy. V komplexních biologických systémech ovšem hrají nezastupitelnou úlohu i nepolární látky typu lipidů. V proteomice se s nimi setkáváme zejména jako se substituenty modifikujícími polypeptidové řetězce a tím i biologickou aktivitu proteinů. Hmotnostní spektrometrie se ukázala jako velmi vhodná metoda pro analýzy těchto modifikací⁶⁷. S lipidy mohou ovšem proteiny být spojeny též nekovalentně – mohou zprostředkovat jejich zakotvení v biologických membránách, a mohou sloužit i jako substráty, jak je tomu u různých enzymů a kofaktorů lipidové-



Obr. 10. Výzkumné směry na cestě k biologii systémů

ho metabolismu. V prvním případě se mohou lipidy stát důležitými separačními nástroji při izolaci určitých proteinových frakcí plnicích v buňce důležité funkce, jako např. u proteinů membránových mikrodomén nezbytných při buněčné signalizaci⁶⁸. Spojení isotopově značených lipidových prekurzorů s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem se stalo v poslední době oblíbeným nástrojem analýzy buněčných lipidomů⁶⁹ a sledování metabolismu lipidů včetně detailních studií příslušných enzymů⁷⁰. Lipidomika je nyní používána ve stejném smyslu jako proteomika, tj. jako moderní a účinná metoda pro dokumentování celkových lipidových profilů zdravých a nemocných buněk⁷¹. Příklad takové analýzy pro cholinové fosfolipidy je uveden na obr. 9.

9. Závěr

Eukaryotická genomika, proteomika i glykomika se dnes stává součástí nového, integrujícího směru v biologických vědách označovaného jako biologie systémů. Schéma postupné integrace jednotlivých popisných disciplín do systémové biologie je znázorněno na obr. 10. Tento nový obor je založen na myšlence, že počet jednotlivých komponent biologického systému je vysoký, ale konečný. Shromáždění a integrace dostatečného počtu údajů o expresi jednotlivých proteinů, jejich posttranslačních modifikacích a vzájemných interakcích by tak jednoho dne měly vyústit v integrovaný pohled na biologické systémy a matematickou (počítačovou) simulaci jejich vývoje¹.

Seznam zkratk

CE	kapilární elektroforéza (angl. Capillary Electrophoresis)
Endo	endoglykosidasa
ESI	ionizace elektrosprejem (angl. Electrospray Ionization)
FT-ICR	iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Hex	hexosa
HexNAc	<i>N</i> -acetylhexosamin
HPAEC	kapalinová chromatografie na anexech (angl. High Performance Anion Exchange Chromatography)
MALDI	ionizace laserovým paprskem (angl. Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization)
PAD	pulsní amperometrická detekce
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PNGasa	protein <i>N</i> -glykanasa
TOF	time-of-flight, detekce hmotnosti založená na době letu

Projekty, při nichž byly získány výše uvedené výsledky, jsou podporovány výzkumným centrem IM4635608802 „Centrum cílených terapeutik“ MŠMT ČR.

LITERATURA

- Patterson S. D., Aebersold R. H.: *Nat. Genet. Suppl.* 33, 311 (2003).
- O'Farrell P. H.: *J. Biol. Chem.* 250, 4007 (1975).
- <http://www.hupo.org>, 15.3.2005.
- <http://www.EFPS.org>, 15.3.2005.
- Dell A., Morris H. R.: *Science* 291, 2355 (2001).
- Lai R.: *Cancer* 95, 1071 (2002).
- Ritchie R. F., Palomaki G. E., Neveux L. M., Navolotskaia O.: *J. Clin. Lab. Anal.* 13, 280 (1999).
- Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T. A.: *Nature* 403, 623 (2000).
- Link A.J.: *Nat. Biotechnol.* 17, 676 (1999).
- Rabilloud T.: *Proteomics* 2, 3 (2002).
- Gorg A.: *Electrophoresis* 21, 1037 (2000).
- Karas M., Hillenkamp F.: *Anal. Chem.* 60, 2299 (1988).
- Patterson S. D., Aebersold R.: *Electrophoresis* 16, 1791 (1995).
- Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M.: *Science* 246, 64 (1989).

15. Hunt D. F.: *Science* 256, 1817 (1992).
16. Tureček F.: *J. Mass Spectrom.* 37, 1 (2002).
17. McConnell S. J., Hoess R. H.: *J. Mol. Biol.* 250, 460 (1995).
18. Holt L. J., Enever C., de Wildt R. M., Tomlinson I. M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 445 (2000).
19. Mitchell P. A.: *Nat. Biotechnol.* 20, 225 (2002).
20. Andersen J. S., Lyon C. E., Fox A. H., Mann M.: *Curr. Biol.* 12, 1 (2002).
21. Skop A. R., Liu H., Yates J., Meyer B. J., Heald R.: *Science* 305, 61 (2004).
22. Drickamer K., Taylor M. E.: *Genome Biol.* 3, 1034.1 (2002).
23. Moniaux N., Andrianifahanana M., Brand R. E., Batra S. K.: *Br. J. Cancer* 91, 1633 (2004).
24. Gong C. X., Liu F., Zamfir A., Peter-Katalinic J.: *Electrophoresis* 25, 2649 (2004).
25. Mutoni F., Brockington M., Torelli S., Brown S. C.: *Curr. Opin. Neurol.* 17, 205 (2004).
26. Bařinka C., Šácha P., Sklenář J., Man P., Bezouška K., Slusher B. S., Konvalinka J.: *Protein Sci.* 13, 1627 (2004).
27. Pavlíček J., Sopko B., Ettrich R., Kopecky V. Jr, Baumruk V., Man P., Havlíček V., Vrbacký M., Martínková L., Křen V., Pospíšil M., Bezouška K.: *Biochemistry* 42, 9295 (2003).
28. Voet D., Voet J. G.: *Biochemistry*. Wiley, New York (1990).
29. Kornfeld R., Kornfeld S.: *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631 (1985).
30. Moremen K. W.: *Biochem. Biophys. Acta* 1573, 225 (2002).
31. Hounsell E. F., Davies M. J., Renouf D. V.: *Glycoconjugate J.* 13, 19 (1996).
32. Cummings R. D.: *Methods Enzymol.* 230, 66 (1994).
33. Bezouška K., Sklenář J., Novák P., Halada P., Havlíček V., Kraus M., Tichá M., Jonáková V.: *Protein Sci.* 8, 1551 (1999).
34. Denzinger T., Diekmann H., Bruns K., Laessing U., Stuermer C., Przybylski M.: *J. Mass Spectrom.* 34, 435 (1999).
35. Harvey D. J.: *Mass Spectrom. Rev.* 18, 349 (1999).
36. Gates R., Rathbone E., Masterson L., Wright I., Electricwala A.: *Glycoprotein Analysis Manual*. Sigma-Aldrich (2004).
37. Takasaki S., Misuochi T., Kobata A.: *Methods Enzymol.* 83, 263 (1982).
38. Edge A. S.: *Biochem. J.* 376, 239 (2003).
39. Takasaki S., Yamashita K., Kobata A.: *J. Biol. Chem.* 253, 6068 (1978).
40. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>, 15.3.2005.
41. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>, 15.3.2005.
42. <http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc>, 15.3.2005.
43. <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>, 15.3.2005.
44. Gonzales J., Takao T., Hori H., Besada V., Rodriguez R., Padron G., Shimonishi Y.: *Anal. Biochem.* 205, 151 (1992).
45. <http://us.expasy.org/tools/glycomod>, 15.3.2005.
46. <http://www.dkfz.de/spec/glypeps>, 15.3.2005.
47. Sullivan B., Addona T. A., Carr S. A.: *Anal. Chem.* 76, 3112 (2004).
48. Demelbauer U. M., Zehl M., Plematl A., Allmaier G., Rizzi A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1575 (2004).
49. Gooley A. A., Pisano A., Packer N. H., Ball M., Jones A., Alewood P. F., Redmond J. W., Williams K. L.: *Glycoconjugate J.* 11, 180 (1994).
50. Migorodskaya E., Roepstorff P., Zubarev R. A.: *Anal. Chem.* 71, 4431 (1999).
51. Hakansson K., Cooper H. J., Emmett M. R., Costello C. E., Marshall A. G., Nilsson C. L.: *Anal. Chem.* 73, 4530 (2001).
52. Kjeldsen F., Haselmann K. F., Budnik B. A., Sorensen E. S., Zubarev R. A.: *Anal. Chem.* 75, 2355 (2003).
53. Sutton C. W., Cottrell J. S., v knize: *Newer Methods In Glycoprotein and Glycolipids Characterization* (Cumming, D., Reinhold, V.N., ed.). Academic Press, London 1994.
54. Sutton C. W., O'Neil J. A., Cottrell J. S.: *Anal. Biochem.* 218, 34 (1994).
55. Domon B., Costello C. E.: *Glycoconjugate J.* 5, 397 (1988).
56. Dell A., Reason A. J., Khoo K. H., Panico M., McDowell R. A., Morris H. R.: *Methods Enzymol.* 230, 108 (1994).
57. Talbo G., Mann M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 100 (1996).
58. Bacher G., Korner R., Atrih A., Foster S. J., Roepstorff P., Allmaier G.: *J. Mass Spectrom.* 36, 124 (2001).
59. Čmelík R., Štikařovská M., Chmelík J.: *J. Mass Spectrom.* 39, 1467 (2004).
60. Robbe C., Capon C., Coddeville B., Michalski J. C.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 412 (2004).
61. Harvey D. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 484 (2005).
62. Harvey D. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 926 (2001).
63. Jiang Y., Cole R. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 60 (2005).
64. Hricovini M.: *Curr. Med. Chem.* 11, 2526 (2004).
65. Karlsson N. G., Packer N. H.: *Anal. Biochem.* 305, 173 (2002).
66. Karlsson N. G., Wilson N. L., Wirth H. J., Dawes P., Joshi H., Packer N. H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2282 (2004).
67. Havlíček V., Higgins L., Chan W., Halada P., Šebo P., Sakamoto H., Hackett M.: *J. Mass Spectrom.* 36, 384 (2001).
68. Man P., Novák P., Cebeauer M., Horváth O., Fišerová A., Havlíček V., Bezouška K.: *Proteomics* 5, 113 (2005).
69. Hunt A. N., Clark G. T., Attard G. S., Postle A. D.: *J. Biol. Chem.* 276, 8492 (2001).
70. Hunt A. N., Alb J. G., Koster G., Postle A. D., Ban-

kaitis V. A.: *Biochem. Soc. Trans.* 32, 1063 (2004).

71. Han X., Yang J., Cheng H., Ye H., Gross R. W.: *Anal. Biochem.* 330, 317 (2004).

P. Man^a and K. Bezouška^{a,b} (^a *Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic*, ^b *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Praha, Czech Republic*): **Recent Trends in Eukaryotic Proteomics, Glycomics, and Lipidomics**

An enormous complexity of eukaryotic proteomes, in which tens of thousands of different genes give rise to

millions of protein products, brings about new demands and challenges on the sensitivity, dynamic range, and robustness of analytical approaches employed for their analysis. The technologies behind the modern proteomics of eukaryotes rely on a combination of microscale separation techniques and powerful detection methods, first of all by mass spectrometry. Analysis of other classes of natural compounds such as carbohydrates or lipids requires the development of innovative strategies several of which are described in this review. The analytical methods resulted in the acquisition of a wealth of information that needs to be sorted, presented, and cataloged using modern tools of current bioinformatics.

FRAKCIONAČNÁ ANALÝZA SEDIMENTOV – LIMITÁCIE SELEKTIVITY SEKVENČNÉHO LÚHOVANIA

VIERA VOJTEKOVÁ^a a ERIKA KRAKOVSKÁ^b

^a Katedra analytickej chémie, Ústav chemických vied, Univerzita P. J. Šafárika, Moyzesova 11, 041 67 Košice,

^b Katedra chémie, Hutnícka fakulta, Technická univerzita Košice, Letná 9, 042 00 Košice, Slovenská republika

Došlo 20.12.05, prepracované 20.3.06, prijaté 14.4.06.

Kľúčové slová: frakcionácia, ťažké kovy, jedнокroková a sekvenčná extrakcia, komplexačné činidlá, sedimenty, životné prostredie

Obsah

1. Úvod
2. Frakcionácia vo vodno-sedimentárnych systémoch
3. Extrakčné postupy ako metodologický frakcionačný prístup
4. Záver

1. Úvod

Pre hodnotenie mobility prvkov vo vodno-sedimentárnych systémoch sa obvykle používa frakcionačná analýza a v rámci nej sekvenčné extrakčné postupy. Pre pôdy a sedimenty bolo vyvinutých mnoho týchto postupov, ktoré napriek kritickej diskusii ostávajú najpraktickejšou formou hodnotenia mobility prvkových kontaminantov v sedimentárnych a pôdnych prostrediach. Sekvenčné extrakčné postupy sú prijímané IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) a odporúčané ako štandardné k produkovaným certifikovaným referenčným materiálom (CRM). Článok diskutuje najviac používané extrakčné činidlá a schémy, približuje vývoj extrakcie ako metódy, objasňuje mechanizmus účinku jednotlivých extraktantov, zdôvodňuje smerovanie vývoja k „IRMM extrakčnému protokolu“ pre CRM 601, ktorý je jednou z výslednic vývoja v oblasti sekvenčného lúhovania. Porovnáva tiež informačný prínos sekvenčnej a jedнокrokovovej extrakcie do silného komplexačného činidla. Hodnotenie mobility kontaminantov sa postupne dostáva do európskych noriem, preto je vhodné uvažovať o jedнокrokových extrakciách do komplexačných činidiel, ako o ekonomicky (časovo) nenáročnej alternatíve a doplnku k „IRMM protokolom“, ktoré sú pokladané za referenčné. Môžu byť tiež formou rýchlej indikácie zmenenej mobility prvkov v monitorovanom prostredí.

2. Frakcionácia vo vodno-sedimentárnych systémoch

Sediment – živý, reaktívny, nestabilný a dynamický heterogénny systém – je z fyzikálneho hľadiska zmesou vodou neunášaných tuhých častíc v širokom diapazóne veľkostí. V závislosti od veľkosti častíc môžu byť na ne naviazané prvkové formy rôznymi spôsobmi. Ich distribúcia závisí od procesov, súvisiacich so zmenami hydrochemických podmienok. Simulácia týchto zmien v laboratórnych podmienkach je realizovaná aplikáciou sekvenčného lúhovania vo vybraných extrakčných činidlách (rešpektujúcich zmenu pH, red-ox potenciálu, koncentrácie sulfidov, atď.) končiacej celkovým rozkladom vzorky. Na základe takejto simulácie možno hodnotiť litogénny (antropogénny) pôvod prvkov v sedimentoch (pôdach). Stanovenie špecií (jednotlivých chemických foriem prvkov) v sedimente neplní účel. Sediment je chemicky nestabilný a niektoré prvkové formy v ňom existujú tak krátko, že sú prakticky nestanoviteľné¹. Účelnejšie je monitorovať ich prestup do ostatných zložiek životného prostredia. Tomu vyhovuje frakcionačný prístup^{2–4}. Frakcionačné štúdie realizované sekvenčným lúhovaním, prekonalí svoj vývoj^{4–10} a predbehli čas, v ktorom boli pojmovo definované. Vznikli a používali sa v pôdnych laboratóriách pre určenie nutričnej hodnoty pôdy¹¹. Vývoj prebiehal izolovane, výsledky laboratórií neboli porovnávané a porovnateľné. To priniesol až rýchly rast globálneho znečistenia ekotopu a s tým súvisiace dôsledky. Kategorizáciu existujúcich poznatkov, systematický výskum¹², štandardizáciu extrakčných postupov^{3,5}, štandardizáciu vzorky z hľadiska zrnitosti¹³, prvkovú distribúciu v jednotlivých zrnitostných frakciách¹⁴, porovnávacie a kinetické štúdie^{2,10,12,15–17}, potrebu vývinu CRM ku každému normovanému postupu a k rozdielnym typom matric^{10,18,19} priniesli posledné dve desaťročia. Legislatívne rámce s tým súvisiace sú regionálne uvádzané do platnosti už dlhší čas^{20,21}, ale reálne účinná pre ochranu životného prostredia bude v rámci Európskej únie jej konečná legislatívna podoba. Zabezpečí štandardnosť postupov vo všetkých krokoch, vo všetkých monitorovaných zložkách a v dlhom časovom období, čo následne prinesie informácie o trendoch sledovaných zmien^{22–24}. Zvýšené obsahy v živých organizmoch vyšších živočíchov a zmena toxického účinku v dôsledku metabolizmu sledovaného kovu²⁵ dáva spätnú informáciu o tom, že treba skontrolovať hladiny kontaminantov v zdrojoch²⁶ (napr. v sedimentoch ako akumuláčnom médiu) a venovať ich sanácii zvýšenú pozornosť. To všetko uzatvára cyklus systematickej, finančne a časovo náročnej práce, kde každá zmysluplná úspora znamená tiež ochranu životného prostredia.

3. Extrakčný postup ako metodologický frakcionačný prístup

Potvrdenie existencie rôznych väzbových foriem prvkov v sedimentoch (pôdach) viedlo k vývoju sekvenčných extrakčných postupov, ktorých cieľom je určenie prvkovej distribúcie medzi jednotlivými fázami sedimentovej (pôdnej) vzorky. Pri frakcionácii, realizovanej sekvenčnou extrakciou, dochádza k postupnému vymývaniu

jednotlivých tuhých fáz zo sedimentu a spolu s nimi k vymývaniu kovov asociovaných v (na) týchto fázach. Extrakcia je teda vhodným spôsobom určenia sedimentových fáz, i keď jednokrokové extrakčné postupy nie sú špecifické. Výluh obvykle obsahuje skupinu prvkových špecií s podobnými fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami. Špecifickosť možno zvýšiť vhodným zaradením extrakčných činidiel do extrakčnej sekvencie, v ktorom zvyšok z jedného extrakčného kroku je extrahovaný nasledujúcim činidlom v sekvencii. To vedie k „prekrytiu oblastí ex-

Tabuľka I

Extrakčné činidlá (postupy) a jednotlivé izolované fázy pôd a sedimentov

Extrahovaná fáza	Extrakčné činidlo (metóda potrebná na izoláciu)
Vodorozpustná (pôdny výluh)	voda ³⁵ , odstreďovanie ³⁶
Voda z pórov sedimentu	vytesňovanie ³⁷ , dialýza ³⁸
Iónovýmeniteľná	1 mol l ⁻¹ MgCl ₂ ³⁹ 0,05 mol l ⁻¹ CH ₃ COONH ₄ ³⁹ 1 mol l ⁻¹ CaCl ₂ ^{39,40} 1 mol l ⁻¹ KNO ₃ ⁴¹
Viazaná na organickú hmotu a čiastočne na sulfidy	0,1 mol l ⁻¹ Na ₄ P ₂ O ₇ ⁴¹ 1 mol l ⁻¹ NaOCl ⁴² 1 mol l ⁻¹ EDTA ⁴³ H ₂ O ₂ + HNO ₃ + CH ₃ COONa ^{35,44}
Viazaná na uhličitaný	CH ₃ COOH ³⁵ CH ₃ COONa, pH 5 ^{35,36} EDTA ⁴⁵
Viazaná na amorfné a kryptokryštalické oxidy Mn a Fe, čiastočne na sulfidy	0,1 mol l ⁻¹ NH ₂ OH · HCl, pH 2 (cit. ⁴⁶)

Pozn.: ditioničitan – S₂O₄²⁻

Extrakčné činidlo	Spôsob asociácie kovu so sedimentom (fáza)						
	iónovýmena	adsorpcia na povrchu	vyrážanie (CO ₃ , S, OH)	kooptované s amorfnými oxidmi Fe a Mn	väzba na organickú hmotu	okludované v kryštalických oxidoch Fe a Mn	komponenty silikátového zvyšku
H ₂ O	→						
Neutrálne soli	→	→					
CH ₃ -COOH, (CH ₃ -COO) ⁻			→				
Kyselina šťaveľová			→				
NH ₂ OH · HCl						→	
Zmesi kyselín							
Zásady				→	→		
				NaOH NaF			
Komplexačné činidlá			EDTA,	DTPA	a pod.		

Obr. 1. Schematické znázornenie publikovanej účinnosti najčastejšie používaných extrakčných činidiel (bodkované úseky znázorňujú „oblasti extrakčnej neistoty“)

trakčnej účinnosti“ a k vývoju efektívneho – sekvenčného extrakčného postupu (obr. 1). Neselektívnosť extraktantov nedovolila charakterizovať každú izolovanú fázu sedimentu. Používala sa „konceptia funkčne a operačne definovanej reaktivity prvku“^{27,28}, ktorá prežila v priebehu vývoja tejto disciplíny^{4,29,30} až do ujednotenia používanej terminológie v roku 2000 (cit.³¹). Porovnávacie štúdie viedli k záveru, že kovové formy viazané na sediment môžu byť hodnotené z pohľadu konkurenčnej adsorpcie, a adsorpčné charakteristiky sedimentu a extraktant určujúca asociácia kovu so sedimentom dáva informáciu o väzbovej forme prvku i o izolovanej tuhej fáze³². Činidlá sú teda len fázovo špecifické (napr.: pufrovaná CH_3COOH – pre uhličitanu, neutrálny MgCl_2 – pre iónovymeniteľný podiel) a každé nasledujúce extrakčné spracovanie v sekvenčnom postupe je chemicky (fyzikálne) drastickéjšie. Priebeh extrakcie potom hierarchicky hodnotí pevnosť väzby kovových foriem k rôznym fázam sedimentu: k najlabilnejšiemu – iónovymeniteľnému, potom uhličitánovému, redukovateľnému, oxidovateľnému a nakoniec rezistentnému zvyškovému podielu. Tu diskutované činidlá sú alternatívne použiteľné v jednokrokových aj sekvenčných extrakčných postupoch^{33,34}. Príklady ich použitia sú uvedené v tab. I. Izolovanosť vývoja prispela k súbežnej publikácii mnohých aj analogických sekvenčných extrakčných postupov^{9,33–38,40–52}. Podobnosť pôdnej a sedimentovej matrice umožňuje po optimalizácii ich alternatívnu aplikáciu. Používané a modifikované sú McLarenov-Crawfordov⁴⁷, Millerov⁴¹, Englerov³⁴, Presleyho³⁵, Tessierov⁴⁴, Salomonsov-Förstnerov⁴⁸ (tab. II) a iné postupy^{33,40}. Po optimalizácii sú niektoré z nich prijímané IRMM (cit.⁹) a prezentované ako extrakčné protokoly spolu s vyvinutým CRM (tab. III).

Iónovymenné extraktanty

Iónovymeniteľný podiel prvku tvorí zlomok jeho celkového obsahu v sedimente. Adsorpčné charakteristiky stopových prvkov v sedimentoch sú ovplyvnené ich relatívnym nabožením v sedimentovej fáze a možno hovoriť o pomernom obsadení aktívnych miest sedimentového povrchu jednotlivými prvkovými špeciami^{29,32}. Priebeh procesov na fázovom rozhraní sedimentu viedol k záverom: a) Adsorpcia prebieha na tých miestach povrchu, na ktorých sa nachádzajú funkčné skupiny s podobnými acidobázickými (koordinačnými) vlastnosťami ako ich náprotivok vo vode. b) Reakcie medzi kovovými špeciami vo vode a väzbovými miestami na tuhom povrchu sú podobné, reakciám mnoholigandového systému v roztoku a tak sú v súlade s koncepciou a matematickým formalizmom koordinačnej chémie. c) Tento zidealizovaný stav narúša tvorba elektrickej dvojvrstvy na fázovom rozhraní voda-sediment a tá v závislosti od pH a iónovej sily ovplyvňuje adsorpciu katiónov v reálnych systémoch. d) Pre daný adsorbent a pH je podiel adsorbovaného prvku „prvkovo špecifický“, čo spôsobujú rozdielne energie väzbových miest na povrchu pre každý prvok. Distribúcia prvkov v sedimente je tak ovplyvnená (v stave rovnováhy):

1. hustotou výskytu vysoko-energetických väzbových miest na povrchu,
2. pevnosťou kovovej väzby k sedimentovej fáze,
3. nabožením každej zložky v sedimente,
4. chemickou charakteristikou vodnej fázy (pH, koncentrácia rozpustených ligandov, atď.),
5. koncentráciou prvkových makrozložiek (možnosť konkurenčnej adsorpcie na vhodných väzbových miestach povrchu).

Tabuľka II

Príklady najpoužívanejších sekvenčných extrakčných postupov

Tessierov postup ⁴⁴		Salomons – Förstnerov postup ⁴⁸	
extrahovaná fáza	extrakčné činidlo	extrahovaná fáza	extrakčné činidlo
iónovymeniteľná uhličitany	1 mol l ⁻¹ MgCl ₂	iónovymeniteľná uhličitany	1 mol l ⁻¹ CH ₃ COONH ₄
Fe a Mn oxidy	1 mol l ⁻¹ CH ₃ COONa + CH ₃ COOH; pH 5	amorfne Mn a Fe oxidy	1 mol l ⁻¹ CH ₃ COONa + CH ₃ COOH; pH 5
viazaná na sulfidy a organickú hmotu	0,04 mol l ⁻¹ NH ₂ OH · HCl + 25% CH ₃ COOH	kryptokryštalické Fe a Mn oxidy	0,1 mol l ⁻¹ NH ₂ OH · HCl + 0,01 mol l ⁻¹ HNO ₃
sedimentový zvyšok	30% H ₂ O ₂ + HNO ₃ pH 2; 3,2 mol l ⁻¹ CH ₃ COONH ₄ + 20% HNO ₃	viazaná na sulfidy a organickú hmotu	0,2 mol l ⁻¹ (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ ; pH 3
	koncentrovaná HF + HClO ₄	sedimentový zvyšok	30% H ₂ O ₂ + HNO ₃ pH 2; 3,2 mol l ⁻¹ CH ₃ COONH ₄ + 20% HNO ₃
			HF + HClO ₄ (5:1)

Tabuľka III

IRMM protokol pre extrakciu sedimentov k referenčnému sedimentu CRM 601⁹

Krok	Extraktčné činidlo	Extrahovaná fáza	Objem [l]	Teplota [°C]	Čas extrakcie [h]
1	0,11 mol l ⁻¹ CH ₃ COOH	adsorbovaná, iónovýmeniteľná, uhlíčitánová	0,04	22±5	16
2	0,5 mol l ⁻¹ NH ₂ OH·HCl pH 2; upravené HNO ₃	viazaná na oxidy Fe a Mn	0,04	22±5	16
3	8,8 mol l ⁻¹ H ₂ O ₂ ; 1 mol l ⁻¹ CH ₃ COONH ₄ , pH 2	viazana na sulfidy a organickú hmotu	0,01	22±5	digescia 1 h
			0,01	85±5	digescia 1 h
			0,05	85±5	digescia 1 h
4	lúčavka kráľovská (ISO 11466)	sedimentový zvyšok		22±5	extrakcia 16 h

Na izoláciu iónovýmeniteľného podielu sa štandardne používajú neutrálne soli, ktoré uvoľňujú kovové ióny viazané elektrostatickými silami na záporne nabitých miestach povrchu (MgCl₂, CaCl₂, NaNO₃, NH₄NO₃, atď. – tab. IV)^{49,55}. Afinita kationov 1. a 2. a-podskupiny periodickej sústavy prvkov je pre väčšinu reaktívneho povrchu sedimentu rádoovo menšia než afinita ťažkých kovov, čo je kompenzované zvýšením koncentrácie konkurenčného kationu (extraktčného činidla). Používajú sa roztoky solí s koncentráciou 1 mol l⁻¹, i keď zriedenejšie sa viac približujú reálnym podmienkam (tab. IV). Na iónovýmene sa čiastočne podieľa i voda. Pri experimentálnej realizácii vodných výluhov riečnych sedimentov boli pozorované vyššie hladiny Cu, As a Sb, oproti obsahu v nadložných vodách, čo bolo spôsobené vyšším obsahom solí vo vode nadložnej oproti vode destilovanej, použitej na extrakciu a vplyvom vlastného extraktčného pohybu vzorky, ktorý je oveľa intenzívnejší ako pohyb sedimentových častíc v reálnych podmienkach vodného toku⁵¹. Aby sa úplne zabránilo iónovýmene vody, je potrebné pridávať k nej etylalkohol⁵⁶. Prehľad extraktčných činidiel pre ostatné diskutované prvkové podiely možno nájsť v tu uvedenej citácii⁵⁵. Extraktčná účinnosť neutrálnych solí závisí od druhu kationu (rôzna afinita k reaktívnym centráram na povrchu) a klesá v poradí H⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ > Na⁺ = NH₄⁺. Štúdie udávajú zovšeobecnenú účinnosť iónovýmeny ka-

tiónov pre oxický sediment (pôdy) v poradí Cd > Zn > Cu = Pb, čo potvrdzuje platnosť všeobecnej afinity k väzbovým miestam na sedimentovom povrchu. Iónovýmeniteľné podiely extrahované z anoxických sedimentov sa rozpúšťali v poradí Fe > Mn > Zn > Ni > Cr > Pb > Cd > Cu, čo pravdepodobne spôsobili konkurenčne bežiacie red-ox reakcie⁵⁰. Dusičnany sú akceptované ako iónovýmenné extraktčné činidlá. Netvorí stabilné komplexy s prechodovými prvkami, preto ich iónovýmenné reakcie majú kation-konkurenčný charakter (výhoda). Porovnanie extraktčných činidiel pre prvky v pôdach dokazujú vyššiu účinnosť Ca(NO₃)₂ v porovnaní so zodpovedajúcimi roztokmi NaNO₃ (cit.⁶⁰), ale pre stanovenie iónovýmenných podielov Cd je roztok 0,1 mol l⁻¹ NaNO₃ najšpecifickejší. Toto zistenie sa premietlo do legislatívy a posunulo frakcionáciu z výskumnej do prakticko-legislatívnej roviny ako nástroj ochrany životného prostredia²⁰. Extrakty sedimentov do MgCl₂ majú spravidla nízke obsahy Al, Si a organického uhlíka (MgCl₂ nenaruša íly, sulfidy, organickú hmotu). Rozpustnosť uhlíčanov (2–3 %), a oxidov Fe a Mn je v neutrálnych roztokoch solí tiež veľmi nízka. Iónovýmenná účinnosť CaCl₂ je oproti MgCl₂ a NaCl vyššia o 10 až 20 % (cit.^{34,44}). V roztokoch NH₄Cl a CH₃COONH₄ sa rozpúšťa značné množstvo CaCO₃, MgCO₃, BaCO₃, MgSO₄, CaSO₄ a ak tieto zložky nepri- spievajú ku kation-výmennej kapacite vo vzorkách, neu-

Tabuľka IV

Iónovýmenné roztoky neutrálnych solí⁵⁵

Extraktčné činidlo	Koncentrácia; pH	Extraktčné činidlo	Koncentrácia; pH
CaCl ₂	0,01 mol l ⁻¹ ; pH 7 (cit. ⁵⁷)	Mg(NO ₃) ₂	1 mol l ⁻¹ ; pH 7 (cit. ⁶²)
MgCl ₂	1 mol l ⁻¹ ; pH 7 (cit. ⁴⁴)	NH ₄ NO ₃	1 mol l ⁻¹ ; pH 7 (cit. ⁶³)
NH ₄ Cl	1 mol l ⁻¹ ; pH 7 (cit. ⁵⁸)	Ca(NO ₃) ₂	1 mol l ⁻¹ ; pH 7
BaCl ₂	1 mol l ⁻¹ ; pH 7 (cit. ⁵⁹)	CH ₃ COONH ₄	1 mol l ⁻¹ ; pH 7 (cit. ⁴⁹)
NaNO ₃	0,1 mol l ⁻¹ pH 7 (cit. ⁶⁰)		1 mol l ⁻¹ ; pH 8 (cit. ⁶⁴)
KNO ₃	1 mol l ⁻¹ ; pH 7 (cit. ⁶¹)		0,01 mol l ⁻¹ ; pH 7 (cit. ⁶⁵)

trálny $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ môže zapríčiňovať aj rozpúšťanie oxidokovových (Mn, Fe) povlakov na povrchu sedimentov^{52,66}. Preto sa pre spoločnú extrakciu uhličitanovej a oxidokovovej fázy začal používať pufrovaný roztok $\text{HO-NH}_2 \cdot \text{HCl}$ spolu s CH_3COONa (cit.⁶⁷). Pevnosť väzby a stabilita prechodových prvkov v chlorokomplexoch je menšia ako v octanoch. Extrakčná účinnosť octanov je v jednodložkových modelových roztokoch asi o 10 % vyššia ako u chloridov. Octany sú teda okrem kyselín najefektívnejšími extrakčnými činidlami pre iónovymeniteľný podiel⁴⁴. Jeho uvoľnenie zo sedimentu možno ešte zlepšiť extrakciou do roztokov kyseliny octovej. Tá je sama o sebe menej účinná kvôli nízkemu obsahu H^+ v jej roztoku ($[\text{H}^+] = 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). Zmes CH_3COOH s octanmi ale utvorí tlmivý systém s vysokou extrakčnou účinnosťou. Koncentráciu H^+ iónov v roztokoch CH_3COOH možno do určitej miery zvýšiť prípravou koncentrovanejších roztokov, čo je ale príčinou spoločnej extrakcie iónovymeniteľnej a uhličitanovej fázy sedimentu^{4,9,51,52,68,69}. Zaradenie takého kroku však robí lúhovací postup robustnejším. Je použitý aj v IRMM protokole⁹ a v jeho modifikovaných verziách^{51,52,68}. Pre nevýhodné rozpúšťacie a komplexačné vlastnosti $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a MgCl_2 boli extrakčné schémy (Tessier, Salomons-Förstner) modifikované tak, že extrakcia iónovymeniteľnej a uhličitanovej fázy je extrahovaná spoločne do roztoku $0,11 \text{ mol l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$ (pH 3)^{4,9}. Činidlá typu EDTA, DTPA (kyselina dietyléntriámín-pentaoctová), HEDTA (kyselina hydroxyetyléntetramíntriocová) uvoľňujú iónovymeniteľný podiel zo sedimentu, ale nie sú vhodné pre zaradenie do sekvenčného extrakčného postupu^{39,70}. Kinetické štúdie potvrdili periodický časový priebeh desorpcie prvkov (v závislosti od vzorky prebieha minimálne v 2 stupňoch³²) a význam zvyšovania pomeru objemu extrakčného činidla k hmotnosti navažky vzorky. Pri extrakčnom pomere nad 1:40 sa prudko zvyšuje obsah extrahovaného podielu^{30,32,51,52,68}. Rýchle uvoľnenie prvého podielu kovov končí v časovom intervale 0,5–2 h a pokračuje pomalé uvoľňovanie s koncentračným maximom po 24 h extrakcie^{32,71}. Normované jednokrokové extrakčné postupy ale uzančne používajú 1- a 6-hodinové lúhovanie.

Extrakčné činidlá rozpúšťajúce uhličitaný

Najpoužívanejším je okyslený pufrovaný octan amónny (sodný). Ako parciálny extraktant je začlenený do väčšiny lúhovacích postupov²⁷. Lúhovanie do roztoku $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$ spolu s CH_3COONa (pH 5) možno pokladať za takmer kvantitatívne, bez významného rozpúšťania organického podielu, Fe a Mn oxidov a hlinito-kremičitanových minerálov⁷¹. Počas 5-hodinovej extrakcie sa vylúhuje viac ako 99 % uhličitanového podielu⁴⁴. Účinky pufrovaných octanov na fázu Fe^{2+} a Mn^{2+} oxidov závisí od zachovania oxidačno-redukčných podmienok počas extrakcie. V octanových roztokoch môže byť koextrahovaný sulfidický podiel zoxidovaný v priebehu sušenia sedimentu (možno zabrániť odvzdušnením extrakčného

činidla, prácou v inertnej atmosfére). Experimentálne podmienky ovplyvňujú všetky reakcie, prebiehajúce na fázovom rozhraní. Závisia od času vzájomného kontaktu a intenzity mechanického vytrepávania. Úplné rozpustenie uhličitanov okyslenými octanmi ale závisí aj od veľkosti častíc, extrakčného pomeru, typu, kryštalinity uhličitanovej fázy a obsahu uhličitanov v sedimente. Tlmivá kapacita octanového roztoku (CH_3COONa spolu s CH_3COOH) je dostatočná na úplné rozpustenie uhličitanov v sedimentoch s ich obsahom do 70 % (cit.^{44,71,72}).

Kyslé extraktanty s redukčnými vlastnosťami

Používajú sa na redukciu Fe^{3+} a Mn^{4+} oxidov, ktoré sú v sedimente prítomné ako povlaky, tmeliaca hmota organického detritu a znovu vyžrážané druhotné minerály. Výsledky štúdií metódou sekvenčnej extrakcie a niektorých adsorpčných modelov dovoľujú predpokladať, že Fe a Mn oxidy sú spolu s organickými povlakmi povrchovo najaktívnejšie fázy v sedimentoch¹⁴. Rozmanitosť mineralogickej štruktúry určuje ich sorpčné vlastnosti a dôležitosť ako samostatnej sedimentovej fázy (sú prítomné vo formách kryštalických, kryptokryštalických i amorfných). Adsorbujú a inkludujú mnoho stopových prvkov a tým ovplyvňujú ich distribúciu. Kryštalické Fe a Mn oxidy sú odolnejšie voči pôsobeniu extrakčných činidiel ako kryptokryštalické a amorfné. Tie možno vymývať z povrchu zmenou oxidačno-redukčných pomerov v roztoku. Podobné zmeny v reálnych podmienkach vedú k zvýšeniu obsahov prvkov v pórových vodách sedimentu. Extrakciou kryštalických Fe a Mn oxidov roztokmi EDTA, zriedenej HCl a CH_3COOH sa určovala distribúcia prvkov v autigenických fázach sedimentu a v nánosových vyvreninách⁷³. Tieto extrakčné činidlá ale atakujú aj silikátovú maticu a organické podiely, preto sú pre zaradenie do sekvenčného postupu nevhodné. Dobré extrakčné médium pre oxidy Fe a Mn by malo mať kyslú, alebo komplexačnú a redukčnú zložku, ktorá by zabránila znovuvyžrážaniu Fe a Mn po ich uvoľnení do roztoku. Ďalší vývoj preto smeroval k použitiu kyslého extraktantu s redukčným účinkom: $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HO-NH}_2 \cdot \text{HCl}$ v zmesi s 25 % CH_3COOH . Táto zmes neredukuje obsah organicky viazaného uhlíka v sedimente⁴⁴ a jej publikáciou v Tessierovom postupe sa stala štandardným redukčným extrakčným krokom vo vývojovo mladších extrakčných postupoch^{10,33,48,49,74,75}. Nízka hodnota pH (pH 2) tohto činidla spôsobuje čiastočné uvoľňovanie Si a Al (pri horúcej digescii)⁴⁴. Amorfné a kryštalické Fe a Mn oxidy možno rozlíšiť extrakciou $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ pufrovaným roztokom kyseliny šťaveľovej v tme (katalytický účinok svetla na oxidáciu kryštalických Fe a Mn oxidov)^{48,72}. Okyslený $\text{HO-NH}_2 \cdot \text{HCl}$ a tlmivý roztok $(\text{NH}_4)_2(\text{COO})_2$ sú pre amorfné Fe a Mn oxidy najpoužívanejšie³⁹. Šťaveľan je pokladaný za špecifickejší ako $\text{HO-NH}_2 \cdot \text{HCl}$, nakoľko minimálne narúša silikáty^{76–78}. Limitujúci je preňho vysoký obsah jemnozrného magnetitu a silikátu s vysokým obsahom Fe. Šťaveľanom môže byť s amorfnými Fe a Mn oxidmi¹¹ koextrahovaný organický

podiel (tvorí komplexy s väčšinou kationov koordinovaných s organickou hmotou). Preto je uprednostňovaný HO-NH₂·HCl, s porovnateľnou selektivitou, ale slabšími komplexačnými vlastnosťami^{9,10,44,48–50,66,75,79}.

Extrakčné činidlá pre organický a sulfidický podiel prvkov

Na organickú hmotu a detritus je viazaný obsahovo významný podiel prvkov v sedimente. Hoci je kategorizovaný ako jedna fáza, obsahuje široké spektrum väzbových mechanizmov (adsorpcia, iónovýmena, tvorba komplexov). S organickým detritom (humínové a fulvokyseliny) je asociovaný „ľahko extrahovateľný organický podiel“. Ten sa uvoľňuje z povrchu:

1. rozpúšťaním v zásaditých roztokoch (nevýhodou je sprievodná hydrolyza; rozpúšťanie ílovitých materiálov; readsorpcia na reaktívnych miestach povrchu, ktoré vzniknú odstránením organického povlaku³⁰),
2. oxidáciou (nevýhoda – súčasná oxidácia sulfidov a prvkových podielov viazaných na sulfidoch).

Výskum nepriniesol ďalšiu špecifikáciu v tejto oblasti. Pri voľbe ekstrakčného prostredia v tomto kroku sa zvažuje miera nevýhod oboch prístupov a miera nutnosti potlačiť oxidáciu sulfidov. Rozpustnosť organických látok v študovaných sedimentoch sa zlepšovala v použitých ekstrakčných činidlách v poradí NaOH, EDTA, DTPA, difosforečnan⁷². Najdôležitejší faktor je pH roztoku (obvykle pH 7–10). Nízke pH spôsobuje ubúdanie výťažku organickej hmoty, a zvýšenie výťažku amorfných Fe oxidov, ílov a iných aluminosilikátov. Roztoky citrónanu sodného a EDTA majú silnejšie komplexačné účinky a menej narušajú aluminosilikáty. Extrakcia organického podielu bola málokedy publikovaná samostatne. V pedológii boli používané aj extrakcie organickými rozpúšťadlami selektívne odstraňujúce proteíny, polysacharidy, peptidy, tuky, vosky, živice atď. Zaujímavé bolo použitie povrchovo aktívnych látok pre zvýšenie výťažku organického podielu v zásaditých roztokoch. V rutinných aplikáciách sa ale neuplatnili. Pri ekstrakčnom štúdiu organického podielu je praktické porovnať extrahované podiely s celkovým obsahom organického uhlíka (pre porovnanie veľkosti extrahovateľného a rezistentného organického podielu). Oxidácia ostáva najpoužívanejšou technikou pre uvoľnenie organického podielu. Používajú sa zásadité roztoky NaOCl a kyslé roztoky H₂O₂. NaOCl uvoľňuje viac organického uhlíka než H₂O₂ (prednostné rozpúšťanie humínových kyselín v zásaditom prostredí; minimálny účinok na Si, Mn, Fe, a Al – použitie 5–6 % roztoku NaOCl, pH 8,5–9,5). Oxidácia v 30% roztoku H₂O₂ (pH 2–3) je podporná ohrevom na 85 °C (niekoľko hodín), a následným odparením do sucha. Používaním kyslých roztokov (pH 2) sa predchádza vyplavovaniu kationov z Fe³⁺ hydroxidov vyzrážaných pri vyšších hodnotách pH. Spolu s oxidáciou organického podielu prebieha oxidácia sulfidov. Obsah zvyškovej organickej hmoty vo vzorkách sedimentov sa po tomto kroku pohybuje v rozsahu 15–20 % (cit.⁴⁴). „Reziduálna organika“ obsahuje alkány

a rezistentný organický zvyšok. Uvoľnenie organického podielu má prebiehať bez narušenia silikátovej štruktúry sedimentu^{44,66}. Ďalším vylepšením účinnosti tohto kroku je extrakcia dosucha odpareného zvyšku po oxidácii v H₂O₂ roztokom 1 mol l⁻¹ CH₃COONH₄ (pH 2, cit.⁵⁰). V tejto podobe bol krok prijatý ako štandardný pre extrakciu organicko-sulfidického podielu a stal sa súčasťou mnohých ťuhovacích postupov^{9,30,44,48,53}. Jeho nevýhodou je katalytický rozklad MnO₂ a tvorba šľaveľanu (v prípade pôd) v priebehu oxidácie, čo znižuje jeho ďalšiu oxidačnú účinnosť a v kyslých roztokoch dochádza k narušaniu ílov, Fe a Mn oxidov (pôsobenie šľaveľanu). Štúdie anoxických sladkovodných sedimentov potvrdili, že prvkový podiel získaný pri oxidácii v H₂O₂ rastie v poradí Mn < Fe < Cr ≤ Ni < Zn < Pb < Cd < Cu, čo je v čiastočnom súlade s rozpustnosťou sulfidov týchto kovov. Časť sulfidov ale ostáva v neextrahovateľnej forme; analýzy mikrosondou dokázali aj tvorbu pyritov vo vnútri organických častíc, ktoré sú veľmi pevné a pre pôsobenie extraktantu uzavreté agregáty⁸⁰. V súčasnosti je skoro nemožné selektívne izolovať sulfidickú a organickú fázu sedimentu, čo robí prístup extrakcie organicko-sulfidickej frakcie zmesou H₂O₂ a okysleného CH₃-COONH₄, prístupom najsprávnejším a najpraktickejším zároveň. Použitie silnejších oxidačných činidiel a minerálnych kyselín by už narušilo silikátovú štruktúru sedimentovej (pôdnej) matrice.

Zmesi silných kyselín

Po odstránení vyššie uvedených sedimentových fáz v jednotlivých ekstrakčných stupňoch ostáva zvyšok zložený zo silikátových a iných rezistentných minerálov. Sedimentové rezíduum nie je environmentálne významné, ale jeho celkový rozklad a analýza obsahu vo zvyšku je nutnou kontrolou správnosti a presnosti ekstrakčného postupu. Kritériom pre voľbu mineralizačného kroku je rozklad vzorky bezo zvyšku. Kremičitanové zložky sedimentu vyžadujú mineralizáciu zmesou kyselín pri vysokých teplotách a tlakoch⁸¹, alebo horúcim rozkladom kyselinou fluorovodíkovou v kombinácii s inými minerálnymi kyselinami, z ktorých má aspoň jedna oxidačný účinok. Zmes kyselín HF+HNO₃+HClO₄ pri normálnom tlaku má tiež dostatočnú účinnosť. Jej nevýhodou sú straty prchavých fluoridov, tvorba zrazeniny KClO₄, a sekundárna tvorba zrazenín fluoridov MgAlF₃-H₂O, NaAlF₄-H₂O, a CaF₂ (cit.⁸²), s ktorými môžu koprecipitovať aj Fe, Al, Zn, a Ti. Prísada kyseliny boritej pomáha rozpustiť niektoré zrazené fluoridy vznikajúce v priebehu rozkladu zmesou HF+HNO₃ (cit.⁸³).

Extrakcia do roztokov silných komplexačných činidiel

Komplexačné činidlá sa používali v chémii pôd na určenie biopristupného podielu kovov. Ako vyplýva z uvedených faktov, roztoky silných komplexačných činidiel sú schopné uvoľniť podiely vodorozpustné, iónovymeniteľné, viazané na uhličitan, amorfné oxidy Fe a Mn

(cit.⁷²), „ľahko extrahovateľnú organiku“, a po úprave pH extrakčného prostredia, čiastočne aj na kryptokryštalické a kryštalické formy Fe a Mn oxidov⁵⁵. Štúdie v tejto oblasti dovoľujú konštatovať, že extrahované podiely do roztoku silného komplexačného činidla sa po optimalizácii extrakčného pomeru a času v závislosti od prvku blížia k súčtu extrahovaných podielov reprezentujúcich iónovymeniteľný, uhličitanový, redukovateľný a čiastočne organicko-sulfidický podiel sekvenčného extrakčného postupu, s ktorým bola jedнокroková extrakcia porovnávaná^{51,52,68,84,85}. To poskytuje informácie minimálne o mobilných a mobilizovateľných podieloch v sedimente. Porovnanie jedнокrokovvej extrakcie do roztoku silného komplexačného činidla a sekvenčného extrakčného postupu vedie k tvrdeniu, že jedнокroková extrakcia do vhodne zvoleného komplexačného činidla je po optimalizácii schopná uvoľniť mobilný, mobilizovateľný, v krajnom prípade všetok nereziduálny kovový podiel v sedimente. Tým poskytne predbežnú informáciu o litogénnom (antropogénnom) pôvode prvkov a znečistení nimi. Prostredníctvom jedнокrokovvej extrakcie do komplexačného činidla teda možno kontrolovať úroveň znečistenia a simulovať vstup mobilného a potenciálne mobilného podielu do vodného prostredia. Prítomnosť prvkových polutantov vo vodnom roztoku im umožňuje prestup cez rozhrania ďalších zložiek životného prostredia^{68,69,85}.

4. Záver

Jedнокroková extrakcia do silného komplexačného činidla sa ponúka ako zjednodušená alternatíva sledovania mobilných a mobilizovateľných prvkových podielov v sedimentoch. Diskusia a literárne odkazy poukazujú na možnosť kombinovať a čiastočne nahrádzať periodické kontroly sedimentárneho systému sekvenčnými extrakčnými postupmi, pomocou extrakcií jedнокrokových, do vhodne zvolených a odskúšaných komplexačných činidiel. Tie môžu slúžiť ako rýchly prostriedok odhadu zdrojov a charakterizácie kontaminačných vstupov do sedimentárneho prostredia, ako predbežná informácia o litogénnom (antropogénnom) pôvode prvkov, ako kontrola úrovne a simulácia vstupu mobilného podielu do vodného biotopu a to za neporovnateľne kratší čas a s nižšími finančnými nákladmi ako extrakcie sekvenčné^{2,3}. Po adaptácii na regionálne podmienky môže byť vhodnou doplnkovou kontrolou a formou priebežného monitoringu znečistenia sedimentov (pôd). Z hľadiska ekonomickej a časovej nenáročnosti je vhodná ako alternatívny test k normovaným „IRMM postupom“ a môže byť formou rýchlej indikácie zmenenej mobility prvkových kontaminantov v monitorovanom prostredí. Takto získaná informácia o aktuálnom znečistení sedimentárneho prostredia je často dostačujúca na to, aby boli realizované správne rozhodnutia v oblasti ochrany životného prostredia.

Zoznam použitých skratiek

CRM	certifikovaný referenčný materiál (certified reference material)
DCB	dithioničitanovo-citrónanový tlmivý roztok (dithionite-citrate buffer)
DTPA	kyselina dietyléntriámín-pentaoctová (diethylenetri-aminepentaacetic acid)
EDTA	kyselina etyléndiámín-tetraoctová (ethylenediamine-tetraacetic acid)
HEDTA	kyselina hydroxyetyléndiámín-trioctová (hydroxyethylenediaminetriacetic acid)
HF + HNO ₃ + HClO ₄	zmes kyselín fluorovodíkovej, dusičnej a chloristej
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements
red-ox	oxidačne redukčný

Autori ďakujú za finančnú podporu grantu VEGA 1/3149/06 a DAAD –11/2005.

LITERATÚRA

1. Welz B.: *J. Anal. At. Spectrom.* 13, 413 (1998).
2. Davidson Ch. M., Duncan A. L., Littlejohn D., Ure A. M., Garden L. M.: *Anal. Chim. Acta* 363, 45 (1998).
3. Ariza J. L. G., Giráldez I., Sánchez-Rodas D., Morales E.: *Anal. Chim. Acta* 414, 151 (2000).
4. Ure A. M., Davidson C. M., Thomas R. P., v knihe: *Quality Assurance for Environmental Analysis.*, (Quevalier P., Maier E. A., Griepink B., ed.), kap. 20. Elsevier, Amsterdam 1995.
5. Rauret G., López-Sánchez J. F., Sahuquillo A., Rubio R., Davidson C., Ure A. M., Quevauviller Ph.: *J. Environ. Monit.* 1, 57 (1999).
6. Žemberiová M., Zwaik A. Al Hakem, Farkašová I.: *J. Radioanal. Nuclear Chem.* 229, 67 (1998).
7. Tokalioğlu Ş., Kartal Ş., Elci L.: *Anal. Chim. Acta* 413, 33 (2000).
8. Bódog I., Polyák K., Hlavay J.: *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 66, 79 (1997).
9. Fiedler H. D., Lopez-Sanchez J.-F., Rubio R., Rauret G., Quevauviller Ph., Ure A. M., Muntau H.: *Analyst* 119, 1109 (1994).
10. Ure A. M., Quevauviller P., Muntau H., Griepink B.: *CEC/BCR Information Report EUR 14763 EN*, Brussels 1993.
11. LeRiche H. H., Weir A. H.: *J. Soil Sci.* 14, 225 (1963).
12. Baxter D. C., Frech W.: *Pure and Appl. Chem.* 67, 615 (1995).
13. Müller G., Ottenstein R., Yahya A.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 371, 637 (2001).

14. Lombi E., Sletten R. S., Wenzel W. W.: *Water Air and Soil Poll.* 124, 319 (2000).
15. Ianni C., Ruggieri N., Rivaro P., Frache R.: *Anal. Sci.* 17, 1273 (2001).
16. Perez C. B., Gonzales J., Gomez F.: *Analyst* 127, 681 (2002).
17. Fanguero D., Bermond A., Santos E., Carapuca H., Duarte A.: *Anal. Chim. Acta* 459, 245 (2002).
18. Quevauviller P., Rauret G., Rubio R., Lopez-Sanchez J.-F., Ure A. M., Bacon J., Muntau H.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 357, 611 (1997).
19. Quevauviller P., Lachica M., Barahona E., Gomez A., Rauret G., Muntau H.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 360, 505 (1998).
20. The Swiss „Ordinance on Pollutants in Soils“ -VSBO/SR814.12, (1986).
21. Quevauviller P.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 354, 515 (1996).
22. Quevauviller P.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 370, 11 (2001).
23. Klich H.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 371, 1083 (2001).
24. Quevauviller P.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 371, 1085 (2001).
25. Grinberg P., Gonçalves R. A., de Campos R. C.: *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 1044 (2005)
26. Bravo M., Lespes G., De Gregori I., Pinochet H., Gautier M. P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 1082 (2005)
27. Van Valin R., Morse J. W.: *Mar. Chem.* 11, 535 (1982).
28. Koplík R., Čurdová E., Mestek O.: *Chem. Listy* 91, 38 (1997)
29. Stumm W., Morgan J. J.: *Aquatic Chemistry*. Wiley, New York 1981.
30. Ure A. M., Davidson C. M.: *Chemical Speciation in the Environment.*, Blackie Academic and Profesional, Glasgow 1995.
31. Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.-G., Muntau H., Van Leuwen H. P., Lobinski R.: *Pure Appl. Chem.* 72, 1453 (2000).
32. Lion L. W., Altmann R. S., Leckie J. O.: *Environ. Sci. Technol.* 16, 660 (1982).
33. Shuman L. M.: *Soil. Sci.* 140, 11 (1985).
34. Engler R. M., Brannon J. M., Rose J., v knihe: *Chemistry of Marine Sediments*. (Yen T. F., ed.), str. 163. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor 1977.
35. Presley B. J., Kolodny Y., Nissabaum A., Kaplan I. R.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 36, 1073 (1972).
36. Linehan D. L., Sinclair A. H., Mitchell M. C.: *Plant and Soil* 86, 147 (1985).
37. Sanders J. R.: *J. Soil Sci.* 34, 315 (1983).
38. Sayles F. L., Wilson T. R., Hume D. H., Mangelndorf P. C.: *Science* 181, 154 (1973).
39. Pickering W. F.: *Ore Geol. Rev.* 1, 83 (1986).
40. Sposito G., Lund L. J., Chang A. C.: *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 46, 260 (1972).
41. Miller W. P., McFee W. W., Kelley J. M.: *J. Environ. Qual.* 12, 579 (1983).
42. Shuman L. M.: *J. Soil Sci. Soc. Amer.* 47, 656 (1985).
43. Pickering W. F.: *Ore Geol. Rev.* 1, 95 (1986).
44. Tessier A., Campbell P. G. C., Bisson M.: *Anal. Chem.* 51, 844 (1979).
45. Stover R. C., Sommers L. E., Silviera J.: *J. Water Poll. Fed.* 48, 2165 (1976).
46. Chao T. T.: *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 36, 764 (1972).
47. McLaren R. G., Crawford D. V.: *J. Soil. Sci.* 24, 172 (1973).
48. Salomons W., Förstner U.: *Environ. Technol. Lett.* 1, 506 (1985).
49. Tessier A., Campbell P. G. C.: *Anal. Chem.* 60, 1475 (1988).
50. Gupta S. K., Chen K. Y.: *Environ. Lett.* 10, 129 (1975).
51. Vojteková V., Mackových D., Krakovská E., Remetiová D., Tomko J.: *Chem. Pap.* 57 (3), 179 (2002).
52. Vojteková V., Mackových D., Krakovská E.: *Microchim. Acta* 150, 261 (2005)
53. Gibbs R. J.: *Geol. Soc. Am. Bull.* 88, 829 (1977).
54. Stumm W.: *Aquatic Surface Chemistry*. Wiley, New York 1987.
55. Gleyzes Ch., Tellier S., Astruc M.: *Trends Anal. Chem.* 21, (6-7), 451 (2002).
56. Kuznecov V. A., Šimko G. A.: *Metod postadijnych vytjažek pri geochimičeských issledovanijach*, str. 19. Nauka i Technika, Minsk 1990.
57. McGrath S. P., Cegarra J.: *Soil Sci.* 43, 313 (1992).
58. Rigol A.: *Environ. Sci. Technol.* 33, 887 (1999).
59. Meguellati N., Robbe D., Marchandise P., Astruc M.: *J. Francais d'Hydrologie* 3, (39), 275 (1982).
60. Sauerbeck D. R., Rietz E.: *Rep. EUR 8022 (CA 99:193726) CEC*, Brussels 1983.
61. Gupta S.: *Environ. Technol.* 11, 229 (1990).
62. Shuman L. M.: *Soil. Sci.* 127, (1), 10 (1979).
63. Zeien H., Brümmer G. W.: *Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gessellsch.* 59, 505 (1989).
64. Lin Z.: *Sci. Total Environ.* 198, 13 (1997).
65. Arunachalam J.: *Sci. Total Environ.* 181, 147 (1996).
66. Horowitz A. J., Eldrick K. A.: *Appl. Geochem.* 2, 437 (1987).
67. Chester R., Hughes M. J.: *Chem. Geol.* 2, 249 (1967).
68. Vojteková V., Krakovská E., Mackových D., Nováková J., Šoltýsová H.: *Slovak Geol. Mag.* 9, 133 (2003).
69. Vojteková V., Mackových D., Krakovská E., Remetiová, D., Tomko J.: *Hutní Analytika 2002, Luhačovice 15.–19.4. 2002*, Zborník prednášok, (Helán V., ed.), str. 134.
70. Sommers L. E., Lindsay W. L.: *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 43, 39 (1979).
71. Wilber W. G., Hunter J. V.: *Water Resour. Bull.* 15, 790 (1979).
72. Cornelis R., Caruso J., Crews H., Heumann K. (ed): *Hanbook of Elemental Speciation: Techniques nad Methodology*. Wiley, Chichester 2003.
73. Goldberg E. D., Arrhenius G. O.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 13, 153 (1958).
74. Bogle E. W., Nichol I.: *J. Geochem. Explor.* 15, 405

- (1981).
75. Rule J. H., Alden R. W.: *Est. Coast. Shelf Sci.* 34, 487 (1992).
 76. Heath G. R., Dymond J.: *Geol. Soc. Am. Bull.* 88, 723 (1977).
 77. Shuman L. M.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 1099 (1982).
 78. Landa D. R., Gast R. G.: *Clays Clay Miner.* 21, 121 (1973).
 79. Chao T. T., Liyi Z.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 225 (1983).
 80. Norrish K., Rosser H., Warren L. J.: *Appl. Geochem.* 1, 117 (1986).
 81. Krakovská E., Kuss H.-M.: *Rozklady v analytickej chémii*. Viena, Košice 2001.
 82. Förstner U., Schoer J.: *Environ. Technol. Lett.* 7, 295 (1984).
 83. Farmer J. G., Gibson M. J.: *At. Spectrosc.* 2, 176 (1981).
 84. Perez C. B., de Jesus Gonzales M., Fernanadez Gomez E.: *Analyt* 127 (5), 681 (2002).
 85. Vojteková V.: *Kandidátska dizertačná práca*. Technická univerzita Košice, Košice 2004.

V. Vojteková and E. Krakovská (*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Sciences, P. J. Šafárik University, Košice, Slovak Republic*): **Fractionation Analysis of Sediments – Limitations in the Extractant Selectivity**

Sequential extraction procedures (SEPs) are commonly used for fractionation of solid element forms in sediments and soils. Many SEPs have been developed and, despite numerous criticisms, they remain very useful. This paper reviews extractants used in various schemes, with their advantages and disadvantages, and compares the use of SEPs with the single-step extraction with a strong complexing agent. The single-step leaching with a strong complexing agent (after optimisation of extraction conditions in accordance with local specificities) is able to release mobile and potentially mobile metal forms associated with specific sediment phases. With respect to the published experiments, it can be stated that the extraction with a strong complexing agent could well be used for the screening of sediment pollution. This is an economical and time-saving test supplementary to the recommended and attested IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) extraction protocol and can also be used as a rapid alarming indicator of element mobility changes in sedimentary systems. Usually, such information on stream sediment pollution is sufficient for decision making in environmental protection.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ SUBMIKROMOLÁRNÍCH KONCENTRACÍ 3-NITROFLUORANTHENU A PENDIMETHALINU NA STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

LUCIE VAŇKOVÁ^{a*}, LUCIE MAIXNEROVÁ^{a*},
KAREL ČÍŽEK^b, JAN FISCHER^b, JIŘÍ
BAREK^b, TOMÁŠ NAVRÁTIL^c a BOGDAN
YOSYPCHUK^c

^a Masarykova střední škola chemická, Křemencova 12, 116 28 Praha 1, ^b Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6, 128 43 Praha 2, ^c Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
barek@natur.cuni.cz

Došlo 7.6.06, přijato 9.10.06.

Klíčová slova: 3-nitrofluoranthén, pendimethalin, voltametrie, stříbrná pevná amalgámová elektroda, pitná voda

Úvod

3-Nitrofluoranthén (3-NF) a pendimethalin představují potenciální riziko pro přirozené biologické funkce živé přírody s dopadem na zdraví lidí a zvířat, jelikož jsou jim přisuzovány možné karcinogenní účinky^{1,2}.

3-NF patří do skupiny látek označovaných jako nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH), které vznikají zejména při nedokonalém spalování fosilních paliv³, ale také při fotolytických reakcích mateřských polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) s oxidy dusíku v atmosféře⁴. Pro stanovení NPAH byla popsána celá řada analytických metod s různou citlivostí a selektivitou. Mezi ty nejběžněji používané patří HPLC s UV/VIS detekcí, avšak největší potenciál představuje použití GC či HPLC s MS detekcí (viz přehledný referát⁵).

Pendimethalin je látka, která se používá jako herbicid² k zabraňování klíčivosti semen citlivých plevelů. Ve světě je běžně používán a v České republice se s ním lze setkat v nejrůznějších prostředcích jako např. Escort, Maraton či STOMP 330E (cit.⁶). Analytické metody jsou zaměřeny na stanovení pendimethalinu v půdě a ve vodě nejčastěji metodou GC s MS detekcí^{7,8}.

Polarografickému a voltametrickému chování těchto látek byla doposud věnována menší pozornost i přesto, že obě obsahují ve svých strukturách snadno redukovatelnou nitroskupinu. Jak 3-NF (cit.⁹) tak i pendimethalin^{10,11} byl zatím stanovován pouze na rtuťových elektrodách. V návaznosti na tyto studie je v předkládané práci věnována pozornost použití netoxické stříbrné pevné amalgámové elektrody (AgSAE)^{12–14} pro stanovení 3-nitrofluoranthenu a pendimethalinu. Tento druh elektrody představuje možnou náhradu za visící rtuťovou kapkovou elektrodu, která se běžně používá pro stanovení elektrochemicky redukovatelných analytů. Mezi její výhody patří široké potenciálové okno v katodické oblasti, nenáročná předúprava, netoxičita elektrodového materiálu, dlouhodobá stabilita odezvy či snadná manipulace při využití v terénních měřeních. Použití AgSAE umožňuje práci v různých modifikacích, zde bylo pracováno se rtuťovým meniskem modifikovanou stříbrnou pevnou amalgámovou elektrodou (m-AgSAE), se kterou je obecně dosahováno nejlepších výsledků v porovnání s ostatními modifikacemi. Základní charakteristiky, aplikační oblasti a specifikace práce s AgSAE jsou shrnuty v pracích Yosypchuka^{13,14}.

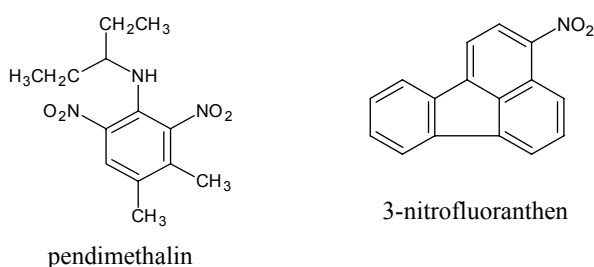
Cílem předkládané práce bylo nalézt optimální podmínky, při kterých by bylo možno detegovat obě látky v co nejnižších koncentracích pomocí diferenční pulsní voltametrie (DPV) či adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) ve smíšeném vodně-methanolickém základním elektrolytu (ZE) a aplikovat je na přímé stanovení v pitné vodě.

Experimentální část

Chemikálie

Zásobní roztoky 3-nitrofluoranthenu a pendimethalinu (příslušné strukturální vzorce na obr. 1) v methanolu (p.a., Lachema, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním 0,02473 g 3-NF (90% Sigma-Aldrich, ČR) či 0,02810 g pendimethalinu (Výzkumný ústav organických syntéz, Pardubice-Rybitví) ve 100 ml

* Lucie Vaňková a Lucie Maixnerová s touto prací obsadily 3. místo za chemii v celopražském kole Středoškolské odborné činnosti v roce 2005. Tato tištěná verze je zkrácená oproti původní, která je vystavena jako doplňkový materiál na URL: http://chemicke-listy.vscht.cz/docs/full/2006_12_1105-1110.pdf.



Obr. 1. Strukturální vzorce studovaných látek

tohoto rozpouštědla. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě za laboratorní teploty. Spektrofotometricky bylo ověřeno, že oba roztoky jsou stále minimálně 120 dní. Další použité chemikálie: kyselina boritá, octová (99%), fosforečná (85%), hydroxid sodný a chlorid draselný (čistoty p.a.) byly získány od firmy Lachema, ČR. Brittonovy-Robinsonovy (B-R) tlumivé roztoky¹⁵ o příslušném pH byly připraveny smísením 0,2 mol l⁻¹ NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci 0,04 mol l⁻¹. Pro přípravu vodných roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore, USA). Používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách, ve tmě a za laboratorní teploty. Kyslík byl při voltametrickém měření odstraňován šestiminutovým probubláváním dusíkem čistoty 4.0 (Linde, ČR). Pro přípravu modelových vzorků pitné vody byla použita voda z pražské vodovodní sítě odebraná z budovy chemických kateder PřF UK, Albertov 6, Praha 2.

Aparatura

Při voltametrických měřeních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograph s programem PolarPro 2.0 fy Polar-Sensors, ČR pracujícím pod operačním systémem Windows 3.11 (Microsoft, USA). Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení s referenční argentchloridovou elektrodou (1 M-KCl) (typ RAE 113) a pomocnou elektrodou tvořenou platinovým plíškem (vše Monokrystaly, Turnov). Jako pracovní byly použity stříbrné pevné amalgámové elektrody (AgSAE) č. 2-05-19 pro měření 3-NF a 2-05-26 pro měření pendimethalinu dodané fy Polar-Sensors, ČR. Průměry (*d*) amalgámového disku elektrod byly 500 μm (2-05-19) a 565 μm (2-05-26). Při DPV bylo pracováno s rychlostí polarizace 20 mV s⁻¹ a na elektrody byly vkládány pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě -50 mV.

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH metrem Jenway (typ 4330) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005) (vše Jenway, Velká Británie). pH metr byl kalibrován standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty. V textu je dále používána hodnota výsledného pH vodně-methanolickeho roztoku. Jedná se o hod-

notu získanou měřením těchto roztoků pomocí skleněné elektrody kalibrované standardními roztoky vodných pufrů. Tato hodnota není tedy termodynamická veličina, ale pomocný parametr zavedený za účelem co nejstručnější charakterizace měřených roztoků.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Pye-Unicam SP8-400 UV/VIS spectrophotometer (Cambridge, Velká Británie) v křemenných kyvetách měřené tloušťky 1 mm.

Pracovní postupy

Stálost zásobních roztoků v methanolu byla kontrolována spektrofotometricky oproti čistému methanolu měřením absorbance při příslušných maximech při vlnové délce 382,0 nm pro 3-NF a 238,4 nm pro pendimethalin.

Při voltametrických stanoveních bylo postupováno vždy tak, že do 10 ml odměrné baňky byl odpipetován příslušný objem zásobního roztoku 3-NF či pendimethalinu v methanolu, přidán potřebný objem methanolu a po promíchání byl roztok doplněn BR pufrům o daném pH po rysku. Takto připravený roztok byl převeden do polarografické nádoby a zbaven kyslíku šestiminutovým probubláním dusíkem. Všechny křivky byly zaznamenány 3krát. Před vstupem dusíku do polarografické nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs methanol-voda o stejném poměru jako analyzovaný roztok. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. Výšky píků pro 3-NF byly vyhodnocovány od spojnice minim po stranách daného píku, kdežto pro pendimethalin byla nalezena společná spojnice minim před prvním a za druhým píkem. Mez stanovitelnosti (*L_Q*) byla zjišťována programem ADSTAT 2.0 (TriloByte, ČR), který ji počítá jako nejmenší hodnotu signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního grafu dostatečně malá a rovna číslu 0,1 (cit.¹⁶).

Pracovní elektrodu m-AgSAE bylo nutné před vlastním měřením připravit tak, aby bylo zaručeno dosažení reprodukovatelných výsledků. V souladu s postupy doporučovými v návodech pro použití komerčních elektrod byly prováděny tyto operace: amalgamace, elektrochemická aktivace a regenerace. Tyto operace jsou podrobněji popsány v práci¹².

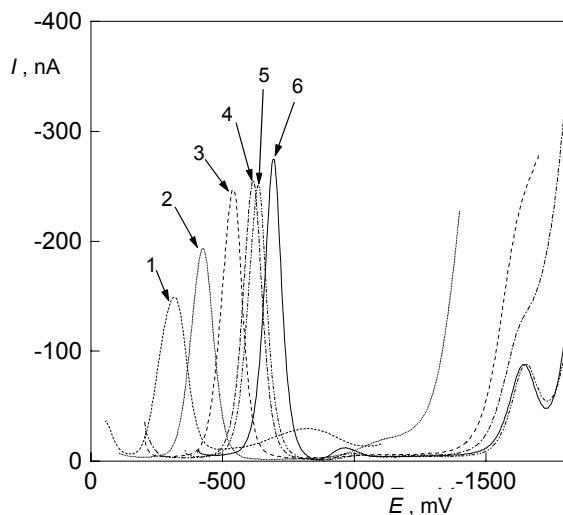
Výsledky a diskuse

3-Nitrofluoranthren

Vliv pH na chování 3-NF při DPV na m-AgSAE byl sledován ve směsi methanol-BR pufr pH 2–12 (9:1). Koncentrace látky byla 1·10⁻⁴ mol l⁻¹. Prostředí bylo vybráno na základě předchozích měření 3-NF na rtuťových elektrodách, kde vysoký obsah methanolu zabraňoval vylučování 3-NF během analýzy⁹. Vybrané voltamogramy 3-NF pro různé pH jsou uvedeny na obr. 2. Je patrné, že 3-NF poskytuje v závislosti na pH dva píky. Méně negativní pík se objevuje v celém rozsahu pH a jeho potenciál (*E_p*¹) se po-

souvá se stoupajícím pH směrem k zápornějším hodnotám. Druhý pík je přítomen jak v kyselých, tak i alkalických pH. V kyselé oblasti se jeho potenciál (E_p^2) posouvá k zápornějším hodnotám se vzrůstem pH, avšak v alkalické oblasti se hodnota E_p^2 ani I_p^2 (proud píku) prakticky nemění se změnou pH. Z předcházejících měření na rtuťových elektrodách⁹ lze usuzovat, že první pík odpovídá čtyřelektronové irreverzibilní redukci nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu, která je dále irreverzibilně redukována až na aminoskupinu (2. pík).

Nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný 1. pík (I_p^1) 3-NF byl získán v prostředí methanol-BR pufr pH 12 (9:1). Pro další měření byl použit roztok 0,01 M-NaOH místo BR pufru o pH 12. Pro kontrolu, zda nedochází k pasivaci elektrody, bylo provedeno 24 měření 3-NF ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí methanol-0,01 M-NaOH při experimentálně nalezených optimálních regeneračních potenciálech $E_{in} = -350 \text{ mV}$ a $E_{fi} = -1600 \text{ mV}$. Opakovatelnost



Obr. 2. DP voltamogramy 3-NF ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE; $d = 500 \mu\text{m}$, v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH BR pufru 2,0 (1), 4,0 (2), 6,0 (3), 8,0 (4), 10,0 (5) a 12,0 (6)

byla charakterizována pomocí relativní směrodatné odchylky, RSD = 1,1 %, jenž vyjadřovala nízkou míru pasivace elektrody, která má obvykle za následek pokles výšky píku. Za optimálních podmínek byly změřeny kalibrační závislosti v rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ 3-NF. Koncentraci $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ však již nebylo možné spolehlivě vyhodnotit. V koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ nebyla koncentrační závislost již lineární a byl rovněž pozorován určitý posun E_p^1 směrem k zápornějším hodnotám. Parametry získaných kalibračních závislostí jsou uvedeny v tabulce I.

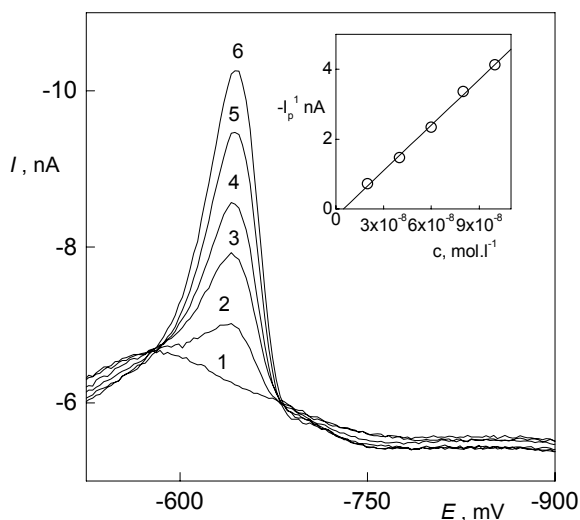
Při použití AdSV bylo nutné nalézt nejen vhodné prostředí, ale i potenciál akumulace (E_{acc}) a čas akumulace (t_{acc}). 3-NF je dobře rozpustný v methanolu, jehož vysoká koncentrace v roztoku tak vede ke snížení adsorpce látky na elektrodě. Byl tedy sledován vliv akumulace 3-NF ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) na výšku proudu píku v prostředí methanol-0,01 M-NaOH (9:1), (1:1) a (1:9) pro $E_{acc} = -350 \text{ mV}$. Nejvyšších hodnot signálu bylo dosaženo v prostředí obsahujícím 10 % methanolu pro $t_{acc} = 300 \text{ s}$, ve kterém byla poté změřena kalibrační závislost pro koncentrační rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Avšak během měření docházelo k výrazné pasivaci elektrody a od určité koncentrace 3-NF už nebyl pozorován lineární růst signálu v závislosti na koncentraci. K zajištění dostatečně opakovatelného signálu bylo dále pracováno v prostředí 50% methanolu, v němž zřejmě dochází ke snazšímu rozpouštění produktů redukce 3-NF z povrchu elektrody. Závislost I_p^1 na t_{acc} pro $E_{acc} = -350 \text{ mV}$ v prostředí methanol-0,01 M-NaOH (1:1) vykazuje maximum při $t_{acc} = 60 \text{ s}$, avšak ani za těchto podmínek nebyla kalibrační závislost lineární. Proto byl pro proměření kalibračních závislostí pro 3-NF v rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ zvolen čas akumulace $t_{acc} = 15 \text{ s}$ a potenciál akumulace $E_{acc} = -350 \text{ mV}$, kdy byla získána lineární závislost v celém koncentračním rozsahu. Totéž platí i o řádově nižším koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (viz obr. 3). Parametry koncentračních závislostí pro DPV a AdSV stanovení 3-NF na m-AgSAE jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I

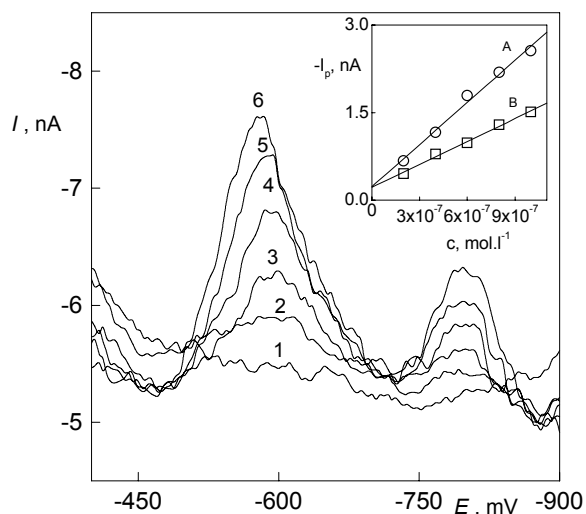
Parametry kalibračních přímků pro stanovení 3-NF metodou DPV a AdSV na m-AgSAE, $d = 500 \mu\text{m}$

Technika	c [mol l^{-1}]	Směrnice [$\text{nA mol}^{-1} \text{l}$]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	L_Q (mol l^{-1})
DPV ^a	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$4,95 \cdot 10^6$	2,9	0,9987	–
DPV ^a	$(4-10) \cdot 10^{-7}$	$6,14 \cdot 10^6$	–0,2	0,9982	$4 \cdot 10^{-7}$
AdSV ^b	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$3,61 \cdot 10^7$	0,5	0,9996	–
AdSV ^b	$(2-10) \cdot 10^{-8}$	$4,35 \cdot 10^7$	–0,2	0,9987	$3 \cdot 10^{-8}$

^a Prostředí methanol-0,01 M-NaOH (9:1); $E_{in} = -350 \text{ mV}$ a $E_{fi} = -1600 \text{ mV}$, ^b prostředí methanol-0,01 M-NaOH (1:1); $E_{in} = -350 \text{ mV}$ a $E_{fi} = -1600 \text{ mV}$; $t_{acc} = 15 \text{ s}$, $E_{acc} = -350 \text{ mV}$



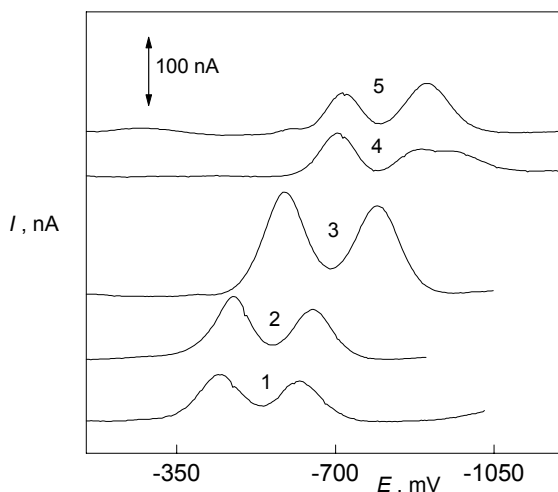
Obr. 3. AdS voltamogramy 3-NF na m-AgSAE; $d = 500 \mu\text{m}$, v prostředí methanol-0,01 M-NaOH (1:1) při $t_{\text{acc}} = 15 \text{ s}$ a $E_{\text{acc}} = -350 \text{ mV}$, $E_{\text{in}} = -350 \text{ mV}$ a $E_{\text{fi}} = -1600 \text{ mV}$; $c(3\text{-NF})$: 0 (1), $2 \cdot 10^{-8}$ (2), $4 \cdot 10^{-8}$ (3), $6 \cdot 10^{-8}$ (4), $8 \cdot 10^{-8}$ (5), $10 \cdot 10^{-8}$ (6) mol l^{-1} ; vložená kalibrační závislost pro první pik I_p^1



Obr. 5. DP voltamogramy pendimethalinu na m-AgSAE; $d = 565 \mu\text{m}$, v prostředí methanol-BR pufr pH 7 (1:1), $E_{\text{in}} = -100 \text{ mV}$ a $E_{\text{fi}} = -1100 \text{ mV}$; $c(\text{pendimethalin})$: 0 (1), $2 \cdot 10^{-7}$ (2), $4 \cdot 10^{-7}$ (3), $6 \cdot 10^{-7}$ (4), $8 \cdot 10^{-7}$ (5), $10 \cdot 10^{-7}$ (6) mol l^{-1} ; vložené kalibrační závislosti pro první pik I_p^1 (A) a pro druhý pik I_p^2 (B)

Pendimethalin

Vliv pH na chování pendimethalinu při DPV na m-AgSAE byl sledován ve směsi methanol-BR pufr pH 2–12 (9:1). Koncentrace látky byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Prostředí bylo



Obr. 4. DP voltamogramy pendimethalinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE; $d = 565 \mu\text{m}$, v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH BR pufru 2,0 (1), 4,0 (2), 7,0 (3), 10,0 (4) a 12,0 (5)

vybráno na základě předchozích měření pendimethalinu na rtuťových elektrodách¹⁰. Vybrané voltamogramy pendimethalinu pro různá pH jsou uvedeny na obr. 4. Z naměřených závislostí vyplývá, že pendimethalin poskytuje v celé oblasti pH pouze dva píky, které se s rostoucím pH posouvají k negativnějším potenciálům. Na základě výsledků Oláha¹⁰ lze každému píku pendimethalinu přisoudit čtyřelektronovou irreverzibilní redukci jedné nitroskupiny na hydroxylaminovou skupinu.

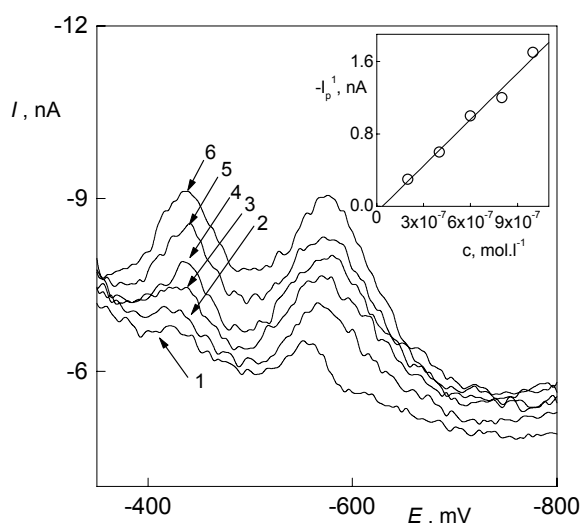
Nejlépe vyhodnotitelné píky byly získány v roztoku methanol-BR pufr pH 7 (1:1), a proto bylo toto prostředí vybráno pro proměření koncentračních závislostí. Ve stejném roztoku byla nejprve sledována výška píku pendimethalinu v závislosti na počtu měření při potenciálech regenerace $E_{\text{in}} = -200 \text{ mV}$ a $E_{\text{fi}} = -1400 \text{ mV}$. Ukázalo se, že při takto zvolených regeneračních potenciálech docházelo k výraznému poklesu proudů píků a posunům jejich E_p k zápornějším hodnotám, což bylo způsobeno pasivací elektrody. Byly tedy experimentálně nalezeny nové optimální regenerační potenciály $E_{\text{in}} = -100 \text{ mV}$ a $E_{\text{fi}} = -1100 \text{ mV}$, při kterých byl pozorován nejmenší pokles obou píků. U prvních pěti měření byl pokles nejvýraznější, poté však došlo k ustálení signálu. Proto tato první měření nebyla vyhodnocována. Za těchto podmínek byly proměřeny kalibrační křivky pendimethalinu v rozsahu $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Na obr. 5 jsou uvedeny voltamogramy pendimethalinu pro koncentrační rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Pro rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ nebyla již závislost lineární. Vyhodnocovány byly vždy oba píky (I_p^1 a I_p^2). Parametry kalib-

Tabulka II

Parametry kalibračních přímek pro stanovení pendimethalinu pomocí DPV na m-AgSAE, $d = 565 \mu\text{m}$

c [mol Γ^{-1}]	Směrnice [nA mol $^{-1}$ l]		Úsek [nA]		Korelační koeficient		L_Q [mol Γ^{-1}]	
	1. pík	2. pík	1. pík	2. pík	1. pík	2. pík	1. pík	2. pík
$(2-10) \cdot 10^{-6}$ ^a	$2,17 \cdot 10^6$	$1,55 \cdot 10^6$	-1,6	-1,2	0,9984	0,9954	–	–
$(2-10) \cdot 10^{-7}$ ^a	$2,41 \cdot 10^6$	$1,31 \cdot 10^6$	-0,2	-0,2	0,9950	0,9966	$4 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$
$(2-10) \cdot 10^{-6}$ ^b	$1,50 \cdot 10^6$	$0,83 \cdot 10^6$	-0,9	-1,0	0,9803	0,9522	–	–
$(2-10) \cdot 10^{-7}$ ^b	$1,68 \cdot 10^6$	$0,98 \cdot 10^6$	-0,1	-0,3	0,9955	0,8893	$5 \cdot 10^{-7}$	–

^a Methanol-BR pufr pH 7 (1:1); $E_{in} = -100$ mV, $E_{\bar{n}} = -1100$ mV, ^b modelové vzorky pitné vody v prostředí BR pufru pH 7; $E_{in} = -100$ mV, $E_{\bar{n}} = -1100$ mV



Obr. 6. DP voltamogramy pendimethalinu v pitné vodě na m-AgSAE; $d = 565 \mu\text{m}$, v prostředí BR pufr o pH 7 (1:1), $E_{in} = -100$ mV a $E_{\bar{n}} = -1100$ mV; c (pendimethalin): 0 (1), $2 \cdot 10^{-7}$ (2), $4 \cdot 10^{-7}$ (3), $6 \cdot 10^{-7}$ (4), $8 \cdot 10^{-7}$ (5), $10 \cdot 10^{-7}$ (6) mol Γ^{-1} ; vložená kalibrační závislost pro první pík I_p^1

račních závislostí pro jednotlivá koncentrační rozmezí jsou uvedeny v tabulce II.

Nalezené optimální podmínky pro stanovení pendimethalinu pomocí DPV na m-AgSAE byly aplikovány pro jeho přímé stanovení v modelových vzorcích pitné vody. K 5 ml pitné vody bylo přidáno potřebné množství zásobního roztoku pendimethalinu ($2-10 \mu\text{l}$) a vzorek byl doplněn BR pufr pH 7 do 10 ml a po probublání dusíkem byl zaznamenán DP voltamogram. Koncentrační závislosti byly proměřeny v rozmezích $2 \cdot 10^{-6}-1 \cdot 10^{-5}$ a $2 \cdot 10^{-7}-1 \cdot 10^{-6}$ mol Γ^{-1} (viz obr. 6). Opět byly vyhodnocovány oba píky. Kvůli přítomnosti píků v základním elektrolytu bylo nutné odečíst jejich signál od signálu pendimethalinu v kalibračních závislostech a tak provést korekci úseků kalibračních přímek. Příslušné parametry jsou uvedeny v tabulce II.

Stanovení založené na měření výšky 1. píku má daleko vyšší směrnici a stejně tak i korelační koeficient, proto je mu při stanovení pendimethalinu dáována přednost před měřením výšky 2. píku.

Závěr

Byly nalezeny vhodné podmínky pro stanovení submikromolárních koncentrací genotoxických látek 3-nitrofluoranthenu a pendimethalinu na m-AgSAE pomocí diferenční pulsní voltametrie, pro 3-nitrofluoranthen i pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie. Pro pendimethalin byly nalezené podmínky aplikovány pro jeho stanovení v modelových vzorcích pitné vody.

Tento výzkum byl finančně podporován Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt 332/2006) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt LC06035).

LITERATURA

- URL: http://www.who.int/ipcs/publications/part_1.pdf, staženo 5.6.2006.
- URL: http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33194, staženo 5.6.2006.
- Rosenkranz H.S.: *Mutat. Res.* 101, 1 (1982).
- Vincenti M., Minero C., Pelizzetti E., Fontana M., De Maria R.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 7, 1255 (1996).
- Barek J., Cvačka J., Moreira J. C., Zima J.: *Chem. Listy* 90, 805 (1996).
- URL: http://www.srs.cz/srs/registrace/seznam/registr_2005_03_15_read_only.pdf, staženo 8.12.2005.
- Goncalves C., Alpendurada M. F.: *Talanta* 65, 1179 (2005).
- Tanabe A., Mitobe H., Kawata K., Sakai M.: *J. Chromatogr., A* 754, 159 (1996).

9. Čížek K.: *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2003.
10. Oláh B.: *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 1992.
11. Sreedhar M., Damodar J., Venkata N., Jyothi V., Reddy S. R. J.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 73, 2477 (2000).
12. Yosypchuk B., Novotný L.: *Chem. Listy* 96, 756 (2002).
13. Yosypchuk B., Novotný L.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 141 (2002).
14. Yosypchuk B., Novotný L.: *Electroanalysis* 14, 1733 (2002).
15. Sýkora V., Zátka V.: *Příruční tabulky pro chemiky*, str. 149. SNTL, Praha 1967.
16. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*. FINISH, Pardubice 1992.

L. Vaňková^a, L. Maixnerová^a, K. Čížek^b, J. Fischer^b, J. Berek^b, T. Navrátil^c, and B. Yosypchuk^c
(^aMasaryk Technical College of Chemistry, Prague, ^bDepartment of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Charles University, Prague, ^cJ. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):
Voltammetric Determination of Submicromolar Concentrations of 3-Nitrofluoranthene and Pendimethalin at Silver Solid Amalgam Electrode

Optimum conditions are described for the determination of genotoxic 3-nitrofluoranthene (3-NF) and pendimethalin using differential pulse voltammetry (DPV). The limits of quantification (L_Q) around $4 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹ were found for both the materials. In addition, adsorptive stripping voltammetry was used for determination of 3-NF with L_Q around $3 \cdot 10^{-8}$ mol l⁻¹. The practical applicability of newly developed methods was demonstrated on direct determination of pendimethalin in model samples of drinking water by DPV with L_Q around $5 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹.

VYUŽITÍ NESPECIFICKÝCH PEPTIDŮ PRO PROTEOMICKOU IDENTIFIKACI NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH PROTEINŮ Z JEČMENE MALDI-TOF HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

PAVEL ŘEHULKA^a, GÜNTER ALLMAIER^b
a JOSEF CHMELÍK^{a,c}

^aÚstav analytické chemie AV ČR, Veveří 97, 611 42 Brno,
^bTechnická univerzita, Getreidemarkt 9/164, A-1060, Vídeň, Rakousko, ^cVýzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele, Ústav analytické chemie AV ČR, Veveří 97, 611 42 Brno
rehulka@iach.cz, guenter.allmaier@tuwien.ac.at,
chmelik@iach.cz

Došlo 12.9.05, přijato 11.12.05.

Klíčová slova: nespecifické peptidy, proteiny, proteomika, ječmen, MALDI-TOF/TOF

Úvod

Proteomická identifikace nízkomolekulárních proteinů pomocí tradičního přístupu je komplikována několika skutečnostmi. Rozlišení těchto proteinů separovaných gelovou elektroforézou je obecně malé, což má za následek společnou migraci více složek proteinové směsi, které mají podobnou molekulovou hmotnost. Tyto proteiny se pak ve výsledném jednorozměrném (1-D) gelu vyskytují na stejném místě. Dalším problémem identifikace malých proteinů kombinací enzymového štěpení a hmotnostní spektrometrie (MS) je skutečnost, že tyto proteiny zpravidla poskytují pouze několik specifických peptidů – obzvláště v případě, je-li štěpení provedeno přímo v gelu a při malých množstvích vzorku¹. Výsledné hmotnostní spektrum směsi obsahuje nejen signály peptidů z identifikovaného proteinu, dalších proteinů přítomných ve vzorku, ale také autolyzátů štěpícího enzymu, peptidů keratinů, nespecifických peptidů a jiných příměsí (např. matricových klastrů při analýze metodou MALDI-TOF MS, cit.²). Za této situace analyzované proteiny zpravidla nelze identifikovat pomocí často používané metody „peptide mass fingerprinting“ (PMF), která využívá měření relativní molekulové hmotnosti peptidů a porovnání experimentálních dat s údaji v databázích proteinů^{3,4}.

Vzhledem ke složitosti peptidové směsi v enzymovém digestu nestačí malý počet specifických peptidů k jednoznačné identifikaci proteinu. Mimo tyto specifické peptidy (odpovídající očekávanému štěpení daným enzymem) však rovněž i některé další složky směsi pocházejí

z hledaného proteinu a mohly vzniknout při přípravě vzorku buď působením chemikálií nebo neobvyklou aktivitou proteolytického enzymu.

Specifické peptidy uvolněné působením trypsinu mají na *N*-konci jakoukoli aminokyselinu s výjimkou prolinu (nejedná-li se o *N*-koncový peptid) a na *C*-konci lysin nebo arginin (s výjimkou jakékoli aminokyseliny na *C*-konci proteinu). Aminokyselinou předcházející *N*-konci jakékoli tryptického peptidu (s výjimkou *N*-konce proteinu) v sekvenci proteinu je buď lysin nebo arginin. Ostatní peptidy pocházející ze stejného proteinu nazýváme nespecifické, které se nehodí k identifikaci pomocí PMF, ale mají uplatnění v metodách využívajících fragmentace peptidů pro stanovení sekvence, která je podkladem pro databázovou identifikaci. To znamená, že nespecifické peptidy, které při PMF představují vážný problém, lze úspěšně využít pro identifikaci proteinů cestou fragmentačních technik. Kombinace kapalínové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) na bázi ionizace elektrosprejem⁵ nebo MALDI-TOF MS doplněná technikou „post-source decay (PSD)“⁶ byly úspěšně využity pro identifikaci proteinů pomocí nespecifických peptidů^{5,6}.

Podrobná analýza proteomu ječmene je důležitá pro jeho efektivní využití v zemědělství, potravinářském průmyslu a zejména v pivovarnictví. Získané poznatky pomohou pochopit jeho biologické a technologické vlastnosti (odolnost vůči suchu, schopnost enzymového odbourávání škrobu, kvalitu pěny atd.).

První identifikace ječných proteinů pomocí 1-D gelové elektroforézy a MS publikovali Chmelík a spol.⁷ Pro zjednodušení směsi proteinů extrahovaných z ječných obiliek byl využit Osbornův systém rozpouštědel⁸, který tyto proteiny rozděluje do čtyř skupin: vodou extrahovatelné albuminy, globuliny extrahovatelné roztokem NaCl, hordeiny rozpustné ve vodných roztocích alkoholů a gluteliny extrahovatelné roztokem NaOH. Tento způsob extrakce zjednodušil směsi proteinů do té míry, že pro jejich další separaci nebylo nutné použít dvourozměrnou (2-D) gelovou elektroforézu. Vhodnou alternativou k elektroforéze jsou chromatografické metody, z nichž byla úspěšně využita pro separaci proteinů např. gelová chromatografie⁹, která obdobně jako výše uvedené elektroforetické metody separuje proteiny podle jejich velikosti. 2-D elektroforéza byla ale nezastupitelná, pokud proběhla extrakce proteinů jediným pufrům¹⁰. Větší rozlišení 2-D elektroforézy umožňuje rozdělit i velmi podobné proteiny, což v případě, že je rozdílná migrace způsobena posttranslačními modifikacemi, vede k tomu, že jeden a ten samý protein je identifikován na různých místech gelu. Rozlišení jednotlivých forem vyžaduje nalezení a charakterizaci modifikovaných peptidů, což je mnohem obtížnější než identifikace proteinu a v podstatě neproveditelné pomocí PMF (cit.¹¹). V případě selhání PMF je nutné využití fragmentace peptidů tandemovou hmotnostní spektrometrií. Je-li k dispozici vhodně vybavený hmotnostní spektrometr např. MALDI-TOF/TOF, lze MS/MS experiment provést se stejným vzorkem, který byl původně použit pro PMF analýzu¹².

Jednou z vhodných technik fragmentace peptidů je PSD. Tato technika je dostatečně citlivá a ve spojení s „curved-field“ reflektorem (CFR)¹³, který fokusuje současně všechny fragmentové ionty, i rychlá. Její nevýhodou je tvorba různých interních fragmentů, což částečně komplikuje interpretaci hmotnostního spektra, ve kterém se nejvíce vyskytují a-, b- a y-ionty, čímž se PSD podobá nízkooenergetické kolizně indukované disociaci. V případě tryptických peptidů je nevýhodou lokalizace mobilního protonu na bazických aminokyselinách (Lys a Arg), což snižuje účinnost fragmentace a vede k nízkému pokrytí sekvence peptidů¹⁴. K získání vhodných peptidů lze použít řady méně specifických enzymů např. chymotrypsinu, jehož výhodou je, že je aktivní za stejných podmínek jako trypsin¹⁵.

Cílem této práce bylo identifikovat nízkomolekulární proteiny extrahované z obílek ječmene MS/MS analýzou s využitím nespecifických peptidů.

Experimentální část

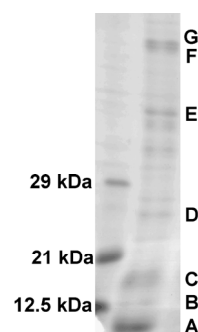
Jako vzorek pro tuto studii byla vybrána odrůda ječmene (*Hordeum vulgare* L.) Monaco. Rozemletá ječná zrna (1 g) byla extrahována 10 ml deionizované vody po dobu 20 min za stálého třepání. Směs byla centrifugována 15 min při 7000 g. Supernatant (vodný extrakt) byl smíchán se vzorkovým pufrům pro gelovou elektroforézu (tj. 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 12% glycerol, 2% β -merkaptoethanol, 0,01% bromfenolová modř) v objemovém poměru 1:1. Tato směs byla povařena 5 min na vodní lázni a alikvot (20 μ l) byl aplikován na diskontinuální 1-D polyakrylamidový gel (6% koncentrační gel, 20% separační gel, velikost 150 mm \times 150 mm \times 1 mm). Vizualizace proteinů byla provedena pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. Fixace proběhla ve směsi 45,4% methanol / 4,6% octová kyselina / 50% deionizovaná voda (1 h), barvení ve směsi 45,4% methanol / 4,6% octová kyselina / 49,9% deionizovaná voda / 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (1 h) a odbarvení pozadí gelu bylo dosaženo ve směsi 5% methanol / 7,5% octová kyselina / 87,5% deionizovaná voda (24 h). Po omytí gelu v deionizované vodě (2 \times ; 10 min) byly vyřezány obarvené proužky gelu. Proteiny v nich obsažené byly přímo v gelu redukovány, alkylovány a enzymově štěpeny pomocí trypsinu¹⁶. Ječné proteiny v gelu byly štěpeny se specifickým hovězím trypsinem (Trypsin sequencing grade, Roche, Mannheim, SRN), kdežto v případě analýzy extraktu β -amylasy z ječmene (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN) byl použit trypsin s vysokou nespecifickou štěpnou aktivitou (Lachema, Brno, ČR).

MALDI-TOF hmotnostní spektra byla měřena pomocí Kompact MALDI SEQ a AXIMA CFR přístrojů (Shimadzu Biotech Kratos Analytical, Manchester, UK). Oba přístroje jsou vybaveny dusíkovým laserem ($\lambda=337$ nm, 3 ns délka pulsu). Urychlovací napětí bylo 20 kV a data byla naměřena za použití „time-delayed“

extrakce v reflektromovém módu. Oba přístroje jsou vybaveny reflektorem CFR umožňujícím současnou fokusaci všech fragmentů v PSD analýze. Šířka iontové brány (při analýze s AXIMA CFR přístrojem) byla nastavena na ± 10 Th pro výběr prekurzorového iontu. Pro získání celkového spektra bylo v MS módu akumulováno 100 spekter a v PSD módu 1000 spekter. Všechna MALDI spektra byla vyhlazena pomocí algoritmu Savitzky-Golay dodaného výrobcem a kalibrována interně (PMF experimenty) nebo externě (PSD měření). MALDI-TOF/TOF MS měření byla provedena na přístroji 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) vybaveném Nd:YAG laserem ($\lambda=355$ nm, 500 ps šířka pulsu). Při MS/MS analýze byl jako kolizní plyn použit vzduch.

Vzorek byl nanášen na matici technikou thin-layer. Nasycený roztok kyseliny 4-hydroxy- α -kyanoskořicové (Sigma-Aldrich) v acetonu byl smíchán s roztokem nitrocelulosity (10 mg ml⁻¹, aceton:isopropanol = 1:1, v/v) v objemovém poměru 4:1 a 0,5 μ l této směsi bylo nanášeno na MALDI terčík. Lyofilizované extrakty byly rozpuštěny v 20 μ l 1% kyseliny trifluoroctové, přečištěny pomocí ZipTip C₁₈ špiček (Millipore, Framingham, MA, USA) a eluovány přímo (asi 1 μ l eluentu) na suchou vrstvou matrice.

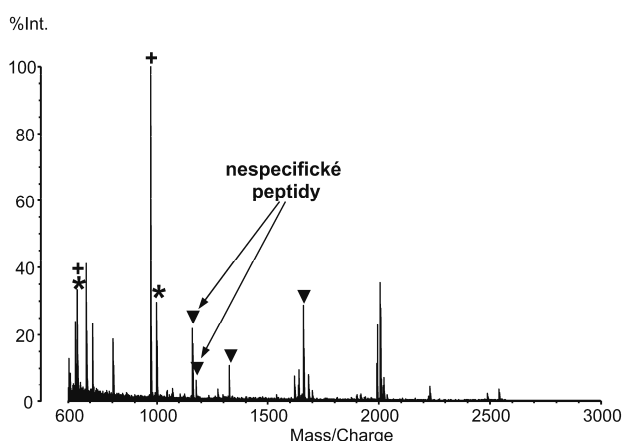
Naměřená data byla interpretována programy v internetovém souboru Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>). Program MS-Fit byl použit pro vyhodnocení PMF experimentů, programy MS-Tag a MS-Pattern byly použity pro vyhodnocování PSD experimentů. K vyhledávání posloužily databáze SwissProt a NCBI GenBank.



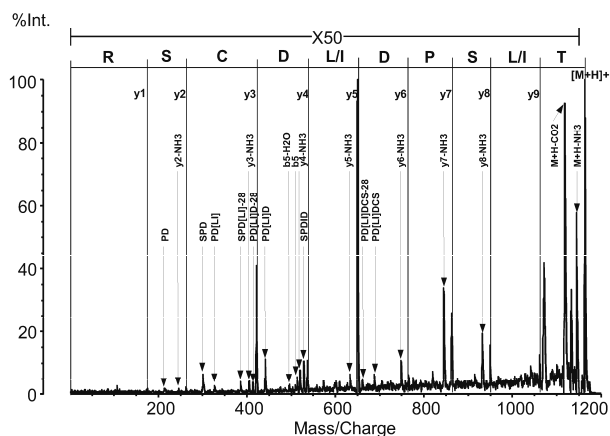
Obr. 1. 1-D SDS-PAGE elektroferogram směsi proteinů ječmene rozpustných ve vodě; označené proužky obsahují následující identifikované proteiny: A – subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1A, subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B, prekurzor nespecifického lipid-transfer proteinu 1; B – trypsin/amylasa inhibitor pUP13; C – alfa-amylasa/trypsin inhibitor CMd prekurzor, alfa-amylasa inhibitor BMAI-1 prekurzor; D – cytosolová triosofosfát isomerasa (TIM); E – glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa, cytosolový protein Z (Z4) (hlavní endospermový albumin); F – beta-glukosidasa BGQ60 prekurzor; G – beta-amylasa

Výsledky a diskuse

Extrahované proteiny z obilky ječmene byly separovány 1-D gelovou elektroforézou (obr. 1). Zatímco vybrané proteiny o vyšší molekulové hmotnosti byly identifikovány metodou PMF, v případě nízkomolekulárních proteinů z proužku A tato metoda nebyla úspěšná. Hmotnostní spektrum peptidů získaných trypsinovým štěpením proteinů obsažených v proužku A je znázorněno na obr. 2. Několik peptidů z této směsi bylo fragmentováno tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Interpretace PSD



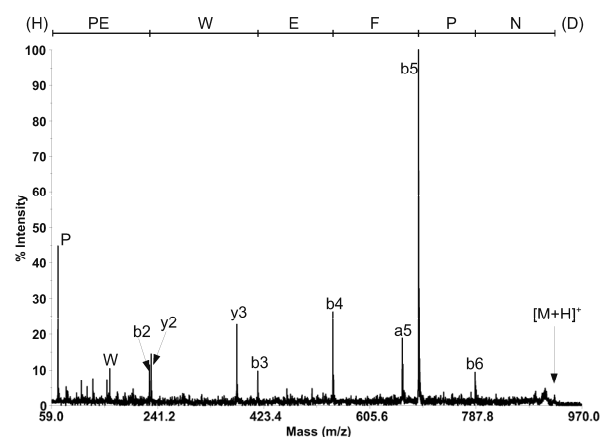
Obr. 2. MALDI-TOF hmotnostní spektrum in-gel digestu z proužku A v pozitivním reflexionovém módu; + označuje peptidy ze subtilisin-chymotrypsin inhibitoru CI-1A, * označuje peptidy ze subtilisin-chymotrypsin inhibitoru CI-1B a ▼ – označuje obecné peptidy z prekursoru nespecifického lipid-transfer proteinu 1. Z nich peptidy označené šipkou jsou nespecifické peptidy z prekursoru nespecifického lipid-transfer proteinu 1



Obr. 3. PSD spektrum nespecifického peptidu (rodičovský iont $[M+H]^+$ o $m/z = 1163,54$) z prekursoru nespecifického lipid-transfer proteinu 1; primární struktura identifikovaného peptidu je zobrazena v horní části obrázku od C-konce směrem k N-konci (koresponduje s y-ionty přítomnými ve spektru)

spekter iontů s m/z 973,59 a 1001,66 Th poskytla krátké úseky peptidových sekvencí, které byly identifikovány pomocí MS-Pattern jako součásti dvou proteinů: subtilisin-chymotrypsin inhibitoru CI-1A (8882 Da, teoretický pI 5,24) a subtilisin-chymotrypsin inhibitoru CI-1B (8963 Da, teoretický pI 5,33). Z molekulových hmotností a isoelektrických bodů je zřejmé, že tyto dva proteiny by nebylo možné efektivně separovat ani při použití konvenčních gelů pro 2-D gelovou elektroforézu.

PSD analýza peptidu o m/z 1163,54 Th ukázala dostatečnou fragmentaci s kompletní sérií y-iontů, doplněnou některými b-ionty a množstvím interních peptidových fragmentů (obr. 3). To umožnilo jednoznačné určení sekvence tohoto peptidu (s výjimkou rozlišení leucinu a isoleucinu). Program MS-Pattern ale nenalezl žádný protein, v němž by se vyskytoval tryptický peptid této sekvence. Protože při analýze trypsinového digestu jiného extraktu z ječmene se nám podařilo identifikovat β -amylasu na základě fragmentace jejího nespecifického peptidu pomocí MALDI-TOF/TOF (viz obr. 4), byla specifita enzymu v programu MS-Pattern změněna z nastavení „Trypsin“ na „No enzyme“. Výsledkem byla jednoznačná identifikace prekursoru nespecifického lipid-transfer proteinu 1 (12,3 kDa). Stejný protein byl identifikován i při nastavení specifity enzymu na „Slymotrypsin FYWKR“, což odpovídá pomyslnému spojení enzymových aktivit trypsinu a chymotrypsinu. Pomocí teoretického (in silico) štěpení identifikovaného proteinu směsí obou enzymů bylo zjištěno, že hmotnostní spektrum experimentálního digestu obsahuje ještě tři další peptidy, jejichž molekulové hmotnosti odpovídají peptidům identifikovaného proteinu (na obr. 2 jsou označeny ▼). Dva z nich odpovídají teoretickým produktům trypsinového štěpení, třetí odpovídá molekulové hmotnosti fragmentovaného nespecifického peptidu s cysteinem modifikovaným nezreagovaným akrylamidem z použitého gelu.



Obr. 4. MALDI-TOF/TOF fragmentační spektrum nespecifického peptidu (rodičovský iont $[M+H]^+$ o $m/z = 918,388$) z β -amylasy; primární struktura identifikovaného peptidu je zobrazena v horní části obrázku od N-konce směrem k C-konci (koresponduje s b-ionty přítomnými ve spektru); P a W označují imoniové ionty prolinu a tryptofanu

MARAQVLLMA AALVLMLTAA PRAAVALNCG QVDSKMKPCL TVVQGGPGPS
GECCNGVRDL HMQAQQSSGDR QTVCNCLKGI ARGIHNLNLN NAASTPSKCN
VNVVPTTISPD IDCSTIY

Obr. 5. Primární struktura prekurzoru nespecifického lipid-transfer proteinu 1 s vyznačeným signálním peptidem (přerušovaně podtržený), identifikovanými tryptickými peptidy (podtrženými jednoduchou čarou) a identifikovaným nespecifickým peptidem (dvojitě podtržený)

Molekulová hmotnost identifikovaného prekurzoru nespecifického lipid-transfer proteinu 1 (12,3 kDa), která byla získána z databáze SwissProt, neodpovídá nalezené poloze na gelu (přibližně 9 kDa). Z databáze vyplývá, že příslušná aminokyselinová sekvence obsahuje signální peptid v pozicích 1–26 (celá primární struktura tohoto proteinu je uvedena na obr. 5). Hmotnostní spektrum na obr. 2 neobsahuje žádné hodnoty m/z, které by odpovídaly signálnímu peptidu, což potvrzuje předpoklad, že nativní protein postrádá signální peptid. Molekulová hmotnost proteinu bez signálního peptidu (9,7 kDa) odpovídá pozorované poloze na gelu. Na obr. 4 jsou rovněž označeny identifikované peptidy. Pokrytí primární struktury (bez signálního peptidu) dvěma tryptickými peptidy je 31 %, zahrnutím nespecifického peptidu se pokrytí zvýší na 42 %.

Získané výsledky jasně ukazují význam MS/MS experimentů pro identifikaci proteinů a to zejména pokud jsou v nich zahrnuty nespecifické peptidy, které nelze využít u metody PMF¹⁷. Od roku 2006 se nejvýznamnější proteomické časopisy rozhodly nepublikovat až na výjimky identifikace proteinů založené pouze na PMF. Analýza nespecifických peptidů je velmi významná zejména v případě nízkomolekulárních proteinů, jejichž enzymovým štěpením vzniká relativně málo specifických peptidů, což výrazně snižuje úspěšnost PMF. Efektivní fragmentace nespecifických peptidů rovněž zvyšuje pokrytí analyzované primární struktury, což je velmi důležité v případě studia biologických vlastností proteinů. Zatímco použití specificky štěpících enzymů¹⁸ je esenciálním předpokladem pro identifikaci proteinů pomocí PMF metody, v případě využití tandemové hmotnostní spektrometrie (např. techniky MALDI-TOF/TOF) přináší použití méně specifických enzymů další výhody při identifikaci a strukturní analýze proteinů¹⁹.

Tato práce byla podpořena prostředky Centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele, IM6215648902 (MŠMT).

LITERATURA

1. Mattow J., Jungblut P. R., Müller E. C., Kaufmann S. H. E.: *Proteomics* 1, 494 (2001).
2. Karty J. A., Ireland M. M. E., Brun Y. V., Reilly J. P.: *J. Chromatogr.*, B 782, 363 (2002).
3. Joubert-Caron R., Le Caër J. P., Montandon F., Poirier F., Pontet M., Imam N., Feuillard J., Bladier D., Rossier J., Caron M.: *Electrophoresis* 21, 2566 (2000).
4. Lim H., Eng J., Yates J. R., Tollaksen S. L., Giometti C. S., Holden J. F., Adams M. W. W., Reich C. I., Olsen G. J., Hays L. G.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 957 (2003).
5. König S., Zeller M., Peter-Katalinic J., Roth J., Sorg C., Vogl T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 1180 (2001).
6. Řehulka P., Chmelík J., Allmaier G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 79 (2005).
7. Chmelík J., Řehulka P., Mayrhofer C., Allmaier G.: *Kvasný Průmysl* 47, 159 (2001).
8. Chmelík J., Řehulka P., Střelcová M., Kubáň V., Mayrhofer C., Allmaier G.: *Rostl. Výroba* 48, 261 (2002).
9. Šalplachta J., Řehulka P., Chmelík J.: *J. Mass Spectrom.* 39, 1395 (2004).
10. Finnie C., Melchior S., Roepstorff P., Svensson B.: *Plant Physiol.* 129, 1308 (2002).
11. Henzel W. J., Billeci T. M., Stults J. T., Wong S. C., Grimley C., Watanabe C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5011 (1993).
12. Medzihradsky K. F., Campbell J. M., Baldwin M. A., Falick A. M., Juhasz P., Vestal M. L., Burlingame A. L.: *Anal. Chem.* 72, 552 (2000).
13. Cornish T. J., Cotter R. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7, 1037 (1993).
14. Kinter M., Sherman N. E.: *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, str. 79. John Wiley & Sons, New York 2000.
15. Šalplachta J., Marchetti M., Chmelík J., Allmaier G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 2725 (2005).
16. Jensen O. N., Wilm M., Shevchenko A., Mann M., v knize: *2-D Proteome Analysis Protocols* (Link A. J., ed.), kap. 52. Humana Press, Totowa 1999.
17. Chmelík J.: *Chem. Listy* 99, 883 (2005).
18. Stosová T., Havliš J., Lenobel R., Šebela M.: *Chem. Listy* 99, 896 (2005).
19. MacCoss M. J., McDonald W. H., Saraf A., Sadygov R., Clark J. M., Tasto J. J., Gould K. L., Wolters D., Washburn M., Weiss A., Clark J. I., Yates J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7900 (2002).

P. Řehulka^a, G. Allmaier^b, and J. Chmelík^c
(^a *Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic,* ^b *Vienna University of Technology, Vienna, Austria,* ^c *Research Centre for Study of Extractives from Barley and Hop, Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic*): **The Use of Non-specific Peptides for Proteomic Identification of Low-Molecular-Weight Proteins from Barley by MALDI-TOF Mass Spectrometry**

Nonspecific peptides were analyzed for proteomic identification of low-molecular-weight barley proteins either by MALDI-TOF mass spectrometry involving post-source decay analysis or using a MALDI-TOF/TOF instrument. Identification of low-molecular-weight barley proteins was successfully accomplished by MS/MS analysis of both tryptic and nonspecific peptides in the cases where peptide mass fingerprinting failed. Utilization of nonspecific peptides also increased protein sequence coverage in database searching.

**ANALYTICKÁ LABORATOŘ NABÍZÍ K PRODEJI GAMMA RAY SPECTROMETR
miniSPEC GR-130 (PŘÍSTROJ NA MĚŘENÍ RADIACE),
CENA DOHODOU.**

Bližší informace u vedoucí laboratoře - tel. 555 530 361,
e-mail: eliska.vybiralova@macco.cz

POSOUZENÍ KLINICKÉ RELEVANCE HODNOTY SÉROVÉ KONCENTRACE ADIPOCYTÁRNÍHO PROTEINU VÁZAJÍCÍHO MASTNÉ KYSELINY U PACIENTŮ S DIAGNÓZOU METABOLICKÉHO SYNDROMU NOVOU METODOU ELISA

DAVID STEJSKAL^a, MICHAL KARPIŠEK^b
a PETER KOLLÁR^b

^a Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk,

^b Oddělení humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

david.stejskal@quick.cz, michal.karpisek@email.cz,
kollar@vfu.cz

Došlo 16.1.06, přijato 30.3.06.

Klíčová slova: ELISA, metabolický syndrom

Úvod

Adipocytární protein vázající mastné kyseliny (A-FABP, synonymum ALBP, gen FABP4) je protein o velikosti 14,4 kDa, který je členem rodiny FABP proteinů, schopných vázat mastné kyseliny a eikosanoidy. A-FABP byl lokalizován v cytosolu zralých adipocytů a makrofágů a je považován za regulátor produkce zánětlivých cytokinů a regulátor akumulace esterů cholesterolu¹.

Bylo prokázáno, že A-FABP má význam pro transport mastných kyselin a zároveň ovlivňuje jejich účinek v buňkách. A-FABP se účastní transportu lipidových látek v krevním oběhu a může tak ovlivňovat insulinovou senzitivitu a energetický metabolismus. V tomto kontextu je zajímavé, že exprese genu FABP4 v makrofázích může být indukována oxidovaným LDL cholesterolem a snížena podáváním některých hypolipidemik (statinů)³, které inhibují syntézu cholesterolu. Experimentálně bylo také zjištěno, že koncentrace A-FABP je u lidí pozitivně asociována s přítomností obezity⁴. Přesná úloha A-FABP v metabolickém syndromu, především signální dráhy působení A-FABP, jsou však zatím nejasné.

V současné době byla provedena řada studií, ve kterých byla hodnocena hladina exprese genu FABP4, nicméně nebyla k dispozici žádná komerční souprava pro stanovení koncentrace proteinu A-FABP. V několika publika-

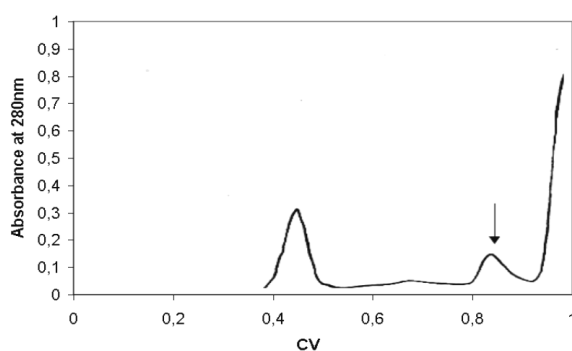
cích byl význam A-FABP posuzován pomocí zvířecích genetických modelů (myši modely, u kterých chyběl gen pro A-FABP), event. pomocí nespecifických testů založených na interakci A-FABP s jeho ligandy (mastnými kyselinami)^{5,6}. Naším cílem byl vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro specifické stanovení sérové koncentrace lidského A-FABP. Potřeba tohoto testu je podtržena faktem, že A-FABP se vyskytuje v krevním oběhu (na rozdíl od jiných látek produkovaných tukovou tkání) v poměrně vysokých koncentracích.

Experimentální část

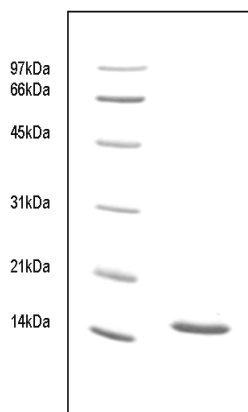
Příprava rekombinantního lidského A-FABP

Sekvence mRNA genu FABP4 byla získána z databáze RefSeq (Accession Number NM_001442); příslušná sekvence byla syntetizována a optimalizována pro *E.coli*. Syntetický gen byl klonován do restričních míst expresního vektoru pRSET (Invitrogen) a provedena transformace bakteriálního kmene *E.coli* BL21DE3. Kultivace produkčního kmene byla provedena při teplotě 37 °C a indukce exprese rekombinantního proteinu byla provedena pomocí isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG, Sigma). Po rozbití produkční kultury ultrazvukem byl ze supernatantu izolován gelovou chromatografií rekombinantní A-FABP (obr. 1).

Protein byl dialyzován do prostředí 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,2), čistota proteinu analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (12% homogenní gel, SDS PAGE) (obr. 2) a koncentrace bílkoviny stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma, katalogové číslo BCA1-1KT).



Obr. 1. Izolace rekombinantního lidského A-FABP gelovou chromatografií (GFC) Superdex 200 firmy Amersham Bioscience naplněný v koloně Pharmacia XK26/60; ekvilibrační roztok: 0,1 M-NaH₂PO₄, 0,3 M-NaCl, pH 7,2, průtoková rychlost 1 ml min⁻¹, nástřik 3 ml, retenční čas pro rekombinantní lidský A-FABP odpovídal 0,85 CV (objemu kolony) – příslušný pík je v obrázku označen šipkou



Obr. 2. Čistota proteinu byla ověřena elektroforézou (12% homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard připravený z proteinů o velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa a v pravé dráze je izolovaný rekombinantní lidský A-FABP. Čistota proteinu je větší než 98 %

Příprava specifických protilátek proti lidskému A-FABP

Byla připravena králičí a kozí protilátka podle imunizačního schématu: dávka vždy 1 mg proteinu pro imunizaci kozy a 0,1 mg proteinu pro imunizaci králíka; první dávka byla v kompletním Freundově adjuvans a následně 3 dávky v inkompletním Freundově adjuvans, jednotlivě imunizace byly prováděny v 30denních intervalech. Z připraveného antiséra byla izolována specifická protilátka imunoafinitní chromatografií na koloně s imobilizovaným rekombinantním A-FABP, imunosorbent byl připraven podle návodu od výrobce (POROS-AL, Applied Biosystems, katalogové číslo 1-6022-24). Čistota protilátek byla analyzována opět elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (10% homogenní gel, SDS PAGE) a v obou případech byla větší než 97 %; koncentrace bílkoviny byla stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou. Alikvot králičí i kozí specifické protilátky byl navíc značen modifikovaným biotinem (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce, katalogové číslo 21338) podle návodu od výrobce.

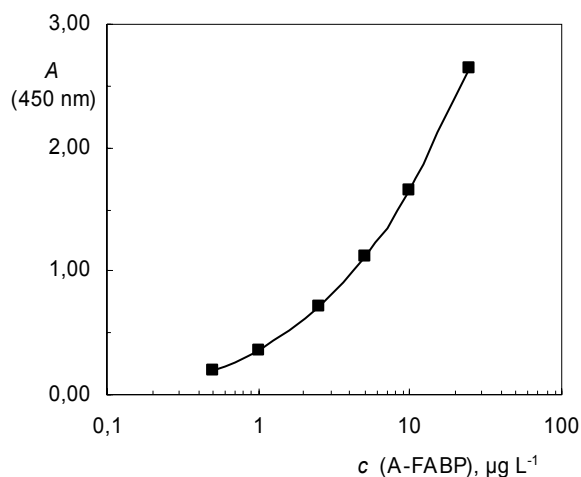
Vývoj sandwich ELISA testu pro stanovení A-FABP v lidském séru

Hodnoty sérové ani tkáňové koncentrace A-FABP nebyly známy, proto jsme se zaměřili na vývoj sandwich ELISA testu, který představuje při použití biotinem značené detekční protilátky vysoce citlivou a specifickou metodu.

V mikrotitrační desce (Corning Costar, High Binding, katalogové číslo 52-00-02) bylo vázáno 0,4 μg protilátky/

jamku v 0,1 M karbonátovém pufru pH 9,0 (inkubace 12 h při 4 °C) a po odsátí vazného roztoku bylo do desky dávkováno 0,2 ml/jamku roztoku TBS (0,05 M-Tris, 0,15 M-NaCl, pH 7,2), 0,5 % BSA (hovězí sérový albumin), 4% sacharosa a deska inkubována 30 min při laboratorní teplotě pro zablokování nevyužitých vazebných míst na povrchu jamky. Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 10 \times ředěného sérového vzorku (všechna měření byla prováděna 2 \times) a následně byla deska inkubována 1 h při laboratorní teplotě. Po 3násobném promytí desky promývacím roztokem (TBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,2) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené specifické protilátky (0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a deska opět inkubována 1 h při laboratorní teplotě. Po 3násobném promytí desky bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenová peroxidasa (Roche, katalogové číslo 1 089 153) naředěného 40 000 \times a deska inkubována 1 h při pokojové teplotě. Po 3násobném promytí desky promývacím roztokem bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 0,1 M- H_2SO_4 a vzniklé žluté zbarvení (produkt) bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm. Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Hodnoty A-FABP v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 3), která byla získána vynesením absorbančí standardů oproti jejich známé koncentraci.

Ředícím roztokem pro standardy, vzorky, biotinem značenou protilátku a konjugát streptavidin-křenová peroxidasa byl roztok TBS, 0,2 % BSA, 0,01 % thimerosal. V testu byla použita sada standardů 25; 10; 5;



Obr. 3. Standardní křivka A-FABP ELISA

2,5; 1 a 0,25 $\mu\text{g l}^{-1}$, připravená naředěním rekombinantního lidského A-FABP. Sérové vzorky byly ředěny 10 \times podle schématu 1 díl vzorku + 9 dílů ředícího roztoku.

Popsaným způsobem byly testovány všechny kombinace, které plynou z možnosti použití králičí a kozí specifické protilátky v sandwich ELISA testu (data nejsou prezentována). Všechny kombinace poskytly srovnatelné výsledky, proto byla vybrána ekonomicky nejvýhodnější varianta, která navíc minimalizuje riziko případné křížové reaktivity: na desku byla vázána kozí specifická protilátka a pro detekci byla používána biotinem značená králičí specifická protilátka.

Klinické testování testu ELISA

Bylo vyšetřeno 67 neobézních osob bez známek metabolického syndromu a 71 jedinců s metabolickým syndromem. U všech byly vyhodnoceny základní antropologické údaje (BMI – Body Mass Index), změřena hodnota krevního tlaku, v séru byly stanoveny koncentrace insulinu, cholesterolu, HDL cholesterolu, LDL cholesterolu, triacylglycerolů, glukosy, kyseliny močové, adiponektinu a A-FABP. Z hodnot koncentrace insulinu a glukosy byl vypočten index Quicki².

Výsledky a diskuse

Funkční charakteristika testu ELISA

Test ELISA měřil také rekombinantní A-FABP pořízený z nezávislého zdroje (Abnova) a naopak neměřil rekombinantní proteiny E-FABP (epiteliální isoforma FABP, Biovendor), H-FABP (srdeční isoforma FABP, Hytest), I-FABP (intestinální isoforma FABP, R&D Systems) a L-FABP (jaterní isoforma FABP, Abnova), leptin (Biovendor), receptor leptinu (RDI), adiponektin (Biovendor), resistin (Biovendor), CRP (Biovendor) a interleukin-6 (DPC). V testu ELISA nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita v sérech následujících zvířat: králik, koza, ovce, prase, myš, kůň, křeček, slepice, tur a krysa. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský A-FABP.

Pro ověření funkčnosti A-FABP ELISA byla testována také správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace A-FABP. Sérové vzorky od 2 pacientů byly obohaceny o +10, +20 a +30 $\mu\text{g A-FABP l}^{-1}$. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 88,8 %. V testu linearitě byly testovány další 2 sérové vzorky, které byly sériově ředěny 10 \times , 20 \times , 40 \times a 80 \times , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 107,1 %.

Přesnost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků u 3 sérových vzorků a vyjádřena jako variační koeficient v sérii (n=8) i reprodukovatelnost mezi sériemi měření (n=3). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla

ve všech případech < 7 %.

Mez stanovitelnosti metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci A-FABP, byla 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$ (tato hodnota je vyjádřením koncentrace A-FABP, odpovídající absorpční vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorpance slepého vzorku (n=8) + 3 \times směrodatná odchylka průměru slepého vzorku). Mez detekce (CV < 10 %), byla 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ (vzorky s hodnotami A-FABP vyššími měly hodnoty CV < 10 %).

Klinické testování testu ELISA

Při klinickém testování stanovení A-FABP bylo zjištěno, že osoby s metabolickým syndromem měly vyšší hodnoty A-FABP než osoby bez něj (mediány 42,4 vs 23,7 $\mu\text{g l}^{-1}$; $P < 0,01$) a hodnoty A-FABP korelovaly s insulinem ($r = 0,34$, $P < 0,01$), glukózou ($r = 0,21$, $P < 0,01$), triglyceridy ($r = 0,4$; $P < 0,01$), BMI ($r = 0,57$; $P < 0,01$), HDL ($r = -0,32$; $P < 0,01$) a Quicki ($r = -0,23$; $P < 0,01$). Rozdíly mezi pacienty s metabolickým syndromem a bez něj přetrvávaly i po korekci koncentrace A-FABP na hodnoty indexu Quicki nebo antropologická data (Body Mass Index – BMI) a difference zůstávaly statisticky významné ($P < 0,01$).

V naší studii byl potvrzen předpoklad, že pacienti s metabolickým syndromem mají vyšší hodnoty A-FABP než osoby bez něj; tyto změny jsou nezávislé na tělesné konstituci, hodnotách glykémie či insulinémie. První výsledky tedy podporují nedávno publikovanou hypotézu, že A-FABP by mohl být nezávislým ukazatelem metabolického syndromu.

Závěr

Byla navržena a validována diagnostická souprava (ELISA) na stanovení sérové koncentrace A-FABP. Základní analytické charakteristiky testu splňují podmínky pro použití v laboratořích klinické biochemie a navíc v současné době byla ukončena externí validace pro získání CE značky (IVD).

LITERATURA

- Xu A., Wang Y., Xu Y. J., Stejskal D., Tam S., Zhang J., Wat N. M. S., Wong W. K., Lam K. S. L.: Clin. Chem., v tisku.
- Damcott C. M., Moffett S. P., Feingold E., Barmada M. M., Marshall J. A., Hamman R. F., Ferrell R. E.: Metabolism 53, 303 (2004).
- Llaverias G., Noe V., Penuelas S., Vazquez-Carrera M., Sanchez R. M., Laguna J. C., Ciudad C. J., Alegret M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 318, 265 (2004).
- Yokoyama H., Emoto M., Fujiwara S.: Diabetes Care 26, 2426 (2003).

5. Scheja L., Makowski L., Uysal K. T., Wiesbrock S. M., Shimshek D. R., Meyers D. S., Morgan M., Parker R. A., Hotamisligil G. S.: *Diabetes* 48, 1987 (1999).
6. Maeda K., Cao H., Kono K., Gorgun C. Z., Furuhashi M., Uysal K. T., Cao Q., Atsumi G., Malone H., Krishnan B., Minokoshi Y., Kahn B. B., Parker R. A., Hotamisligil G. S.: *Cell Metabolism* 1, 107 (2005).

D. Stejskal^a, M. Karpíšek^b, and P. Kollár^b
(^a*Department of Laboratory Medicine, Hospital, Šternberk*, ^b*Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Assessment by a New ELISA Method of Clinical Relevance of Serum Concentration of Adipocyte Fatty Acid Binding Protein in Patients with Metabolic Syndrome Diagnosis**

Development, composition, validation and clinical relevance of the first ELISA method for measurement of adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) concentration in serum is presented. First results of clinical testing confirm the hypothesis on the possible use of A-FABP as a marker of metabolic syndrome.

Proděkan chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze

**upozorňuje na přijímací řízení do magisterského studia
v následujících oborech:**

**analytická chemie, anorganická chemie, biofyzikální chemie, biochemie,
fyzikální chemie, jaderná chemie, makromolekulární chemie,
modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, organická chemie,
učitelství chemie pro střední školy jednooborové a dvouoborové,
klinická a toxikologická analýza.**

Studium bude zahájeno 1. 10. 2007. Podmínkou přijetí je absolvování bakalářského studia. Přihlášky a podrobné informace jsou na adrese: PŘF UK, studijní oddělení, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel. 221 951 162, 221 951 163. Přihlášky se přijímají do 28. 2. 2007.

**Další informace o chemických katedrách na PŘF UK v Praze lze nalézt na
www.natur.cuni.cz**

RECENZE

Klaus-Michael Debatin, Simone Fulda,
(ed.)

**Apoptosis and Cancer Therapy: From Cutting-edge
Science to Novel Therapeutic Concepts,**
2 Volumes

Vydal Wiley-VCH, Weinheim 2006, Vol. 1 – 668 stran.
ISBN: 3-527-31237-4

Apoptosa, neboli programovaná buněčná smrt je spojena s mnoha fyziologickými pochody. Porucha regulace apoptosy je spojována s mnoha typy závažných lidských onemocnění, jako jsou zhoubné nádory nebo některé autoimunitně podmíněné choroby. Od počátku devadesátých let přibývají nové informace o apoptose téměř exponenciálně, proto je 1. vydání této monografie významným přínosem pro orientaci v této oblasti. Kniha je rozdělena do deseti samostatných částí dělených dále do jednotlivých kapitol. Jednotlivé kapitoly pocházejí od různých autorů, z čehož plyne i mírně rozdílný jazyk a přístup k problematice (celkem 110 autorů). První část je podrobně věnována problematice povrchových buněčných receptorů, jejichž stimulace indukuje apoptosu (*angl.* death receptors). Podrobně je popsána funkce receptorů CD95, TRAIL, TNF-R a jejich role v procesu karcinogeneze a virové infekce. Čtenář v této kapitole také nalezne hodnotné informace o významu jednotlivých isoforem nově známého proteinu c-FLIP (negativní regulátor apoptosy). Druhá část je věnována roli mitochondrií a mitochondriálních faktorů v procesu apoptosy, zejména cytochromu *c*, proteinu HtrA2/OMI (serinová proteasa regulující mitochondriální homeostasi) a proteinu AIF (*angl.* apoptosis inducing factor). Ve třetí části je podrobně popsána funkce jednotlivých typů kaspas (proteasy) a jejich role v aktivaci apoptosomu (multiproteinový komplex vytvářený v průběhu „indukce“ apoptosy). Čtenář v této kapitole také nalezne informace o roli cytochromu *c*, proteinu Apaf-1 a dalších buněčných faktorů v procesu tvorby apoptosomu. Krátce jsou popsány také některé strategie, jak lze inhibovat funkci apoptosomu, což je potenciální způsob protinádorové terapie. Čtvrtá kapitola je zaměřena na vztah antiapoptotických a apoptotických proteinů (rodina proteinů Bcl-2) ke karcinogenezi. Kapitola je zaměřena na popis jejich doménového zastoupení a mechanismus, jakým způsobem regulují tvorbu apoptosomu a následně další fáze apoptosy. Zvláštní pozornost je věnována vztahu těchto proteinů k tumor supresorovému proteinu p53. Pátá kapitola shrnuje biologickou relevanci, funkci a regulaci exprese proteinových inhibitorů apoptosy (IAPs). Tyto proteiny, hrající významnou roli ve vzniku nádorového bujení a jeho progresu, jsou nadějným cílem některých navržených terapeutických léčiv. Autoři také popisují význam a funkci charakteristických domén pro IAPs - BIR (zinkový prst o délce 80 aminokyselin) a RING

(doména přítomná v některých typech E3 ubikvitinligas). V šesté kapitole s volně přeloženým názvem „dráhy pro přežití“ (survival pathways) je samostatně diskutován vztah apoptotických faktorů k rodině proteinů transkripčního faktoru NF- κ B, proteinkinase B resp. fosfoinositid-3-kinase, a signální kaskádě, ve které hrají centrální roli proteiny Ras (H-, N- a K-). Podle mého názoru představuje tato kapitola „integrální prvek knihy“, po jejímž přečtení čtenář nabude zcela správného dojmu, že je apoptosa globálním buněčným procesem, který je velmi jemně regulován na mnoha molekulárních úrovních. V sedmé kapitole je elegantně popsána role produktů nejméně významnějších onkogenů a tumor supresorových genů (proteiny Rb a p53 resp. p73) v regulaci apoptosy. Detailně je vysvětlena komplexita regulace apoptosy proteinem p53 (p53 aktivuje i inhibuje apoptosu, a to více nezávislými mechanismy). V osmé kapitole je uveden způsob regulace apoptosy vápníkovými kanály v cytoplasmatické membráně, endoplasmatickém retikulu a mitochondriích. V této souvislosti je popsána funkce a mechanismus funkce vybraných typů efektorů, které jsou přímo nebo nepřímo aktivovány ionty Ca^{2+} (endonukleasy, calcineurin, NO syntasa, fosfolipasy, atd.). Devátá kapitola je věnována současným poznatkům o změnách funkce a složení lysosomů v nádorových buňkách. V této kapitole je osvětlen mechanismus, jak lysosomální protein Hsp70 a jednotliví zástupci kathepsinů (lysosomální proteasy) ovlivňují nádorovou angiogenesi a invazivitu nádorových buněk. Toto jsou děje, které významně ovlivňují progresi nádorového bujení a v tomto duchu autoři popisují potenciální terapeutické přístupy zaměřené na indukci buněčné smrti zprostředkované lysosomy v nádorových buňkách, u kterých je tento děj většinou potlačen. Závěrečná, desátá kapitola je zaměřena na popis, jakým způsobem jsou v organismu rozpoznávány a likvidovány apoptotické buňky, čímž je zabraňováno zánětlivým a nekrotickým pochodům.

Kniha představuje úctyhodný zdroj podrobných informací o apoptose, které jsou zejména zaměřeny na vztah apoptosy k nádorovým onemocněním a jejich terapii. Kniha není v žádném případě zaměřena na elementární strukturní popis jednotlivých apoptotických faktorů a molekulárního mechanismu jejich účinku, což nebylo cílem autorů. Čtenář pravděpodobně ocení knihu i jako hodnotný zdroj enormního počtu úplných recentních citací. Na knize shledávám pouze jedinou „kosmetickou“ vadu, a to je název na hřbetní straně (apotosis místo apoptosis). Knihu bych nedoporučil úplným začátečníkům v oblasti biologických věd. Podle mého názoru obsahuje kniha s ohledem na obtížnost problematiky relativně malý počet ilustrací nutných pro počáteční abs-trakci popisované problematiky. Kniha je spíše určena pro onkology, „sečtělejší“ molekulární a buněčné biology, biochemiky, ale také pro vysokoškolské pedagogy, kterým kniha bude sloužit jako zdroj informací o nejnovějších trendech protinádorových terapií a oblasti výzkumu apoptosy.

Zdeněk Knejzlík

Koichi Asano

Mass Transfer*From Fundamentals to Modern Industrial Applications*

Vydal Wiley-VCH, Weinheim 2006, stran 275, €105.00 (pro Českou republiku).
ISBN 3-527-31460-1

Aplikace teorie přenosu hmoty nacházejí tradičně široké využití v chemickém průmyslu při návrhu nových procesů a optimalizaci stávajících technologií. Nověji se používají v biologických vědách a ochraně životního prostředí. Předkládaný text představuje zásadní dílo v tomto oboru, programově vycházející z již klasické knihy *Transport Phenomena* (autoři Bird R. B., Stewart W. E., Lightfoot E. N.) z roku 1960 a zaplňující již více než třicetiletou mezeru od vydání monografie *Mass Transfer* se stejným zaměřením (autoři Sherwood T. K., Pigford R. L.). Kniha je pojata jako učebnice a její jednotlivé partie se proto odvíjejí od základních aspektů studovaných jevů. Autor pak postupně přechází ke konkrétním praktickým úlohám, s primárním zřetelem na problematiku separace směsí. Důležité vzorce a korelační vztahy jsou uvedeny vždy spolu s předpoklady, za kterých byly odvozeny a z toho vyplývajícími omezeními pro jejich použití. V každé partii jsou uvedeny příklady usnadňující porozumění výkladu a ilustrující přístup využití teorie při řešení reálných aplikací.

Kniha se skládá z deseti kapitol. První tři kapitoly

jsou věnovány základním zákonitostem přenosu hmoty. Laminárnímu přenosu hmoty různého typu jsou věnovány další čtyři kapitoly, za nimi následuje partie turbulentních transportních jevů. Dále je diskutován přenos hmoty spojený s fázovou přeměnou. Závěrečná partie knihy představuje vyvrcholení inženýrské snahy, kdy principy uváděné v předchozích kapitolách jsou využity komplexně k novému modelu návrhu vicesložkové destilace na plněné koloně.

Při četbě knihy brzy zjistíte, že autor (emeritní profesor Tokyo Institute of Technology) je zkušený pedagog. Jeho výklad je sice stručný, ale jasný a dokumentovaný množstvím obrázků, grafů a tabulek. U čtenáře předpokládá vysokoškolské vzdělání technického směru, takže některé potřebné vztahy pouze sumarizuje (např. pro fázovou rovnováhu kapalina – pára), nebo předpokládá jejich znalost ze standardních vysokoškolských textů (matematika, fyzika, chemická termodynamika). V učebnici lze nalézt nástin řešení řady dílčích problémů (difuze, přenos hmoty v laminární vrstvě podél rovného povrchu či transport hmoty a tepla při laminárním toku trubkou, přenos hmoty bublinami a kapkami, transportní jevy při turbulentním toku, vypařování, kondenzace, vicesložková destilace), se kterými se v praxi procesní inženýr setkává.

Knihu je možno doporučit jako učebnici postgraduálního kurzu, ale i jako pomůcku klasickým chemickým inženýrům či výzkumným pracovníkům dostávajícím se do styku s problematikou přenosu hmoty.

Pavel Chuchvalec

LIBLICE 2006 – DODATKY

KVARTÉRNÍ AMONIOVÉ SOLI LUPANOVÝCH TRITERPENOIDŮ

**BIEDERMANN D.^a, ŠÁREK J.^a, HAJDÚCH M.^b
a SVOBODOVÁ X.^b**

^a Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43, Praha 2;
^b Laboratoř experimentální medicíny, Dětská a onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc; ^c I.Q.A., a.s. Jindřicha Plachty 16, 150 00 Praha 5 david.biedermann@gmail.com

Naše výzkumná skupina se již delší dobu věnuje výzkumu derivátů přírodních triterpenoidů lupanového a oleananového typu s významnou cytotoxickou aktivitou¹. V nedávno publikovaných pracích^{2,3} byly formulovány základní farmakofory a obecné vlastnosti derivátů, u kterého lze očekávat signifikantní cytotoxickou aktivitu. Další stěžejní publikace⁴ přinesla klíčové poznatky o molekulárním mechanismu účinku betulininů, přičemž jako primární cíl byl identifikován cytochrom C. V rámci studia cytotoxické aktivity vysoce hydrofilních triterpenoidních derivátů jsme se proto zaměřili též na přípravu kvartérních amoniových solí.

Kvartérní amoniové soli byly připraveny ve vysokých výtěžcích reakcí triterpenických halogenidů s příslušnými terciárními aminy. Získaná série 16 nových kvartérních solí je nyní předmětem testování *in vitro* cytotoxické aktivity proti nádorové linii CEM na pracovišti LEM. Struktury všech připravených látek byly potvrzeny spektrálními daty (NMR, IČ, MS).

Chemikálie a rozpouštědla byly financovány z grantu GA ČR 203/03D/152, derivatizační činidla a testování cytotoxické aktivity bylo financováno z grantu MPO FT-TA/027.

LITERATURA

- Šárek J., Klinot J., Bražinová S., Džubák P., Klinotová E., Nosková V., Křeček V., Kořínková G., Thomson J. O., Janošťáková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdúch M.: *J. Med. Chem.* 46, 5402 (2003).
- Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *Nat. Prod. Rep.* 23, 394 (2006).
- Urban M.: *Dizertační práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha, 2005.
- Dzubak P., Sarek J., Anzenbacher P., Masek V., Novak P., Havlicek V., Vydra D., Hajduch M.: submitted in PNAS.

DERIVATIZACE LUPANOVÝCH HYDROXY-
DERIVÁTŮ S ANTIVIRÁLNÍ A CYTOTOXICKOU
AKTIVITOU

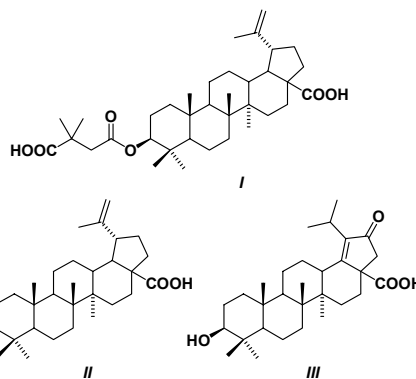
**T. KUBELKA^a, J. ŠÁREK^a, I. TIŠLEROVÁ^a,
M. HAJDÚCH^b a X. SVOBODOVÁ^c**

^a Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43, Praha;
^b Laboratoř experimentální medicíny, Dětská a onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20, Olomouc; ^c I.Q.A., a.s. Jindřicha Plachty 16, 150 00, Praha 5 haad@seznam.cz

V návaznosti na studium protinádorové aktivity terpenoidů¹ na našem pracovišti byl v nedávné době zahájen také výzkum anti-HIV aktivity triterpenoidních derivátů. Zaměřili jsme se zejména na přípravu terpenických hemiesterů typu **I**, u kterých je anti-HIV aktivita již známa^{2,3}.

Výchozími sloučeninami pro derivatizace byly kyselina betulinová **II** a 21-oxokyselina **III**, které jsou na našem pracovišti k dispozici v dostatečném množství⁴. Pro přípravu hemiesterů bylo využito acylační reakce pomocí anhydridů nižších dikyselin. Nenasycené produkty budou dále podrobeny oxidačním reakcím např. ozonizacím s cílem získat výše oxidované hydrofilní deriváty.

Připravené sloučeniny jsou nyní předmětem testů na *in vitro* anti-HIV a cytotoxickou aktivitu vůči nádorové linii CEM. Struktury všech připravených sloučenin byly jednoznačně potvrzeny spektrálními metodami.



Chemikálie a rozpouštědla byly financovány z grantu GA ČR 203/03D/152, derivatizační činidla byla financována z grantu MPO FT-TA/027.

LITERATURA

- Šárek J. et al.: *J. Med. Chem.* 46, 5402 (2003).
- Huang L. et al.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 2279 (2006).
- Robinson G. N. et al.: Novel betulin derivatives, preparation thereof and use. PCT Int. Patent Appl. WO 2006053255, 18 May 2006.
- Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO 0190136, 23 May 2001.

PŘÍPRAVA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH TRITERPENOIDŮ SYNTÉZOU C-C VAZEB

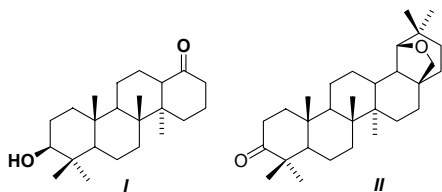
**L. MARKOVÁ^a, J. ŠÁREK^a, P. DŽUBÁK^b,
M. HAJDÚCH^b, I. TIŠLEROVÁ^a a M. SVOBODA^c**

^a Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43, Praha;
^b Laboratoř experimentální medicíny, Dětská a onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc;
^c I.Q.A., a.s., Jindřicha Plachty 16, 150 00, Praha 5
lmarko@email.cz

V rámci studia závislosti cytotoxické aktivity na struktuře derivátů, realizovaném na našem pracovišti¹, jsme otevřeli novou kapitolu – přípravu semisyntetických derivátů triterpenoidů syntézou C-C vazeb.

Jako výchozí materiál pro syntézy byly použity dobře dostupné terpenické ketony¹ (např. **I**, **II**), na které byly adovány různé nukleofily např. Grignardova činidla, trimethylsilylkyanid a acetylid lithný. Získané adiční produkty obsahují polární funkční skupiny a násobné vazby, které jsou prokázány farmakofory cytotoxické aktivity². Dále jsme ketony podrobili též Wittigově reakci a Pettersonově methylenaci, s cílem získat reaktivní sloučeniny s exocy-klickými dvojnými vazbami. U některých exomethylenových sloučenin byla navíc v minulosti nalezena vysoká cytotoxicita^{1–3}. Získané nenasyčené deriváty budou dále podrobeny oxidačním a degra-dačním reakcím, s cílem získat funkcionalizované hydrofilní deriváty.

Připravené sloučeniny, jsou nyní předmětem testování *in vitro* cytotoxické aktivity vůči nádorové linii T-lymfoblastické leukémie. Struktury všech připravených sloučenin byly jednoznačně potvrzeny spektrálními daty.



Testování cytotoxické aktivity, chemikálie a rozpouštědla byly financovány z grantu MPO FT-TA/027.

LITERATURA

- Šárek J. et al.: J. Med. Chem. 46, 5402 (2003).
- Mukherjee R. et al.: Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 6, 271 (2006).
- M. Hajduch, J. Šárek: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO0190046, 23 May 2001.

ŠTĚPENÍ DVOJNÝCH VAZEB TRITERPENOIDŮ A JEHO ANOMÁLIE

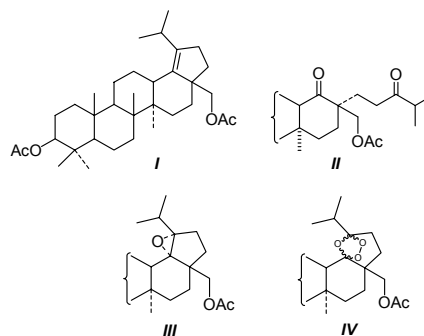
**J. ŠÁREK^a, O. ŠTĚPÁNEK^a, M. KVASNICA^a,
K. VRANKOVÁ^a, D. BIEDERMANN^a, L. MARKOVÁ^a,
M. VLK^a, P. SPÁČILOVÁ^a, T. KUBELKA^a,
X. SVOBODOVÁ^b a M. SVOBODA^b**

^a Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43, Praha;
^b I.Q.A., a.s. Jindřicha Plachty 16, 150 00 Praha 5
jan.sarek@gmail.com

Štěpení dvojných vazeb v přírodních látkách jako jsou terpenoidy nebo steroidy bývalo v minulosti doménou použití ozonu¹. Ozonolýza objevená roku 1840 Christianem Friedrichem Schönbeinem sloužila hlavně jako prostředek k určování chemické struktury komplikovaných přírodních látek¹. V současné době je štěpení dvojných vazeb v organických substrátech prováděno se syntetickými záměry a je možné pro něj využít i další alternativní činidla, např. oxid rutheničelý².

Naše práce se zaměřila na srovnání výsledků štěpení dvojných vazeb v nenasyčených lupanových derivátech (např. **I**) ozonolýzou s redukčním zpracováním dimethylsulfidem a *in situ* generovaným oxidem rutheničelým a testování cytotoxické aktivity získaných produktů. Bylo zjištěno, že výše oxidované nenasyčené deriváty jsou často vůči působení ozonu zcela inertní³, kdežto působením oxidu rutheničelého dochází k jejich „korektnímu“ štěpení². V některých případech byly ozonolýzou získány nečekané produkty, např. z olefinu **I** byl ozonolýzou místo očekávaného diketonu **II** získán epoxid **III** a stabilní ozonid **IV**.

Připravené sloučeniny jsou nyní předmětem testů na *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči nádorové linii CEM. Struktury všech připravených sloučenin byly jednoznačně potvrzeny spektrálními metodami.



Chemikálie a rozpouštědla byla financována z grantu MPO FT-TA/027.

LITERATURA

- Ruzicka L. et al.: Helv. Chim. Acta, 28, 1628 (1945).
- Šárek J. et al.: J. Med. Chem. 46, 5402 (2003).
- Štěpánek O.: Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.

PŘÍPRAVA GLYKALŮ A JEJICH VYUŽITÍ PŘI SYNTÉZE 2-DEOXYGLYKOSIDŮ LUPANOVÝCH TRITERPENOIDŮ

P. SPÁČILOVÁ^a, J. ŠAREK^a, I. TIŠLEROVÁ^a, X. SVOBODOVÁ^b a M. HAJDÚCH^c

^a Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43, Praha 2; ^b I.Q.A., a.s. Jindřicha Plachty 16, 150 00, Praha 5; ^c Laboratoř experimentální medicíny, Dětská a onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc pavla.spacilova@gmail.com

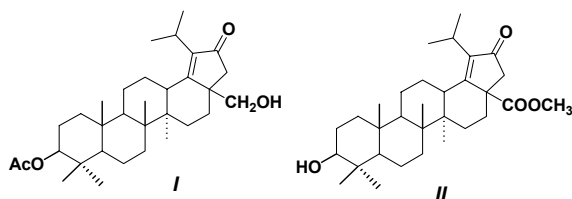
Betuliny, triterpenoidní sloučeniny připravené na našem pracovišti, prokázaly již v minulosti řadu zajímavých biologických účinků¹, především cytotoxických ($IC_{50} < 10 \mu\text{mol l}^{-1}$). V souvislosti s tímto výzkumem byly zjištěny ne zcela ideální farmakologické vlastnosti těchto derivátů. Především se jedná o rozpustnost v médiích založených na vodné bázi a s ní související orální dostupnost. Proto jsou v současnosti hledány takové modifikace účinných derivátů, které by vedly k výrazně lepším farmakologickým vlastnostem těchto derivátů.

Glykosidy jsou typickým příkladem přírodní prodrug. Navíc je z literatury² známo, že podávání 2-deoxyglukosy spolu s konvenčními cytostatiky (paclitaxel, adriamycin) vede k potenciaci cytotoxických účinků.

V rámci této práce byly připraveny acetylované 2-deoxyglukosidy a 2-deoxygalaktosidy adicí příslušných acetylovaných glykalů na triterpenoidní hydroxyderiváty – hydroxyketon **I** a methyl-ester **II**. Z těchto 2-deoxyglykosidů byly Zemplénovou deacetylací připraveny volné 2-deoxyglykosidy.³

Připravené sloučeniny jsou nyní předmětem testů na *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči nádorové linii CEM. Struktury všech nově připravených sloučenin byly potvrzeny spektrálními daty.

Chemikálie a rozpouštědla byla financována z grantu MPO FT-TA/027.



LITERATURA

- Šarek J. et al.: J. Med. Chem. 46, 5402 (2003).
- Maschek G. et al.: Cancer Res. 64, 31 (2004).
- Spáčilová P.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.

PŘÍPRAVA SELEKTIVNĚ ZNAČENÝCH BETULININŮ

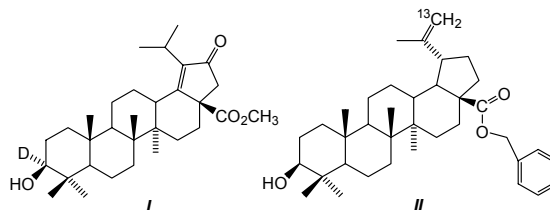
M. VLK^a, J. ŠAREK^a, L. MARKOVÁ^a, I. TIŠLEROVÁ^a, M. HAJDÚCH^b a M. SVOBODA^c

^a Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^b Laboratoř experimentální medicíny, Dětská a onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc; ^c I.Q.A., a.s. Jindřicha Plachty 16, 150 00 Praha 5 vlkmartin@volny.cz

Betuliny¹ jsou v naší skupině studovány pro svou významnou protinádorovou aktivitu. Pro provedení metabolických studií a též pro mapování inkorporace betulininů do biomolekul v tkáňových kulturách a jejich následnou detekci bylo nezbytné připravit od neúčinnějších z nich selektivně značené deriváty². Pro účely metabolických studií bylo značení prováděno pomocí izotopů ²H, ¹³C a ¹⁵N, pro studium inkorporace byly použity izotopy ³H a ¹⁴C.

V rámci této práce byly připraveny tritiem, deuteriem nebo ¹³C značené deriváty, např. **I**, **II**. Rovněž byly přisunuty některé klíčové meziproducty pro další syntézy značených sloučenin.

Připravené sloučeniny již byly dodány na pracoviště LEM v Olomouci k dalšímu zkoumání. Struktury všech připravených sloučenin byly potvrzeny spektrálními daty.



Činidla a rozpouštědla byla financována z grantu MPO FT-TA/027. Děkujeme doc. L. Lešetickému za poskytnutí některých značených činidel pro syntézy.

LITERATURA

- Šarek J. et al.: J. Med. Chem. 46, 5402 (2003).
- Tietze L. F. et al.: Liebigs Ann. Chem. 1991, 1245.

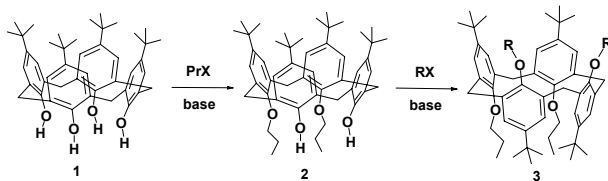
SYNTHESIS AND APPLICATION OF THE 1,2-ALTERNATE CALIX[4]ARENE DERIVATIVES

ALEXANDRA BÍLÁ, JAN BUDKA, MICHAELA POJAROVÁ, IVAN STIBOR, and PAVEL LHOTÁK

Institute of Organic Chemistry, ICT Prague, Technická 5, Prague 6
Alexandra.Bila@vscht.cz

Calix[n]arenes represent a large family of compounds, used in supramolecular, medicinal and material chemistry¹. The unique structure of calixarenes enables to build receptors for anions, cations and neutral molecules on calixarene scaffold.

fold. The smallest one, calix[4]arene, can be stabilised in four different conformers. Three of them, *cone*, *partial cone* and *1,3-alternate*, can be prepared in one step reaction in relatively good yields. This work is focused on the last one, least-available *1,2-alternate* conformer.



Our synthesis of the *1,2-alternate* conformer **3** starts from *proximally* dialkylated calix[4]arene **2**, whose preparation from basic calix[4]arene **1** was described in literature². The transformation of the derivative **2** to **3** (R = propyl, hexyl, benzyl, X = Br, I) was carried out under various reaction conditions (different bases, molar ratio of reactants, temperature, reaction time etc...). After optimization, the yield achieved 80 % of the *1,2-alternate* calix[4]arene. The *1,2-alternate* derivatives prepared by our method will be used for construction of unique-shaped receptors for various guests.

This research was partially supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Research Centre LC06070)

REFERENCES

- Gutsche C. D., *Calixarenes; Monograph in Supramolecular Chemistry*, (1989), and Gutsche C. D., *Calixarenes Revisited*, (1998), J. F. Stoddart, Ed.; The Royal Chemical Society of Chemistry, Cambridge, England.
- Boyko V. I.: *J. Incl. Phen. Macro. Chem.* 50, 193 (2004).

SYNTEZA KONFORMAČNĚ NESTÁLÝCH CALIX[4]ARENŮ A JEJICH INTERAKCE SE STŘÍBRNÝM KATIONEM

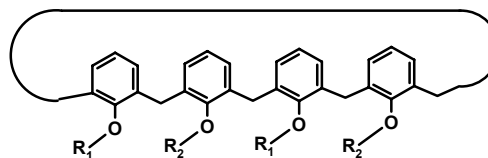
JAN BUDKA^a, JAN SÝKORA^{b,c}, MICHAELA POJAROVÁ^b, IVANA ČISAŘOVÁ^d, PAVEL LHOTÁK^a a IVAN STIBOR^a

^a Ústav organické chemie, ^b Ústav chemie pevných látek, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6; ^c Ústav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 135, Praha 6; ^d Katedra anorganické chemie, Univerzita Karlova, Hlavova 8, Praha 2
Jan.Budka@vscht.cz

V návaznosti na předchozí studie byla zkoumána kation- π interakce mezi s konformačně „mobilními“ and „semi-mobilními“ calix[4]areny a stříbrným kationem.

Publikované práce¹ a naše předchozí výsledky^{2–3} ukázaly, že vhodnými konformacemi calix[4]areny pro interakci se stříbrným kationem jsou *pinched cone*, *partial cone* a *1,3-alternate*.

Předkládaný příspěvek popisuje syntézu serie calix[4]arenů substituovaných na spodním okraji alkoxy skupinami v intervalu 4 x MeO- až 4 x PrO. Tyto deriváty obsahují „mobilní“ methoxy skupiny, „semi-mobilní“ ethoxy skupiny



Schema 1

- 1: R₁=R₂=Me; mobilní
2: R₁=Me, R₂=Et; mobilní
3: R₁=Me, R₂=Pr; mobilní
4: R₁=R₂=Et; *cone*, *partial cone*, *1,3-alternate*
5: R₁=Et, R₂=Pr; *cone*, *partial cone*, *1,3-alternate*

(konformace je stabilní do teploty cca 100 °C), konformačně zcela imobilizované propoxy skupiny a jejich kombinace (Schéma 1). Připravené deriváty byly použity ke komplexačním studiím v roztoku (¹H NMR titrace AgTf v CDCl₃: CD₃OD 4:1) a krystaly komplexů byly podrobeny rentgenostrukturální analýze. V závislosti na délce alkylového řetězce a konformaci byly zjištěny rozdíly v roztoku a v pevné fázi (různé vazebné módy, rozdílné typy komplexů – od diskretních komplexů přes dimery až po polymerní řetězce), které budou v přednášce diskutovány.

Tato práce je z části podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumné centrum LC06070).

LITERATURA

- Ikeda A., Tsuzuki H., Shinkai S.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 2073 (1994).
- Budka J., Lhoták P., Stibor I., Michlová V., Sýkora J., Čisařová I.: *Tetrahedron Lett.* 43, 2857 (2002).
- Budka J., Lhoták P., Stibor I., Sýkora J., Čisařová I.: *Supramol. Chem.* 15, 353 (2003).

KRYSTALOGRAFICKÁ STUDIE INTERAKCÍ (THIA)CALIX[4]ARENŮ SE STŘÍBRNÝM KATIONEM

MICHAL HIML^a, JAN BUDKA^a, JAN SÝKORA^{b,c}, MICHAELA POJAROVÁ^c, IVANA ČISAŘOVÁ^d, IVAN STIBOR^a a PAVEL LHOTÁK^a

^a Ústav organické chemie, ^b Ústav chemie pevných látek, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6; ^c Ústav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 135, Praha 6; ^d Katedra anorganické chemie, Univerzita Karlova, Hlavova 8, Praha 2
Michal.Himl@vscht.cz

Práce se zabývá srovnáním krystalických struktur klasických calixarenů a thiacalixarenů při interakcích se stříbrným kationem.

Ve srovnání s klasickými calix[4]areny, kdy stříbrný kation interaguje s calixarenem uvnitř kavity, přítomnost síry umožňuje interakci S-Ag-S mezi jednotlivými molekulami thiacalix[4]areny. Tyto interakce tvoří zajímavou a v calixarenové chemii dosud nepopsanou koordinační topologii.

Způsobem interakce stříbrného iontu se dá interpretovat také rozdílnost rozložení elektronových hustot na (thia)

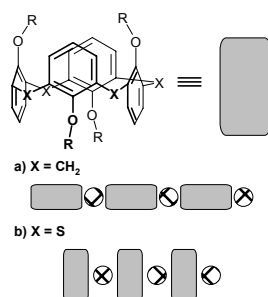


Schéma 1. Srovnání interakcí thiacalix[4]arenu a calix[4]arenu

calixarenových skeletech. Zatímco klasické calixareny preferují kation- π interakce s aromatickým systémem kde je stříbrný kation umístěn uvnitř kavity calixarenu a interaguje se dvěma protějšími aromatickými jádry, u thiacalixarenů jsou tyto interakce zanedbány a jsou preferovány interakce s elektronově bohatou sírou, kdy spolu se stříbrným kationem interagují sírné můstky dvou sousedních thiacalixarenů.

Tato práce je z části podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumné centrum LC06070).

LITERATURA

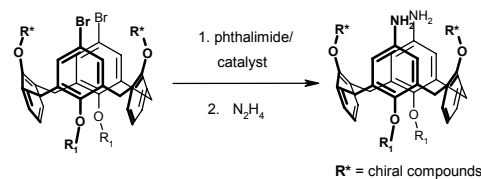
- Ikeda A., Tsuzuki H., Shinkai S.: J. Chem. Soc., Perkin Trans 2, 2073 (1994).
- Budka J., Lhoták P., Stibor I., Michlová V., Sýkora J., Císařová I.: Tetrahedron Lett. 43, 2857 (2002).
- Budka J., Lhoták P., Stibor I., Sýkora J., Císařová I.: Supramol. Chem. 15, 353 (2003).
- Himl M., Sýkora J., Císařová I., Stibor I., Lhoták P.: Org. Biomol. Chem., in press.

NEW SYNTHESIS OF DIAMINOCALIX[4]ARENES IN THE 1,3-ALTERNATE CONFORMATION

VERONIKA RAINDLOVÁ, MARKÉTA ŠIMÁNOVÁ, MIROSLAV DUDIČ, JAN BUDKA, MARTIN KÁŠ, IVAN STIBOR, and PAVEL LHOTÁK

Department of Organic Chemistry, ICT Prague, Technická 5, Prague 6
Veronika.Raindlova@vscht.cz

Calixarenes are well known, cavity containing, macrocycles, which have found wide utilisation in supramolecular chemistry. They are used as a molecular scaffold for building



more complex receptor recognising cations, anions and neutral compounds. Since the complexations of chiral species are very important phenomenon in nature, we decided to explore ability of some calixarenes to recognise chiral anions.

On the basis of our previous research, which showed the bis-ureido calixarenes in the 1,3-alternate conformation interact with anions very strongly, we focused on the preparation several receptors of this type.

The synthesis of starting compound, di-aminocalix[4]arene blocked in the 1,3-alternate conformation, is not easy. The synthetic path involves a few difficulties in purification and the final product was always achieved in very low yield (less than 20%).

The new synthesis starts from relatively easily obtainable di-bromocalix[4]arene in the 1,3-alternate conformation, which is transformed to di-aminocompound via reaction with phthalimide in the presence of suitable catalyst (Cu, CuI, Cu₂O) and subsequent deprotection by hydrazine¹.

In this work we would like to present the study on new general synthetic procedure of di-aminocalix[4]arene in the 1,3-alternate conformation, which would increase its availability and help us in our further research.

This research was partially supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Research Centre LC06070)

REFERENCE

- Timmerman P.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2077 (2000).



Sborník abstraktů

Konference
Pokroky v organické, bioorganické
a farmaceutické chemii

41. Konference

4. – 6. prosince 2006

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	1054	EDITORIAL	1054
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Kvarky s barvou a vůní a co dál?	1055	Quarks with Colour and Smell and What Next ?	1055
J. Chýla		J. Chýla	
Cílený posun čtecího rámce – translace alternativních produktů	1068	Programmed Translational Frameshifting – Translation of Alternative Products	1068
Z. Smékalová a T. Ruml		Z. Smékalová and T. Ruml	
Vlastnosti a modifikácia poly(3-hydroxybutyrátu)	1075	Properties and Modification of Poly(3-hydroxybutanoate)	1075
G. Miková a I. Chodák		G. Miková and I. Chodák	
Současné trendy v analýze eukaryotických proteomů, glykomů a lipidomů	1084	Recent Trends in Eukaryotic Proteomics, Glycomics, and Lipidomics	1084
P. Man a K. Bezouška		P. Man and K. Bezouška	
Frakcionačná analýza sedimentov – limitácie selektivity sekvenčného lúhovania	1096	Fractionation Analysis of Sediments – Limitations in the Extractant Selectivity	1096
V. Vojteková a E. Krakovská		V. Vojteková and E. Krakovská	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Voltametrické stanovení submikromolárních koncentrací 3-nitrofluoranthenu a pendimethalinu na stříbrné pevné amalgámové elektrodě	1105	Voltammetric Determination of Submicromolar Concentrations of 3-Nitrofluoranthene and Pendimethalin at Silver Solid Amalgam Electrode	1105
L. Vaňková, L. Maixnerová, K. Čížek, J. Fischer, J. Barek, T. Navrátil a B. Yosypchuk		L. Vaňková, L. Maixnerová, K. Čížek, J. Fischer, J. Barek, T. Navrátil, and B. Yosypchuk	
Využití nespecifických peptidů pro proteomickou identifikaci nízkomolekulárních proteinů z ječmene MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií	1111	The Use of Nonspecific Peptides for Proteomic Identification of Low-Molecular-Weight Proteins from Barley by MALDI-TOF Mass Spectrometry	1111
P. Řehulka, G. Allmaier a J. Chmelík		P. Řehulka, G. Allmaier, and J. Chmelík	
Posouzení klinické relevance hodnoty sérové koncentrace adipocytárního proteinu vázajícího mastné kyseliny u pacientů s diagnózou metabolického syndromu novou metodou ELISA	1116	Assessment by a New ELISA Method of Clinical Relevance of Serum Concentration of Adipocyte Fatty Acid Binding Protein in Patients with Metabolic Syndrome Diagnosis	1116
D. Stejskal, M. Karpíšek a P. Kollár		D. Stejskal, M. Karpíšek, and P. Kollár	
RECENZE	1120	BOOK REVIEWS	1120
LIBLICE 2006 – dodatky	1122	LIBLICE 2006 – Supplement	1122

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 100 (2006), čís./no. 12 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 130, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 116 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHraničNí A OBLASTNí REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvíčka (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNí RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Mišek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, R. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNĚM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, simanek@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2006 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plné předplatné 2006 (12 čísel) 1512 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 756 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2006 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Dáno do tisku 1.12.2006.

ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ

vydává

CHEMICKÉ LISTY

CHLSAC 100, 1 – 476 (2006)

Vedoucí redaktor

Editor

B. KRATOCHVÍL

Redakční kruh

Editorial Board

J. BAREK, Z. BĚLOHLAV, P. DRAŠAR, J. HETFLEJŠ, P. HOLÝ, J. HORÁK, P. CHUCHVALEC,
J. PODEŠVA, P. RAUCH, J. VOLKE

Zahraniční a oblastní redaktori

Foreign and Regional Editors

F. ŠVEC (USA), V. VĚTVIČKA (USA), L. OPLETAL (HRADEC KRÁLOVÉ), P. TARKOWSKI (OLOMOUC)

Redakční rada

Advisory Board

E. BORSIG, M. ČERNÁ, L. ČERVENÝ, E. DIBUSZOVÁ, J. HANIKA, Z. HAVLAS, I. KADLECOVÁ, J. KÁŠ, J. KOUBEK,
T. MÍŠEK, J. PACÁK, V. PAČES, O. PALETA, V. RŮŽIČKA, I. STIBOR, V. ŠIMÁNEK, R. ZAHRADNÍK

Výkonná redaktorka

Editorial Assistant

R. ŘÁPKOVÁ

Ročník 100 (2006)

Volume 100 (2006)

Listy chemické, ročník 130 – Časopis pro průmysl chemický, ročník 116

Str. 1 – 476

ISSN 0009-2770

Úvodníky

Editorials

Vážení čtenáři (<i>J. Ulrichová</i>)	1
Chemické listy v roce 2006 a pár úvah (<i>B. Kratochvíl</i>)	89
Chemické inženýrství a Chemické listy (<i>J. Drahoš</i>)	161
Vzpomínky k výročí časopisu Chemické listy (<i>J. Horák</i>)	225
Financování vědecké práce (<i>P. Drašar</i>)	313
Jak vychovávat novou generaci chemiků (<i>J. Barek</i>)	417
Černobyl po 20 letech (<i>J. Podešva</i>)	477
Výzkumem a vývojem k prosperitě Česka? Ano, ale jak (<i>M. Navrátil</i>)	777
Spalování komunálních odpadů a jaderná energetika – ekologické problémy ? (<i>V. Pekárek</i>)	861
Inspirace ze setkání chemiků (<i>P. Rauch</i>)	953
Chemické listy na internetu (ještě jednou po sedmi letech) (<i>P. Zámotný</i>)	1054

Referáty

Review Articles

<i>V. Král, J. Šotola, P. Neuwirth, Z. Kejík, K. Záruba a P. Martásek</i> : Nanomedicína – současný stav a perspektivy: velký potenciál, nebo jen módní slogan?	4
<i>M. Hrubý, J. Kučka, J. Kozempel a O. Lebeda</i> : Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění	10
<i>K. Kontrová, J. Zídková, P. Palečková a J. Sajdok</i> : Role proteinu CD36 jako významného rizikového faktoru kardiovaskulárních onemocnění	17
<i>D. Vetchý, K. Frýbortová, M. Rabišková a A. Häring</i> : Testování stability léčivých přípravků	24
<i>A. Zdařilová, J. Malíková, Z. Dvořák, J. Ulrichová a V. Šimánek</i> : Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	30
<i>I. Švancara a K. Vyřas</i> : Elektroanalýza s bismutovými elektrodami	90
<i>J. Horáková, V. Maier a J. Ševčík</i> : On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze	163
<i>K. Lang, J. Mosinger a D. M. Wagnerová</i> : Singletový kyslík v praxi – současnost a perspektiva	169
<i>R. Kotlín a J. E. Dyr</i> : Vybrané metody modifikace povrchů biosenzorů pro imobilizaci proteinů	178
<i>M. Karabín, P. Dostálek a P. Hofta</i> : Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství	184
<i>P. Holý</i> : Ke stému ročníku <i>Chemických listů</i>	227
<i>Z. Fišar</i> : Fytokanabinoidy	233
<i>A. Luxová a I. Valterová</i> : Biosyntéza hmyzích feromonů	243
<i>B. Friedrich</i> : Proč jsou studené molekuly tak žhavé?	256
<i>Z. Fišar</i> : Endokanabinoidy	314
<i>P. Soudek, L. Vichová, Š. Valenová, R. Podlipná, J. Malá a T. Vaněk</i> : Arsen a jeho příjem rostlinami	323
<i>M. Valach a E. Šturdík</i> : Konstrukce ampérometrických biosenzorů pro rychlé a jednoduché stanovení etanolu	330
<i>A. Fedoročková a P. Raschman</i> : Kinetika chemického rozpouštění oxidů: Porovnání teorie a experimentu	337
<i>E. Leitmannová a L. Červený</i> : Kyselina sorbová a její deriváty jako suroviny pro přípravu listových alkoholů ...	418
<i>J. Makovnicková, G. Barančíková, P. Dlapa a K. Dercová</i> : Anorganické kontaminanty v půdním ekosystému ..	424
<i>M. Mazáň, K. Mazáňová a V. Farkaš</i> : Bunková stena húb – výzva pro výskum nových antimykotik	433
<i>B. Štíbr a B. Grüner</i> : Klastrová boranová analoga cyklopentadienylového aniontu a ferrocenu	440
<i>H. Čížková, P. Dostálek, J. Fiala a I. Kolouchová</i> : Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva	478
<i>Š. Adámková, L. Luhová, M. Petřivalský a P. Peč</i> : Role L-fenylalaninamoniulyasy při obranné reakci rostlin	486

<i>V. Heřmanová, J. Bárta a V. Čurn:</i> Antifungální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití	495
<i>M. Hraška, S. Rakoušský a V. Čurn:</i> Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin	501
<i>J. Zehnálek, V. Adam a R. Kizek:</i> Asimilace dusičnanového, amonného a amidického dusíku u zemědělských plodin	508
<i>J. Čopíková, O. Lapčík, M. Uher, J. Moravcová a P. Drašar:</i> Cukerná nesacharosová sladidla a příbuzné láky	778
<i>J. Bazel' a V. Andruch:</i> Spektrofotometrické metody stanovenia prvkov zásaditými farbivami – Súčasný stav a trendy	784
<i>J. Mayerová:</i> Heterogenní katalyzátory pro acylační reakce	790
<i>P. Houserová, K. Janák, P. Kubáň, J. Pavlíčková a V. Kubáň:</i> Chemické formy rtuti ve vodních ekosystémech – vlastnosti, úrovně, koloběh a stanovení	862
<i>M. Gernátová a P. Janderka:</i> Elektrochemická degradácia chlórphenolov	877
<i>V. Kočí:</i> Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí	882
<i>M. Šušla a K. Svobodová:</i> Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů	889
<i>D. Francová a L. Červený:</i> Syntéza vonných laktonů s využitím katalyzátorů hydrotalcitového typu	954
<i>M. Doležal:</i> Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu	959
<i>D. Nečas a M. Kotora:</i> Využití katalýzy sloučeninami železa v organické syntéze	967
<i>P. Češková, K. Brožková, L. Hernychová, J. Štěrba, D. Valík a B. Vojtěšek:</i> Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limitace	974
<i>J. Chýla:</i> Kvarky s barvou a vůní a co dál?	1055
<i>Z. Smékalová a T. Ruml:</i> Cílený posun čtecího rámce – translace alternativních produktů	1068
<i>G. Miková a I. Chodák:</i> Vlastnosti a modifikácia poly(3-hydroxybutyrátu)	1075
<i>P. Man a K. Bezouška:</i> Současné trendy v analýze eukaryotických proteomů, glykomů a lipidomů	1084
<i>V. Vojteková a E. Krakovská:</i> Frakcionačná analýza sedimentov – limitácie selektivity sekvenčného lúhovania	1096

Nomenklatura a terminologie

Nomenclature and Terminology

Isopropyl versus <i>sek</i> -propyl (<i>J. Kahovec</i>)	48
Doporučení IUPAC. Nomenclature for Rotaxanes (<i>J. Kahovec</i>)	156
Doporučení IUPAC. Explanatory Dictionary of Key Terms in Toxicology (<i>J. Kahovec</i>)	221
Doporučení IUPAC. Glossary of Terms Relating to Pesticides (<i>J. Kahovec</i>)	221
Doporučení IUPAC. Definitions of Terms Relating to the Structure and Processing of Inorganic and Polymeric Gels and Networks, and Inorganic Polymeric Materials (<i>J. Kahovec</i>)	368
Doporučení IUPAC. Guidelines for Potentiometric Measurements in Suspension – Practical pH Measurements in Soil Suspension (<i>J. Kahovec</i>)	832
Doporučení IUPAC. Glossary of Terms Used in Toxicology (<i>J. Kahovec</i>)	832

Laboratorní přístroje a postupy

Laboratory Equipment and Methods

<i>J. Reitmajer, L. Feltl, Z. Roth a M. Tichý:</i> Rozdělení sloučenin v binárních směsích mezi jejich vodnou plynnou fází	42
<i>J. Rotschová a J. Strnadová:</i> Metodika analytického stanovení stabilizátoru Uvinul 4050H v polypropylenové matici Makrostab UV 2026	114
<i>V. Bilská, S. Feriancová a J. Grones:</i> Biodegradácia benzénu baktériami octového kvasenia v biofiltri	118
<i>P. Babula, R. Mikelová, V. Adam, D. Potěšil, J. Zehnálek, R. Kizek, L. Havel a Z. Sladký:</i> Chromatografické stanovení naftochinonů v rostlinách	271
<i>L. Záděrová a P. Lubal:</i> Kinetické stanovení kyseliny L-askorbové s využitím oscilujícího chemického systému	277

<i>S. Ružičková, J. Bajuszová, M. Matherny a L. Koller:</i> Porovnanie vyparovacieho procesu v neriadenom D.C. oblúku v klasickej spektrografii a riadenom D.C. oblúku v optickej spektrometrii pri analýze niektorých vybraných environmentálne relevantných prvkov	348
<i>J. Mohelníková:</i> Materiály pro tenké vrstvy infračervených zrcadel	357
<i>P. Straka a Z. Klika:</i> Identifikace komplexů hliníku v uhlí metodou NMR tuhé fáze	363
<i>S. Šebková:</i> Voltametrické stanovení alizarinové chromové černi PT s využitím kompozitních elektrod	449
<i>M. Ritz a K. Slavinská:</i> Využití FTIR a multikomponentních metod při stanovení vlhkosti, popela a prchavé hořlaviny v černém uhlí	455
<i>M. Šafářová a M. Řehoř:</i> Stopové prvky v uhelných a neuhelných sedimentech severočeské pánve a zeminách rekultivovaných lokalit	462
<i>T. Lošák:</i> Závislost výnosu a kvality semene lupiny úzkolisté (<i>Lupinus angustifolius</i> , L.) na hnojení sloučeninami dusíku	515
<i>L. Ducsay, O. Ložek, L. Varga a T. Lošák:</i> Suplementácia ozimnej pšenice selénom	519
<i>J. Lachman, K. Hamouz, J. Čepl, V. Pivec, M. Šulc a P. Dvořák:</i> Vliv vybraných faktorů na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu hlíz brambor	522
<i>S. Marcincák, J. Sokol, P. Turek, P. Popelka a J. Nagy:</i> Stanovenie malónďaldehydu v bravčovom mäse s použitím extrakcie na tuhej fáze a HPLC	528
<i>L. Bartoňová:</i> Chování prvků při spalování uhlí – porovnání jejich obsahů v nedopalu, uhlí a popelu	798
<i>N. Strnadová a D. Matějková:</i> Odstraňování sloučenin mědi a zinku z vod adsorpcí na hydroxidu hořečnatém ..	803
<i>D. Stejskal a I. Svoboda:</i> Stanovení koncentrace solubilního leptinového receptoru (Ob-Re) pomocí nové metody ELISA	809
<i>M. Hartman, M. Pohořelý a O. Trnka:</i> Chemická a palivová charakteristika anaerobně stabilizovaného čistírenského kalu a jeho popela	813
<i>M. Germaničová a P. Lubal:</i> Spektrofotometrické stanovení uranu(VI) v přítomnosti uhličitánů a štávelanů a jeho využití pro speciální analýzu uranu(VI)	821
<i>J. Kolčák, M. Rabišková a M. Stuchlík:</i> Měkké želatinové tobolky obsahující povrchově aktivní látky a ethanol	828
<i>P. Najmanová, P. Nyplová, M. Kubal a J. Janků:</i> Použití kvantitativní atmogeochemie při monitorování starých ekologických zátěží	896
<i>I. Hagarová, M. Žemberyová, Z. Hrušovská, J. Ševc a J. Klimek:</i> Stanovenie arzenu v nekontaminovaných vzorkách životného prostredia technikou FI-HGAAS	901
<i>V. Štefanidesová a T. Trefilová:</i> Vyluhovatelnost rtuti sekvenční extrakcí	906
<i>J. Šíma, V. Holcová, J. Dušek a K. Diáková:</i> Analytické přístupy ke studiu redoxních vlastností umělého mokřadu	911
<i>S. Firáková, A. Jedinák, T. Maliar a E. Šturdík:</i> Kvantitativne vzťahy medzi štruktúrou a schopnosťou flavonoidov redukovať železitý komplex	980
<i>E. Sminčáková a D. Remeteiová:</i> Použitie zásaditých roztokov pri lúhovaní antimonitu	987
<i>L. Vaňková, L. Maixnerová, K. Čížek, J. Fischer, J. Barek, T. Navrátil a B. Yosypchuk:</i> Voltametrické stanovení submikromolárních koncentrací 3-nitrofluoranthenu a pendimethalinu na stříbrné pevné amalgámové elektrodě	1105
<i>P. Řehulka, G. Allmaier a J. Chmelík:</i> Využití nescifických peptidů pro proteomickou identifikaci nízkomolekulárních proteinů z ječmene MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií	1111
<i>D. Stejskal, M. Karpíšek a P. Kollár:</i> Posouzení klinické relevance hodnoty sérové koncentrace adipocytárního proteinu vázajícího mastné kyseliny u pacientů s diagnózou metabolického syndromu novou metodou ELISA	1116

Cena Merck

Merck Prize

<i>M. Ryvolová, P. Táborský, P. Vrábel, J. Havel a J. Preisler:</i> Derivatizace aminokyselin, peptidů a proteinů pro laserem indukovanou fluorescenční detekci v kapilární elektroforéze	191
<i>V. Ranc, P. Fryčák, L. Müller, P. Bednář a K. Lemr:</i> Rozlišení izomerů hmotnostní spektrometrií s využitím kinetické metody	196
<i>M. Galiová, V. Možná, A. Staňková, K. Novotný a V. Kanický:</i> Studium procesů interakce laserového záření se	

vzorky skel a zemědělských půd pomocí spektroskopie laserem indukovaného mikroplazmatu a optické emisní spektroskopie v indukčně vázaném plazmatu	204
<i>J. Foltýnová, M. Tkadlecová, M. Valík, L. Palivec a V. Král: NMR studie interakce derivátů distamycinu s DNA</i>	210

Cena Shimadzu

Shimadzu Prize

<i>K. Pecková, V. Mocko, F. Opekar, G. M. Swain, J. Zima a J. Barek: Miniaturizované ampéro-metrické detektory pro HPLC a kapilární zónovou elektroforézu</i>	124
<i>J. Reiter, J. Vondrák, J. Velická a Z. Mička: Nové elektrolyty nejen pro chemické zdroje elektrické energie</i>	133
<i>L. Starkbaumová: Experimentální studium chování cyklických uhlovodíků při pyrolýze</i>	140

Recenze

Book Reviews

Ch. Elschenbroich: Organometallics (<i>D. Dvořák</i>)	369
M. Zlokarnik: Scale-up in Chemical Engineering (<i>J. Hanika</i>)	370
S. Stampf, Song-I Han (ed.): NMR Imaging in Chemical Engineering (<i>J. Hanika</i>)	370
B. Kamm, P. R. Gruber, M. Kamm (ed.): Biorefineries – Industrial Processes and Products (<i>K. Melzoch</i>)	468
E. Paleček, F. Scheller, J. Wang (ed.): Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics, Perspectives in Bioanalysis (<i>J. Vacek</i>)	468
G. A. Olah, A. Goepfert, G. K. Surya Prakash: Beyond Oil and Gas: The Methanol Economy (<i>P. Zámotný</i>) ...	837
Kenneth Michael Pollard (ed.): Autoantibodies and Autoimmunity: Molecular Mechanisms in Health and Disease aspects of the biology (<i>Z. Knejzlík</i>)	992
Didier Rognan (ed.): Ligand Design for G Protein-Coupled Receptors (<i>V. Spiwok</i>)	992
Klaus-Michael Debatin, Simone Fulda, (ed.): Apoptosis and Cancer Therapy: From Cutting-edge Science to Novel Therapeutic Concepts, 1. Vol (<i>Z. Knejzlík</i>)	1120
Koichi Asano: Mass Transfer (<i>P. Chuchvalec</i>).....	1121

Výuka chemie

Education in Chemistry

Vizuálna gramotnosť a riešenie učebných úloh z chémie (<i>Z. Haláková a M. Prokša</i>)	213
Časopis BIOLOGIE-CHEMIE-ZEMĚPIS (<i>M. Svobodová</i>)	467
Teploměr, tlakový hrnec a škola (<i>P. Andryšková a H. Cídlková</i>)	833

Chemický průmysl

Chemical Industry

<i>M. Šilhan: Povinnost značkování zneužitelných ropných a petrochemických produktů</i>	52
<i>J. Barek a V. Janeček: Long-range Research Initiative – Evropský chemický průmysl podporuje chemický výzkum</i>	148
<i>F. Kaštánek a J. Hanika: Úloha chemického inženýrství ve zvyšování bezpečnosti chemických výroby</i>	150
<i>I. Vodičková a M. Šilhan: Česká technologická platforma pro udržitelnou chemii</i>	220

Konference Sigma - Aldrich, VI Konference mezioborové setkání mladých vědeckých a výzkumných pracovníků z oborů chemie, biochemie, molekulární biologie a oborů příbuzných (Devět skal – Žďárské vrchy, 14. – 17. 6. 2006)	371
--	-----

58. Sjezd chemických společností (Ústí nad Labem, 4.–8. září 2006)	561
POLYSACHARIDY 2006 – Konference „Struktura a biologické účinky polysacharidů a jejich derivátů“, (Praha, 10. 11. 2006)	839
58. Sjezd chemických společností – dodatky	994
Liblice 2006 (Nymburk, 2006)	999
Liblice 2006 (Nymburk, 2006) – dodatky.....	1122
58. Sjezd chemických společností. Paliva, petrochemie, polymery. (4.–8. září 2006, Ústí nad Labem).....	s1

Diskuse

Discussion

Biofarmacie a biofarmacie (<i>J. Sajvera</i>)	49
Subjektivní stanovisko k terminologii „biofarmacie“ (<i>J. Květina</i>)	50
Poznámka k poznámce o některých studijních „lékových“ směrech na VŠCHT pana profesora Květiny (<i>L. Červeny</i>)	50
Obsazený název (<i>M. Fusek, L. Cvak</i>)	51

Osobní zprávy

Personal News

Přání k narozeninám (<i>J. Ludvík</i>)	157
Ohlédnutí za profesorem Jaroslavem Čihalíkem (<i>J. Barek a L. Mašlaňová</i>)	157

Bulletin Asociace českých chemických společností

Od Brdičkovy polarografické filtrátové reakce k alfa-1 kyselému glykoproteinu (orosomukoidu) (<i>V. Kalous</i>)	57
Chemikálie značené stabilními isotopy dodávané firmou ISOTEC (<i>J. Nohejl</i>)	60
O přednáškách, přednášení a přednášejících po dvaceti letech (<i>R. Zahradník a Z. Herman</i>)	285
Novinky v databázi web of science: pět let Web of Science v České republice (<i>R. Kizek a V. Adam</i>)	290
Základy termodynamiky nevratných dějů (<i>I. Vavruch</i>)	535
Integrovaný registr znečišťování na Internetu (<i>J. Maršák</i>)	539
Přestoupí IF Chemických listů magickou hranici 0,5 ? (<i>R. Kizek</i>)	542
Ohlasy k 100-ročnici Chemických listov spoza rieky Moravy (<i>E. Borsig</i>)	921
Univerzity a výzkum (<i>H. Schwarz a R. Zahradník</i>)	922
České chemické společnosti (<i>J. Vymětal</i>)	923

Ze života chemických společností	61, 292, 543, 928
Členská oznámení a služby	76
Evropský koutek	63, 292, 929
Odborná setkání	63, 296, 544, 933

Akce v ČR a v zahraničí	296, 546, 939
Chemik na studiích, cestách	67
Výuka chemie	70, 300
Zprávy	295, 547
Střípky a klípky o světových chemících	77
Zákony, které ovlivní život chemiků	301, 550, 938
Knihy, literatura, informace a web	304, 550
Aprílový klub	75, 303, 551, 939
Bulletin představuje	69, 303, 550, 940
Noví členové ČSCH	80, 548
Členská oznámení a služby	549
Osobní zprávy	80, 307, 552, 940
Výročí a jubilea	84, 309, 554, 942

Autorský rejstřík 100 (2006)**Autor Index 100 (2006)**

(úv) úvodník, (ref) přehledný referát, (nt) nomenklatura a terminologie, (l) laboratorní přístroje a postupy, (ch.p.) chemický průmysl, (rec) recenze, (d) diskuse, (os.zp.) osobní zprávy, (s) odborná setkání, (v.ch.) výuka chemie, (z) zprávy, (b) bulletin, (cs) cena Shimadzu, (cm) cena Merck

- Adam V.: (b) 290, (l) 271, (ref) 508
Adámková Š.: (ref) 486
Allmaier G.: (l) 1111
Andruch V.: (ref) 784
Andrýsková P.: (v.ch.) 833
- Babula P.: (l) 271
Bajuszová J.: (l) 348
Barančíková G.: (ref) 424
Barek J.: (b) 63, 80, (cs) 124, (ch.p.) 148, (l) 1105, (os.zp.) 157, (úv) 417
Bárta J.: (ref) 495
Bartoňová L.: (l) 798
Bazef J.: (ref) 784
Bednář P.: (cm) 196
Beneš P.: (b) 941
Bezouška K.: (ref) 1084
Bilská V.: (l) 118
Borsig E.: (b) 921
Brožková K.: (ref) 974
- Cídllová H.: (v.ch.) 833
Cvak L.: (d) 51
- Čaplovič J.: (b) 77
Čepl J.: (l) 522
Černý S.: (os.zp.) 307
Červený L.: (ref) 418, 954, (d) 50
Češková P.: (ref) 974
Čížek K.: (l) 1105
Čížková H.: (ref) 478
Čopíková J.: (ref) 778
Čurn V.: (ref) 495, 501
- Davídek J.: (b) 81
Dercová K.: (ref) 424
Diáková K.: (l) 911
Dlapa P.: (ref) 424
- Doležal M.: (ref) 959
- Dostálek P.: (ref) 184, 478
Drahoš J.: (úv) 161
Drašar P.: (rec) 304, (ref) 778, (úv) 313
Ducsay L.: (l) 519
Dušek J.: (l) 911
Dvořák D.: (ref) 369
Dvořák P.: (l) 522
Dvořák Z.: (ref) 30
Dyr J. E.: (ref) 178
- Elbert T.: (b) 935
- Farkaš V.: (ref) 433
Fedoročková A.: (ref) 337
Feltl L.: (l) 42
Feriancová S.: (l) 118
Fiala J.: (ref) 478
Firáková S.: (l) 980
- Fischer J.: (l) 1105
Fišar Z.: (ref) 233, 314
Foltýnová J.: (cm) 210
Francová D.: (ref) 954
Friedrich B.: (ref) 256
Frýbortová K.: (ref) 24
Fryčák P.: (cm) 196
Fusek M.: (d) 51
- Galiová M.: (cm) 204
Germaničová M.: (l) 821
Gernátová M.: (ref) 877
Grones J.: (l) 118
Grüner B.: (ref) 440
- Hagarová I.: (l) 901
Haláková Z.: (v.ch.) 213
Hamouz K.: (l) 522
Hanika J.: (ch.p.) 150, (rec) 369, 370
- Häring A.: (ref) 24
Hartman M.: (l) 813
Havel J.: (cm) 191
Havel L.: (l) 271
Havlas Z.: (b) 940
Herman Z.: (b) 285
Hernychová L.: (ref) 974
Heřmanová V.: (ref) 495
Hořta P.: (ref) 184
Holcová V.: (l) 911
Holý P.: (ref) 227
Holzhauser P.: (b) 64, 936, (s) 296
Horák J.: (úv) 225
Horáková J.: (ref) 163
Houserová P.: (ref) 862
Hrabálek A.: (b) 80
Hraška M.: (ref) 501
Hrubý M.: (ref) 10
- Hrušovská Z.: (l) 901
- Chmelík J.: (l) 1111
Chodák I.: (ref) 1075
Chuchvalec P.: (rec) 1121
Chýla J.: (ref) 1055
- Janák K.: (ref) 862
Janderka P.: (ref) 877
Janeček V.: (b) 929, (ch.p.) 148
Janků J.: (l) 896
Jedinák A.: (l) 980
- Kahovec J.: (nt) 48, 156, 221, 368, 832
Kalous V.: (b) 57, 78
Kanický V.: (cm) 204
Karabín M.: (ref) 184
Karpíšek M.: (l) 1116
Kaštanek F.: (ch.p.) 150
Kejík Z.: (ref) 4
Kizek R.: (b) 290, 933, (l) 271, (ref) 508
- Klika Z.: (l) 363
Klimek J.: (l) 901
Knejzlík Z.: (rec) 992, 1120
Kočí V.: (ref) 882
Kolčák J.: (l) 828
Kollár P.: (l) 1116
Koller L.: (l) 348
Kolouchová I.: (ref) 478
Kolská Z.: (b) 928
Kontrová K.: (ref) 17
Kotlín R.: (ref) 178
Kotora M.: (ref) 967
Kozáčková H.: (b) 70
Kozempel J.: (ref) 10
Krakovská E.: (ref) 1096
Král V.: (cm) 210, (ref) 4
Kratochvíl B.: (b) 928, (úv) 89
Kubal M.: (l) 896
Kubáň P.: (ref) 862
Kubáň V.: (ref) 862
Kučka J.: (ref) 10
Květina J.: (d) 50
Kvíčala J.: (b) 66
- Lachman J.: (l) 522
Lang K.: (ref) 169
Lapčík O.: (ref) 778
Lebeda O.: (ref) 10
Leitmannová E.: (ref) 418
Lemr K.: (cm) 196
Lošák T.: (l) 515, 519
Ložek O.: (l) 519
Lubal P.: (l) 277, 821
Ludvík J.: (b) 82, (os.zp.) 157
Luhová L.: (ref) 486
Luxová A.: (ref) 243
- Maier V.: (ref) 163
Maixnerová L.: (l) 1105

- Makovníková J.: (ref) 424
Malá J.: (ref) 323
Maliar T.: (l) 980
Malíková J.: (ref) 30
Man P.: (ref) 1084
Marcinčák S.: (l) 528
Martásek P.: (ref) 4
Mašlaňová L.: (os.zp.) 157
Matějková D.: (l) 803
Matherny M.: (l) 348
Mayerová J.: (ref) 790
Mazáň M.: (ref) 433
Mazáňová K.: (ref) 433
Melzoch K.: (rec) 468
Mička Z.: (cs) 133
Mikelová R.: (l) 271
Miková G.: (ref) 1075
Mocko V.: (cs) 124
Mohelníková J.: (l) 357
Moravcová J.: (ref) 778
Mosinger J.: (ref) 169
Možná V.: (cm) 204
Müller L.: (cm) 196
- Nagy J.: (l) 528
Najmanová P.: (l) 896
Navrátil M.: (úv) 777
Navrátil T.: (l) 1105
Nečas D.: (ref) 967
Neuwirth P.: (ref) 4
Novotný K.: (cm) 204
Nohejl J.: (b) 60
Nyplová P.: (l) 896
- Opekar F.: (cs) 124
- Palečková P.: (ref) 17
Paleta O.: (b) 61
Palivec L.: (cm) 210
Pavličková J.: (ref) 862
Pecková K.: (cs) 124
Peč P.: (ref) 486
Pekárek V.: (úv) 861
- Petr J.: (b) 63
Petřivalský M.: (ref) 486
Pivec V.: (l) 522
Podešva J.: (úv) 477
Podlipná R.: (ref) 323
Pohořelý M.: (l) 813
Pokorný A.G.: (b) 62
Popelka P.: (l) 528
Potěšil D.: (l) 271
Preisler J.: (cm) 191
Prokša M.: (v.ch.) 213
- Rabišková M.: (l) 828, (ref) 24
Rakouský S.: (ref) 501
Ranc V.: (cm) 196
Raschman P.: (ref) 337
Rauch P.: (úv) 953
Reiter J.: (cs) 133
Reitmayer J.: (l) 42
Remeteiová D.: (l) 987
Ritz M.: (l) 455
Roth Z.: (l) 42
Rotschová J.: (l) 114
Ruml T.: (ref) 1068
Rusek M.: (b) 300
Ružičková S.: (l) 348
Ryvolová M.: (cm) 191
- Řehoř M.: (l) 462
Řehulka P.: (l) 1111
- Sajdok J.: (ref) 17
Sajvera J.: (b) 72, (d) 49
Schwarz H.: (b) 922
Sladký Z.: (l) 271
Slavinská K.: (l) 455
Smékalová Z.: (ref) 1068
Sminčáková E.: (l) 987
Sokol J.: (l) 528
Soudek P.: (ref) 323
Spiwok V.: (rec) 992
Staňková A.: (cm) 204
Starkbaumová L.: (cs) 140
- Stejskal D.: (l) 809, 1116
Straka P.: (l) 363
Strnadová J.: (l) 114
Strnadová N.: (l) 803
Stuchlík M.: (l) 828
Suchomel P.: (b) 75
Svoboda I.: (l) 809
Svobodová K.: (ref) 889
Svobodová M.: (v.ch.) 467
Swain G. M.: (cs) 124
- Šafářová M.: (l) 462
Šebková S.: (l) 449
Ševc J.: (l) 901
Ševčík J.: (ref) 163
Šilhan M.: (ch.p.) 52, 220
Šíma J.: (l) 911
Šimánek V.: (b) 83, (ref) 30
Šmidrkal J.: (rec) 305
Šotola J.: (ref) 4
Štefanidesová V.: (l) 906
Štěpnička P.: (b) 82
Štěřba J.: (ref) 974
Štíbr B.: (ref) 440
Šturdík E.: (l) 980, (ref) 330
Šulc M.: (l) 522
Šušla M.: (ref) 889
Švancara I.: (ref) 90
- Táborská E.: (b) 84
Táborský P.: (cm) 191
Tarkowski P.: (b) 934, 936
Tichý M.: (b) 930, (l) 42
Tkadlecová M.: (cm) 210
Trefilová T.: (l) 906
Trnka O.: (l) 813
Trnková L.: (s) 298
Turek P.: (l) 528
- Uher M.: (ref) 778
- Ulrichová J.: (ref) 30, (b) 292, (úv) 1
Vacek J.: (rec) 468
Valach M.: (ref) 330
Valenová Š.: (ref) 323
Valík D.: (ref) 974
Valík M.: (cm) 210
Valterová I.: (ref) 243
Vaněk T.: (ref) 323
Vaňková L.: (l) 1105
Varga L.: (l) 519
Velická J.: (cs) 133
Vetřý D.: (ref) 24
Vichová L.: (ref) 32.
Vít J.: (b) 292
Vodičková I.: (ch.p.) 220
Vojteková V.: (ref) 1096
Vojtěšek B.: (ref) 974
Vondrák J.: (cs) 133
Vosolobě S.: (b) 67
Vrábel P.: (cm) 191
Vrba J.: (b) 68
Vymětal J.: (b) 923
Vytřas K.: (ref) 90
- Wagnerová D. M.: (ref) 169
Wimmerová M.: (s) 298
- Yosypchuk B.: (l) 1105
- Záděrová L.: (l) 277
Zahradník R.: (b) 285, 922
Zajíček J.: (b) 62
Zámostný P.: (rec) 837, (úv) 1054
Záruba K.: (ref) 4
Zdařilová A.: (ref) 30
Zehnálek J.: (l) 271, (ref) 508
Zídková J.: (ref) 17
Zima J.: (cs) 124
- Žemberyová M.: (l) 901

ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ

vydává

CHEMICKÉ LISTY

CHLSAC 100, 477–1127 (2006)

Vedoucí redaktor

Editor

B. KRATOCHVÍL

Redakční kruh

Editorial Board

J. BAREK, Z. BĚLOHLAV, P. DRAŠAR, J. HETFLEJŠ, P. HOLÝ, J. HORÁK, P. CHUCHVALEC,
J. PODEŠVA, P. RAUCH, J. VOLKE

Zahraniční a oblastní redaktoři

Foreign and Regional Editors

F. ŠVEC (USA), V. VĚTVIČKA (USA), L. OPLETAL (HRADEC KRÁLOVÉ), P. TARKOWSKI (OLOMOUC)

Redakční rada

Advisory Board

E. BORSIG, M. ČERNÁ, L. ČERVENÝ, E. DIBUSZOVÁ, J. HANIKA, Z. HAVLAS, I. KADLECOVÁ, J. KÁŠ, J. KOUBEK,
T. MÍŠEK, J. PACÁK, V. PAČES, O. PALETA, V. RŮŽIČKA, I. STIBOR, V. ŠIMÁNEK, R. ZAHRADNÍK

Výkonná redaktorka

Editorial Assistant

R. ŘÁPKOVÁ

Ročník 100 (2006)

Volume 100 (2006)

Listy chemické, ročník 130 – Časopis pro průmysl chemický, ročník 116

Str. 477– 1127

ISSN 0009-2770

