

## Polysacharidy, jejich význam a uplatnění

V přírodě je každým rokem syntetizováno  $4 \cdot 10^{11}$  tun sacharidů převážně ve formě polysacharidů. Polysacharidy patří mezi biologické polymery, které mají důležitou úlohu při stavbě rostlin, živočichů, hub a mikroorganismů (celulosa, chitin, pektin, hemicelulosa) a jsou zdrojem energie pro různé biochemické reakce (škrob, fruktany). Mohou se také zúčastňovat dalších procesů, např. ovlivňují srážlivost krve (heparin) nebo hospodaření s vodou (rostlinné gummy a slizy). Kromě polysacharidů se v přírodě vyskytují proteoglykany, což jsou makromolekuly vyskytující se živočišných organismech. Jsou tvořeny glykosaminoglykany kovalentně vázané na protein. Nacházejí se uvnitř buňky, jsou součástí buněčné stěny a mimobuněčné matrice. Na základě velké rozmanitosti proteoglykanů se usuzuje na řadu jejich biologických funkcí, ale pouze část těchto funkcí byla doposud vysvětlena. Zřejmě nejdále postoupil výzkum funkce proteoglykanů nervových tkání.

Z krátkého přehledu vyplývá, jakými odlišnými vlastnostmi se polysacharidy vyznačují, přičemž na jejich tvorbě se podílí pouze několik monosacharidů a jejich derivátů, převážně D-glukosa, D-galaktosa, D-mannosa, 2-amino-2,6 deoxyglukosa, L-arabiosa, D-xylosa a D-galakturonová kyselina. Tyto monosacharidy se vyskytují jako  $\alpha$  nebo  $\beta$  anomery a jsou nejčastěji vázány ( $1 \leftrightarrow 4$ ) glykosidovými vazbami. Zejména stavební polysacharidy jsou lineární, avšak obecně mohou být polysacharidy více či méně větveny.

Polysacharidy mají nejen nepostradatelný význam v přírodě, ale také mají široké využití v potravinářství, farmacii a v dalších průmyslových odvětvích. Např. celulosa, nejrozšířenější stavební polysacharid rostlin, je základem papíru, textilních tkanin, stavebních hmot, její deriváty se používají jako zahušťovací prostředky do potravin a jsou důležitou součástí různých forem léků. Škrob, který je nejrozšířenější zásobní polysacharid rostlin, má často podobné použití jak v nativní formě, tak ve formě derivátů, jako celulosa. Deriváty škrobu, tzv. hydrokoloidy na míru, se používají do desertů, zmrzlin, cukrovinek, zahušťují omáčky, různé dresinky a kečupy, a mimo jiné jsou součástí uzenin a masných výrobků.

Pektin je v přírodě součástí buněčné stěny rostlin a patří nejen k nejrozšířenějším polysacharidům v přírodě, ale podobně jako škrob nebo deriváty celulosy, se široce používá v potravinářském průmyslu, např. jako výborná želírující látka. Pektin snižuje obsah cholesterolu v krvi a má také schopnost vázat ionty těžkých kovů. Chemické modifikace molekuly mohou výrazně měnit jeho vlastnosti a umožnit nová použití, dosud však toho, na rozdíl od škrobu, nebylo náležitě využíváno. Pektin má některé výhody proti škrobu vyplývající z přítomnosti částečně esterifikovaných karboxylů v jeho molekule. Tyto skupiny jsou vhodné pro snadné chemické modifikace (transesterifikace, amidace), které mohou vést k výrazným změnám fyzikálně-chemických a biologických vlastností vzniklých derivátů. Hydrofobně upravené deriváty pektinů vznikají vazbou nepolárních skupin na pektinové makromolekuly pomocí alkylace, acylace, esterifikace nebo amidace. Tyto deriváty nacházejí uplatnění při stabilizaci emulzí nebo pro zachycování a odstraňování nepolárních molekul, např. uhlovodíků, tuků, cholesterolu a žlučových kyselin. Pektin je v lidském těle dobře fermentovatelný sub-

strát, proto je rozštěpen již v přední části tlustého střeva. Nádory a záněty však vznikají v dolní části tlustého střeva. Chemická derivatizace pektinu může snížit jeho dostupnost pro mikroorganismy a modifikovaný pektin by mohl být fermentován podél celého tlustého střeva a tím ho chránit. Amidace pektinu navíc zvýší jeho afinitu k žlučovým kyselinám a tukům. Dalším příkladem využití modifikovaného citrusového pektinu spočívá v tom, že blokuje galektin-závislou adhezi nádorových buněk na povrchu zdravé tkáně, a tím zabraňuje metastázi.

Důležitým příkladem polysacharidu s širokým spektrem využití v průmyslu a medicíně je chitin a chitosan. Chitin je po celulóse druhým nejvíce se vyskytujícím přírodním biopolymérem. Na rozdíl od celulosy však neobsahuje glukosu, ale její derivát N-acetylglukosamin. Je hlavní složkou exoskeletu bezobratlých živočichů (krabů, koryšů, měkkýšů, chobotnic), buněčných stěn hub (plísní, kvasinek, vyšších hub) a vyskytuje se i v krovkách hmyzu. Komerční chitin se získává především z odpadních produktů vzniklých při zpracování mořských živočichů. Chitosan, deacetylovaná forma chitinu, se pro své význačné vlastnosti používá v mnoha průmyslových oborech, zejména v potravinářství jako součást potravinových doplňků a přípravků na snížení hmotnosti.

Skupina polysacharidů, která je v současné době hojně studována, jsou  $\beta$ -glukany<sup>1</sup>. Tyto polysacharidy mají hlavní řetězec tvořený glukosou vázanou  $\beta$  glykosidovou ( $1 \leftrightarrow 3$ ) vazbou a jsou podle původu více či méně větveny vazbou ( $1 \leftrightarrow 6$ ).  $\beta$ -Glukany jsou součástí buněčných stěn rostlin, mikroorganismů a vyšších hub. Poměrně vyšší obsah těchto polysacharidů mají nesladovnícké ječmeny. Předmětem zkoumání je schopnost  $\beta$ -glukanů příznivě ovlivňovat imunitní systém člověka a snižovat hladinu cholesterolu v krvi, takže tyto polysacharidy mají v současné době uplatnění v potravinářských doplňcích, avšak intenzivně se ověřuje jejich využití ve farmacii.  $\beta$ -Glukany jsou také součástí kosmetických krémů, kde mají za úkol vázat vodu, působí jako antioxidanty a uklidňují podrážděnou pleť.

Studium polysacharidů je z mnoha hledisek zajímavá oblast chemie. Příroda je nevyčerpatelným zdrojem těchto látek, které nacházejí buď přímo nebo po chemické nebo enzymové úpravě celou řadu nových uplatnění, občas diskutabilních, příkladem mohou být náhrady tuků (fat mimetics) v potravinách. Zřejmě nejvíce komplikované, ale zároveň nejvíce vzrušující, je objasnění úlohy a významu proteoglykanů či glykoproteinů.

Ústav chemie a technologie sacharidů na Vysoké škole chemicko-technologické (VŠCHT) se již řadu let zabývá studiem struktury a modifikace polysacharidů. Pozornost je zejména soustředěna na pektin, chitin a  $\beta$ -glukany vyšších hub. Tento výzkum probíhá ve spolupráci s řadou pracovišť VŠCHT, Ústavem živočišné genetiky a fyziologie AV, Ústavem makromolekulární chemie AV a Výzkumným ústavem potravinářského průmyslu. Výzkum je podporován projekty Grantové agentury ČR, Fondem rozvoje vysokých škol a výzkumnými záměry VŠCHT.

Jana Čopíková, Andryi Synytsya

1. Větvicka V.: Chem. Listy 98, 963 (2004).

## STRUKTURNÍ BOHATSTVÍ A BIOLOGICKÝ VÝZNAM LIGNANŮ A JIM PŘÍBUZNÝCH ROSTLINNÝCH FENYLPROPANOIDŮ

JURAJ HARMATHA

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Flemingovo  
nám. 2, 166 10 Praha 6  
harmatha@uochb.cas.cz

Došlo 2.1.04, přepracováno 19.5.05, přijato 12.6.05.

Klíčová slova: rostlinné fenoly, polyfenoly, lignany, neolignany, norlignany, enterolignany, flavonoidy, stilbeny, stilbenoidy, fytoalexiny, fytoestrogeny, fytofarmaka, nutraceutika

### Obsah

1. Úvod
2. Rostlinné fenoly, polyfenoly a fenylylpropanoidy
3. Lignany, neolignany, norlignany a lignin
  - 3.1. Známé biologicky účinné a klinicky využívané lignany
  - 3.2. Fytoestrogeny lignanového typu a enterolignany rostlinného původu
4. Závěr

### 1. Úvod

Fenylylpropanoidy tvoří velkou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů, pozoruhodných svojí bohatou strukturní variabilitou a velmi širokým rozsahem biologických funkcí a účinků, a to jak v rostlině samotné, tak i v působení na jiné organismy. Chemická rozmanitost fenylylpropanoidů, jakož i ostatně rozmanitost všech sekundárních metabolitů rostlin, není náhodná. Je výsledkem specificky vyvinutých a řízených biogenetických drah, které se jednoznačně promítají do příslušných rostlinných metabolismů<sup>1,2</sup>. Převážná většina sekundárních metabolitů je produkována jen poměrně nepočtenými metabolickými drahami, vedoucími k jednomu nebo k značně omezenému počtu klíčových metabolitů. Z nich pak vzniká velký počet derivátů a konjugátů převážně jednoduchými, ovšem také často specifickými, enzymovými transformacemi. Pozornost je zde věnována převážně běžným, ale také některým zvláštním fenylylpropanoidům. K jejich nejpočetnějším a zároveň i nejvýznamnějším zástupcům patří lignany, flavonoidy, kumariny, rotenoidy a stilbeny. Pro ilustraci byly zde vybrány právě lignany, které vhodně reprezentují celou velkou rodinu sekundárních metabolitů fenolického typu. K lepšímu pochopení jejich funkce a významu v rostlinách pomůže znalost jejich postavení v opravdu široké škále a struktuře sekundárních metabolitů, a to jak

z hlediska jejich chemických vlastností, tak i z hlediska jejich biologických účinků.

Sekundárním metabolitům se obvykle věnovala menší pozornost než metabolitům primárním nebo dalším ekonomicky, farmakologicky a jinak zajímavým přírodním látkám. V poslední době se ovšem zájem zvýšil i o běžné sekundární metabolity, i když nemají primární význam pro přežití samotného organismu. Mají ovšem zásadní význam pro přežití biologického druhu, a tím i pro ekologické vztahy a fylogenetický vývoj v přírodě<sup>3,4</sup>.

Význam sekundárních metabolitů rostlin je komplexní a zkoumá se z různých hledisek. Jedním z velmi důležitých hledisek je právě chemická ekologie. V ní jde hlavně o chemické interakce mezi rostlinou a organismem, který je na ní závislý. Je to vztah hosta a hostitele. Hostem může být parazit nebo partner v symbióze. Někdy jde jenom o vztah konkurenta v životním prostředí. Existuje ovšem mnoho typů, a tím i mnoho zkoumaných modelů takovýchto interakcí. Nejznámějšími jsou interakce: rostlina – mikroorganismus (sem patří např. výzkum fytoalexinů) nebo rostlina – rostlina (například výzkum allelopatické účinnosti plevelů na užitkové rostliny), anebo rostlina – býložravec (obvykle jím je herbivorní hmyz).

Vztah rostlina – hmyz je vhodným modelem, kde se dá funkce sekundárních metabolitů velmi dobře a bezprostředně studovat<sup>3,4</sup>. Koevoluce rostlin a hmyzu vytvořila totiž velmi rozsáhlou a složitou škálu specifických chemických interakcí. Je zřejmé, že herbivorní hmyz reaguje na velký počet chemických složek rostlin, které pak mohou indukovat různé změny v chování, jiné zase v růstu, vývoji a rozmnožování. Je to velká rozmanitost biologických účinků, ale ještě větší je rozmanitost chemických struktur, které tyto účinky způsobují. Z hlediska účinků je lze dělit do několika skupin<sup>5</sup> (Tab. I).

#### Tabulka I

Bioaktivní rostlinné látky působící na vztahy mezi rostlinami a hmyzem

- A. Regulátory chování – semiochemikalie (s účinkem informačním)
  1. Kairomony – atraktanty, arestanty, stimulanty
  2. Alomony – repelenty, deterenty, antinutrienty
  3. Rostlinné složky a prekurzory feromonů
- B. Regulátory růstu a vývoje (s účinkem fyziologickým / farmakologickým)
  1. Juvenoidy – rostlinné analogy juvenilního hormonu
  2. Fytoekdysteroidy – rostlinné analogy metamorfozního hormonu
  3. Chemosterilanty a antihormonální látky
  4. Přírodní insekticidy a rostlinné toxiny

Z hlediska chemické struktury se v interakci mezi rostlinami a hmyzem uplatňují téměř všechny typy nízkomolekulárních přírodních látek: alifatické látky, terpenoidy, steroidy, alkaloidy, fenoly, peptidy, i mnohé jejich deriváty, nejčastěji estery, glykosidy nebo saponiny<sup>3-5</sup>. Tyto deriváty nebo jiné konjugáty se stávají aktivními často až po uvolnění aktivní složky. Tak velká komplexnost struktur a vztahů umožňuje uplatnění celé říše analytických postupů, izolačních technik, strukturně analytických metod, chemických transformací a syntéz analogů pro určení strukturně-aktivitních vztahů, pro objasnění problémů synergismu a pro odlišení vlastních nativních aktivních látek od jejich artefaktů.

## 2. Rostlinné fenoly, polyfenoly a fenylpropanoidy

Oprávněně se předpokládá, že úspěch vývojové adaptace rostlin na souši vděčí jejich schopnosti tvořit různorodé fenolické látky, zejména oligo- a polymerní, rovněž i kombinované s látkami jiného biogenetického původu. Právě rostlinné fenoly posloužily rostlinám jako jejich stavební, strukturní složky, a to od buněčných stěn až po jednotlivé jejich orgány. Staly se nepostradatelné též jako obranné látky (chránící před chladem, škůdci, infekcemi, mechanickým poškozením a jiným stresem<sup>6</sup>), signální látky (lákačící opylovače a odpuzující škůdce<sup>4</sup>), vonné, chuťové a barevné látky květů a plodů (podnětné pro vznik

symbiózy s jinými organismy<sup>7</sup>), stavební látky dřeva a kůry rostlin (pro zajištění vzrůstu, trvanlivosti a zároveň i ochrany před škůdci, slunečným zářením či vysušením<sup>8</sup>). Tyto a další zde neuváděné funkce rostlinných fenolů zajišťují trvalé přežívání všech typů cévnatých rostlin. I kvantitativní pohled na rostlinné fenoly je impozantní. Soudí se, že asi 40 % veškerého organicky vázaného uhlíku, cirkulujícího v biosféře, tvoří fenolické struktury, a to jak v živých rostlinných organismech, tak v jejich odumřelých, rozkládajících se částech, vytvářejících životodárnou půdu pro mnohé mikroorganismy i pro svoji vlastní reprodukci<sup>2</sup>.

Rostlinné fenoly jsou obecně charakterizovány jako aromatické sekundární metabolity, které mají (nebo původně měly) jeden nebo více hydroxylů vázaných přímo na aromatickou (fenylovou) část molekuly, tudíž hydroxylů s charakteristickými „kyselými“ vlastnostmi. Tato jejich vlastnost byla, a dosud je, využívána pro jejich detekci, izolaci i chemickou transformaci. Je také zdrojem chemické reaktivity a často i biologických aktivit rostlinných fenolů. Polyhydroxylované fenoly (nyní už běžně, ovšem ne zcela přesně nazývané polyfenoly), zvláště ty s hydroxylly v *orto*- či *para*- uspořádání, jsou navíc zdrojem četných oxidoredukčních reakcí a základem pro tvorbu oligomerů, polymerů či derivátů (konjugátů) s jinými molekulami. Příkladem mohou být taniny, katecholaminy a lignin. Pojem polymerních fenolických látek není totožný s pojmem polyfenolů, který se stále častěji objevuje nejen v biologické, ale už i chemické odborné literatuře, ba i v názvech některých specializovaných vě-

Tabulka II

Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách seřazené podle počtu uhlíků. Modifikováno podle<sup>3, 10</sup>

Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek	Příklady
C <sub>6</sub>	6	jednoduché fenoly, benzochinony	katechol, hydrochinon
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	7	fenolické kyseliny / aldehydy	kyselina salicylová
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	8	acetofenony, benzofurany	isobenzofuranon
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	9	fenylpropanoidy, benzopyrany (kumariny)	viz obr. 7, chromen
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	10	naftochinony	juglon, plumbagin
C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub>	11	ageratochromeny (prekoceny)	prekocen I, II
(C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	12	dibenzofurany, dibenzochinony, bifenyly	difenyleter, PCB
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	13	dibenzopyrany, benzofenony, xantony	difenylmetan, fluoren
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	14	stilbeny, antrachinony, fenantreny	resveratrol, emodin
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	15	flavonoidy, izoflavony, chalkony, aurony	kvercetin, genistein
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>6</sub>	16	norlignany (difenylbutadieny)	viz obr. 6, hinokiresinol
C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	17	norlignany (conioidy)	viz obr. 6, sugiresinol
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	18	lignany, neolignany	viz obr. 1, 5, 8 a 9
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	30	biflavonoidy	amentoflavon
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	<i>n</i>	kondenzované taniny (flavolany)	gallotaniny, ellagitaniny
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	<i>n</i>	ligniny	viz obr. 7
(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	<i>n</i>	katecholmelaniny	rostlinné pigmenty

deckých konferencí nebo společností<sup>9</sup>.

Polyfenoly jsou látky obsahující několik fenolických funkčních skupin na jednotlivých aromatických jádrech molekuly (někdy jen na jádře jediném). Nejběžnější typy rostlinných fenolických látek lze přehledně klasifikovat např. podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb<sup>10</sup> (viz Tab. II). Všechny typy uvedené v této modifikované tabulce mohou tvořit polyfenoly nebo jejich methoxy-, methylenedioxy-, acyloxy- a mnoho dalších derivátů.

Většina rostlinných polyfenolů je produktem fenylylpropanové (šikimátové) a fenylylpropanoidacetátové biosyntetické dráhy<sup>1,2</sup>. Mnohé z nich, především však fenylylpropanoidy, mají důležitou roli jak z hlediska chemoeologického<sup>6,7,11,12</sup>, tak i farmakologického<sup>9,10,13</sup>. Proto na sebe už odedávna, a to až dodnes, poutají nemalou pozornost badatelů.

Fenylylpropanoidy velmi názorně reprezentují šíři a bohatost struktur v rámci jediného strukturního typu sekundárních metabolitů. Z hlediska účinků, jak je členěn v Tab. I, jsou fenylylpropanoidy, na rozdíl od většiny jiných, často úzce a specificky se řadících typů, široce zastoupené téměř ve všech kategoriích, od nízkomolekulárních, a tudíž též atraktivních a repelentů, přes větší a polárnější molekuly potravních regulátorů (deterenty a antinutrienty), až po specifické juvenoidy a receptorové antagonisty ekdysteroidů, antihormonální látky, chemosterilanty a toxiny, anebo komplexní látky interferující s tvorbou a svlékáním hmyzí kutikuly.

Fenylylpropanoidy vznikají jen malým počtem několika základních biogenetických drah, vedoucích k omezenému počtu klíčových meziproductů. Šikimátová dráha produkuje největší počet jejich základních strukturních typů<sup>14</sup>.

#### Typy (A–C)

odvozené od způsobu spojení fenylylpropanových jednotek:

- dibenzylbutanový typ (A)
- aryltetralinový typ (B)
- dibenzocyklooktanový typ (C)

#### Formy (I–VIII)

odvozené od stupně oxidace (I–V) a od struktury epoxidu (VI–VIII)

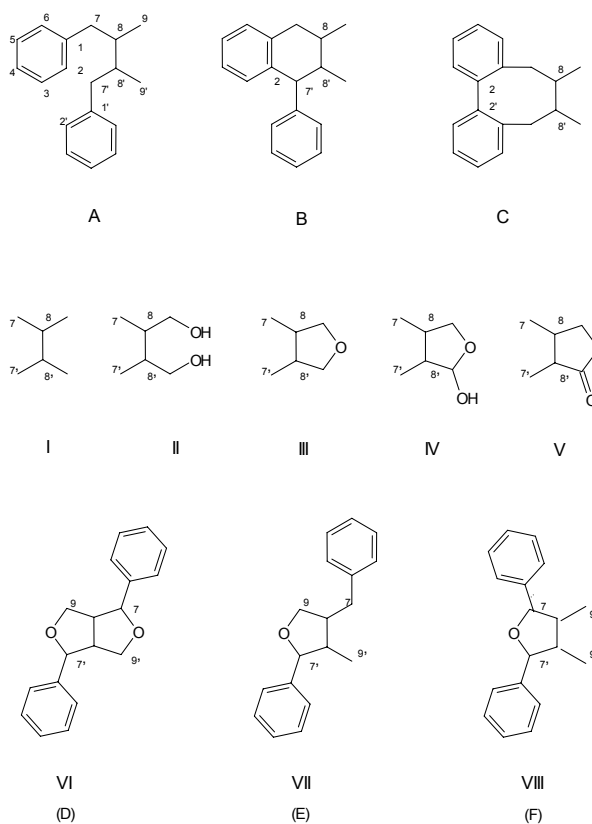
- butanová forma (I)
- butandiolová forma (II)
- 9,9'-epoxy forma (III)
- hemiacetalová forma (IV)
- butanolidová forma (V)
- bis-epoxy forma (VI)
- 7,9' / 7',9-epoxy forma (VII)
- 7,7'-epoxy forma (VIII)

Formy VI–VIII tvoří samostatné typy (D–F)

Z těch pak dále vzniká mnoho stovek až tisíců tzv. periferních derivátů, obvykle jednoduchými enzymatickými transformacemi. Z hlediska biogeneze je tudíž vznik fenylylpropanoidů odvozen od kyseliny šikimové. Základním klíčovým meziproductem biosyntézy je pak kyselina skořicová nebo její biogenetické ekvivalenty, t.j. hydroxyderiváty: kyselina *p*-kumarová a kávová, či jejich methoxyderiváty: kyselina ferulová a sinapová<sup>1,15</sup>. Z těchto klíčových látek vznikají další klíčové meziproducty druhého stupně čtyřmi mechanismy: prodloužením propanového řetězce substitucí, prodloužením a cyklizací, zkrácením řetězce a redukcí dvojně vazby řetězce. Tyto druhoplánové metabolity se pak dále diverzifikují specifickými hydroxylacemi, metoxylacemi, dehydrogenacemi, fenoloxidacemi, esterifikacemi, glykosylacemi, radikálovými oligomeracemi apod. V případě jen jediné skupiny fenylylpropanových derivátů může tak narůst jejich počet i do stovek (např. u lignanů).

### 3. Lignany, norlignany, neolignany a lignin

Lignany tvoří jednu z bohatě zastoupených, biogeneticky příbuzných a tudíž i strukturně vymezených a charakteristických skupin fenylylpropanoidů<sup>16</sup>. Jejich struktura je podmíněna jejich vznikem z redukované formy základních, biogeneticky klíčových meziproductů šikimátové



Obr. 1. Strukturní typy a formy lignanů

dráhy, t.j. z alkoholů pocházejících z kyseliny skořicové, *p*-kumárové a dalších biogenetických ekvivalentů<sup>17</sup>. Lignany jsou striktně definovány jako dimery vzniklé oxidativní dimerizací dvou fenylypropanových jednotek spojených centrálními uhlíky jejich propanových bočních řetězců v polohách C-8 a C-8' (viz struktury na Obr. 1). Propojením dalších vazeb C-C a C-O, za spoluúčasti propanových částí molekuly v různém oxidačním stupni, vznikají všechny možné strukturální typy a formy lignanů<sup>17,18</sup>, přehledně znázorněné na Obr. 1.

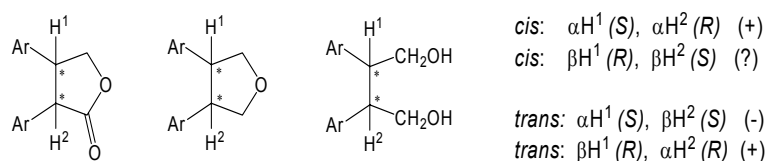
Jak je vidět na Obr. 1, tak dvě fenylypropanové jednotky spojené bočními řetězci v polohách C-8 a C-8' mohou formálně tvořit jen omezený počet strukturálních typů (A až C). Další oxidace propanových jednotek a jejich následná cyklizace může vést ke vzniku hydroxy-, oxy- nebo oxoformem u každého z typů A–C. Jsou to formy: I–VIII. Je zřejmé, že formy VI–VIII mohou vznikat jenom z typu A příslušnými *mono* nebo *bis* epoxidacemi. Tyto strukturálně specifické formy (VI–VII) lze vlastně považovat za samostatné typy (D–F) (cit.<sup>18</sup>). Další strukturální variabilita uvnitř jednotlivých typů a forem vzniká pak ještě zavedením jedné nebo dvou dvojných vazeb do butanové části molekuly, nebo také přítomností různého druhu a počtu substituentů (nejčastěji hydroxylů, methoxylů, methylenedioxykupin a glykosylů a jejich kombinací) na aromatické, v některých případech i alifatické části molekuly.

Následnými transformacemi lignanů se pak rozšiřuje jejich strukturální variabilita o další příbuzné struktury, jakými jsou norlignany<sup>19</sup> nebo conioidy<sup>20</sup>. Všechna jiná spojení dvou fenylypropanových jednotek pak tvoří příbuzné struktury nazývané neolignany. Biosyntéza, která kombinuje fenylypropanoidy s látkami jiného biogenetického původu (např. s terpenoidy), poskytuje takzvané hybridní lignany (nebo lignoidy) (cit.<sup>19</sup>). Celá lignanová rodina látek přesahuje už tisícovku jedinců a neustále jsou publikovány další nové látky tohoto typu.

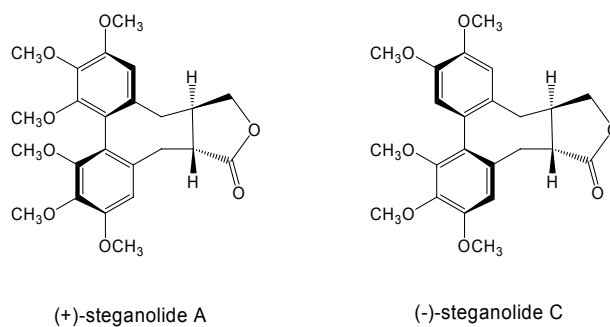
#### Stereostruktura lignanů

Spojení dvou fenylypropanových jednotek u lignanů typů A–C (z Obr. 1) může poskytnout čtyři stereochemické varianty (Obr. 2).

Pro lepší názornost jsou jednotlivé dvojice konfigurací (*R*) a (*S*) uvedeny také v obvyklých relativních pozicích, t.j.  $\alpha$  (směřující pod rovinu) a  $\beta$  (nad rovinu nákresu). Ve skutečnosti se přírodní lignany vyskytují ve všech variantách, ovšem ve velmi rozdílném početním zastoupení<sup>21</sup>. Méně početnou je varianta *cis* ( $\alpha H^1$ ,  $\alpha H^2$ ), vyznačující se kladnou molární optickou rotací<sup>21</sup> a téměř výjimečnou je druhá varianta *cis* ( $\beta H^1$ ,  $\beta H^2$ )<sup>16</sup>. Nejpočetněji jsou přírodní



Obr. 2. Konfigurace sterického uspořádání vazeb uhlíků C-8 a C-8' u lignanů typu A–C



Obr. 3. Sterické uspořádání steganolidů (lignanů typu C)

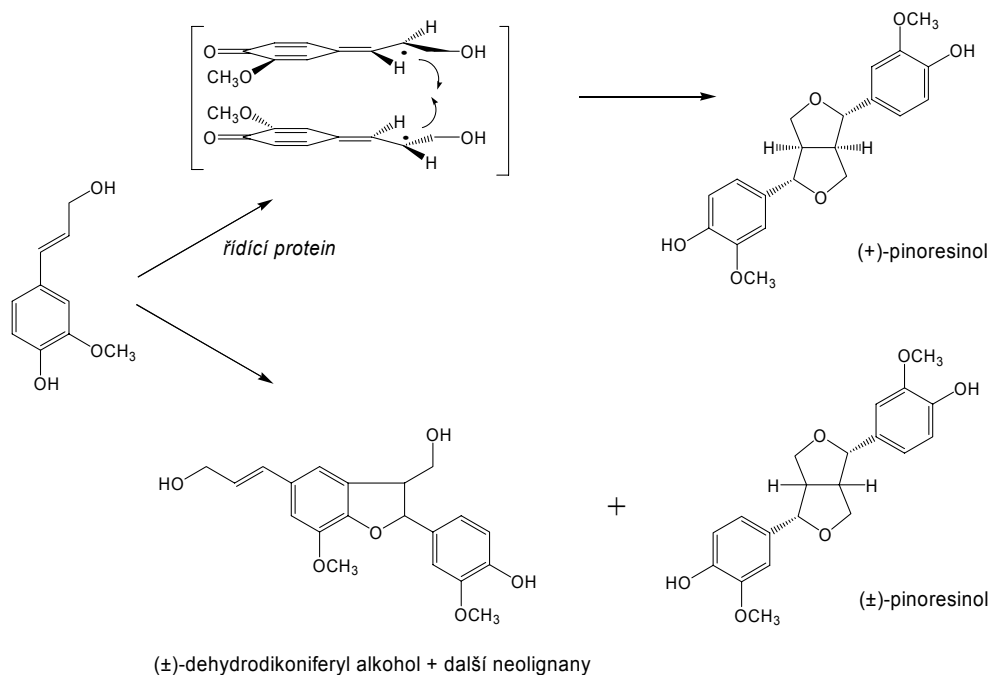
lignany zastoupeny ve variantě *trans* ( $\alpha H^1$ ,  $\beta H^2$ ), vyznačující se zápornou optickou rotací<sup>21,22</sup>. Druhá *trans* ( $\beta H^1$ ,  $\alpha H^2$ ) varianta, vesměs s kladnou rotací, byla nalezena jenom v malém počtu zastoupení<sup>16</sup>. Malý nebo výjimečný počet zastoupení některých variant by mohl naznačovat, že se jedná o artefakty vzniklé při nešetrné izolaci nebo jiné manipulaci. Později však byla stereochemická diverzita lignanů objasněna tím, že mechanismus biosyntézy se různí v závislosti na orgánové specifitě, resp. specifitě enzymů (isozymů), podílejících se na stereochemickém řízení vzniku lignanů v jednotlivých orgánech rostliny<sup>22</sup>. Arylteralínový typ B (Obr. 1) má navíc ještě jedno centrum chiralitě na uhlíku C-7' vzniklé spojením fenolické části jedné jednotky s alifatickou částí té druhé. Obě možné konfigurace bývají v přírodních lignanech tohoto typu hojně zastoupené<sup>16</sup>.

U dibenzocyclooktanového typu C (z Obr. 1) přibývají ještě další dvě varianty stereostruktury (Obr. 3).

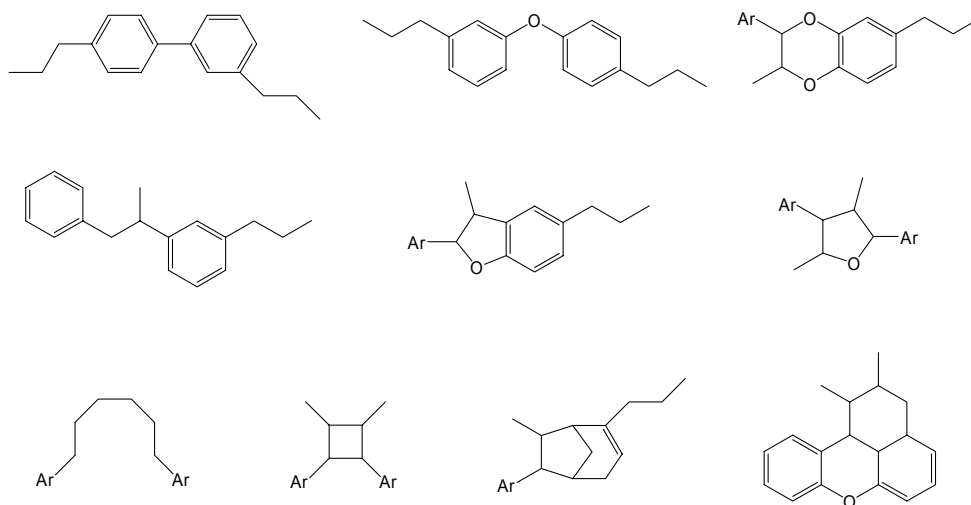
Existence a stabilita této chiralitě není vyvolána jenom přítomností velkých substituentů ve vzájemně blízkých polohách (viz steganolide A), ale je vynucena poměrně rigidní konformací připojeného osmičlenného kruhu, na kterém je vázán pětičlenný lakton v pevné obálkové konformaci<sup>16</sup>. Laktonem vynucená konformace anelovaných kruhů se projevuje dokonce až u desetičlenných kruhů seskviterpenických laktonů<sup>23</sup>. Stereochemie lignanů je velmi dobře probádaná na většině možných stereoisomerů, získaných cílenou chemickou transformací nebo stereoselektivní syntézou<sup>16</sup>.

Sterické uspořádání u typů D–F (na Obr. 1) je formálně jiné, ale principiálně navzájem si podobné. Je patrně řízené stejnými mechanismy<sup>24</sup>. Rozhodujícím prvkem, který ovlivňuje vznik jen určitých stereospecifických forem, je usměrnění biosyntézy řídicím proteinem<sup>25</sup> (Obr. 4).

Tento názor vznikl právě proto, aby bylo možné vy-



Obr. 4. Řídícím proteinem usměrněná biosyntéza lignanů



Obr. 5. Výběr některých charakteristických typů neolignanů

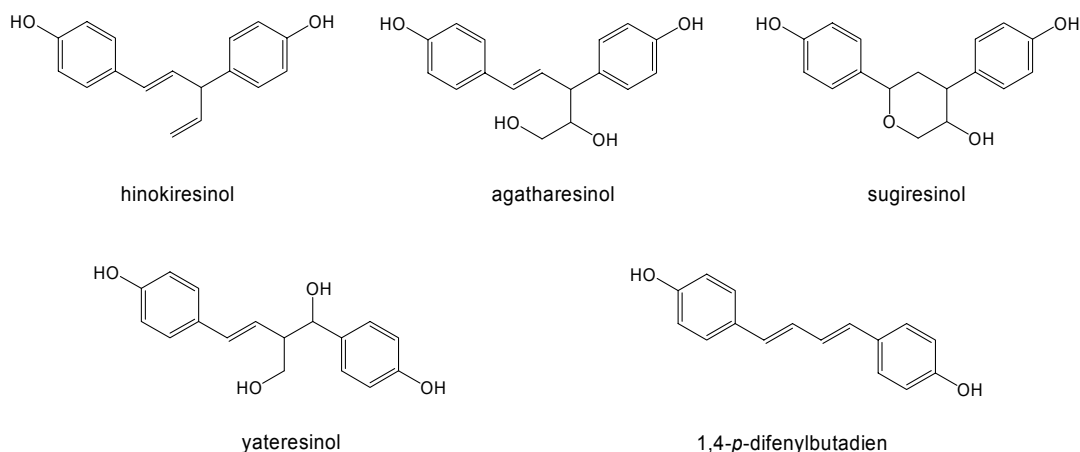
světlit situaci, že oxidací vzniklé radikály produkují jen omezené stereofomy a nikoliv všechny možné formy. Spoluúčast doplňkového řídicího proteinu umožnila nejen vysvětlit tento jev, ale ho i experimentálně potvrdit<sup>26</sup>. Důkaz byl proveden tím, že za účasti takového proteinu vznikl oxidativně vyvolanou radikálovou dimerizací jenom (+)-pinoresinol (jeden z enantiomerů lignanu typu D), kdežto bez účasti řídicího proteinu vznikl racemický pino-

resinol a vedle něj i racemický dehydrodikoniferylalkohol a další neolignany. Řídící protein je tedy odpovědný nejen za stereostrukturu, ale i za samotný vznik lignanů. Jiné než lignanové spojení může být totiž důsledkem právě jen neřízených vazeb, jako např. u neolignanů nebo ligninu. Zatím není známo, jak řídicí protein váže a orientuje substrát. Jeho součinnost však vysvětluje, proč vzniká jen omezené množství stereospecifických forem lignanů.

**Neolignany**

Všechny jiné než z definice lignanů vyplývající spojení fenylypropanových jednotek dávají možnost vzniku dimerů nejrozličnějšího typu<sup>24</sup> (Obr. 5). Je to např. přímé spojení fenyly, nebo jejich spojení skrz jednu resp. dvě etherové vazby, nebo kombinace přímé a etherové vazby, nebo vazba fenyly z jedné a bočního řetězce z druhé jednotky (a to ve všech možných polohových kombinacích), nebo spojení bočních řetězců v polohách jiných než je výhradně pro lignany definována vazba C-8 a C-8'. Tato spojení fenylypropanových jednotek výrazně rozšiřují strukturní variabilitu bis-fenylypropanoidů, a na rozdíl od již dříve definovaných lignanů, byly nazvány neolignany<sup>27</sup>.

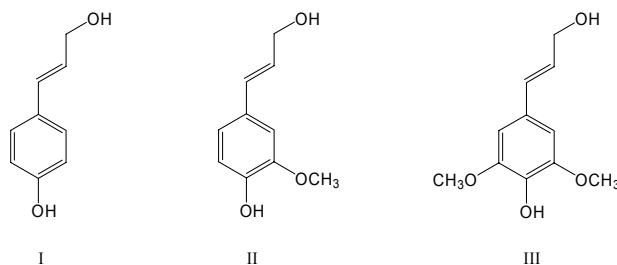
V kombinaci s redukcí vazeb a cyklizací mohou vznikat ještě varianty, jejichž původní fenylypropanové jednotky lze odhalit jen pozorným rozбором struktury (viz poslední dva příklady na Obr. 5). Z toho vyplývá, že neolignanů by mohlo být v přírodním materiálu mnohem víc než lignanů. Zatím tomu tak není. Může to být tím, že neregulovaných biosyntetických drah je méně než těch regulovaných. Může to být také jen určitým zpožděním ve výzkumu neolignanů, jejichž rutinní strukturní analýzu umožnily až dokonalejší strukturně analytické metody posledních dvou dekad. Jejich biologické účinky oproti účinkům lignanů jsou zatím také méně probádané<sup>28</sup>.



Obr. 6. Nejznámější norlignany (conioidy) odvozené od kyseliny plikatinové

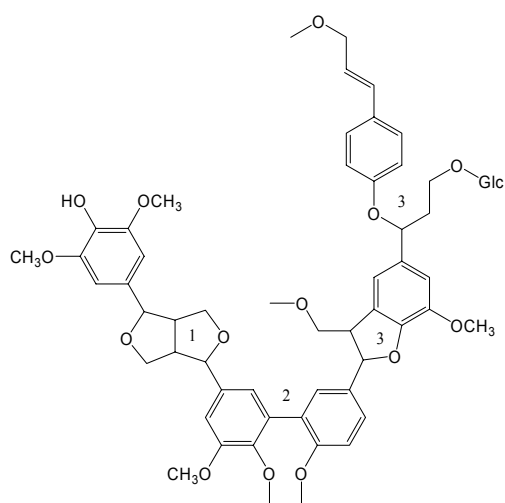
Základní fenylypropanové jednotky ligninu:

- *p*-kumaroylalkohol (I)
- konyferylalkohol (II)
- sinapylalkohol (III)



Charakter vazeb fenylypropanových jednotek tvořících základní skelet ligninu:

1. propan - propan (lignanový typ)
2. fenyly - fenyly (neolignanový typ)
3. propan - fenyly (neolignanový typ)



Obr. 7. Složky a vazby ligninů

**Norlignany**

Norlignany jsou sice svojí strukturou formálně více podobné neolignanům, biogeneticky jsou ovšem příbuzné lignanům<sup>19</sup>. Jsou to vlastně jejich deriváty s nižším počtem uhlíků a s různým počtem dalších, někdy i konjugovaných dvojných vazeb (Obr. 6). Biosyntéza norlignanů zatím není zcela objasněna<sup>29</sup>. Tyto látky však vznikají v procesu utváření jádrové části dřevin a také se generují při vadnutí, zasychání či poškozování jejich bělové části<sup>30</sup>. Mechanismus jejich vzniku předpokládá dodatečně nebo paralelně probíhající dekarboxylace a přesmyky v procesu tvorby nebo degradace lignanů<sup>20</sup>.

**Lignin**

Mimo dimerizace fenylypropanových jednotek mohou ovšem probíhat i jejich oligomerace spolu s dalšími přidruženými reakcemi<sup>31</sup>. U takto vzniklých spojení se uplatňují jak vazby lignanového, tak i neolignanového typu. Tři nejběžnější fenylypropanové jednotky jsou uvedeny na Obr. 7. Každá z připojených jednotek poskytuje pak funkční místa pro další možná spojení nebo derivatizaci. Tak vzniká různě velké sesítování, jak co do počtu vázaných jednotek, tak i co do počtu (hustoty) vazeb<sup>32</sup>. Takto vzniklé makromolekuly pak tvoří ligniny. Některé volné funkční skupiny těchto sítí mohou být glykosylovány nebo vázány na celulosu za vzniku lignocelulosových komplexů. Ty jsou pak základním stavebním prvkem dřevitých rostlin a umožňují stromům jejich mohutný vzrůst, pevnost, tvar a jiné charakteristické vlastnosti. Lignocelulosový komplex je základní surovinou pro celulosopapírenský

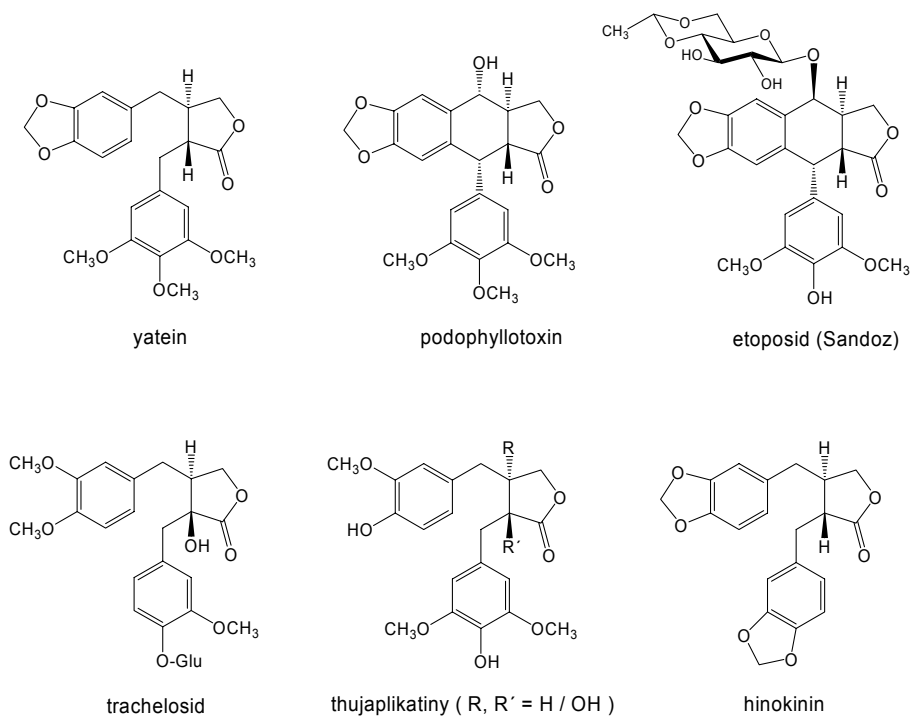
průmysl, který byl dlouhodobě výzkumnou základnou a hnací silou při studiu nejenom technologického, ale i chemického, biochemického a biologického výzkumu ligninu, lignanů a fenylypropanoidů všeho druhu.

**3.1. Známé biologicky aktivní a klinicky využívané lignany**

Lignany přitahovaly pozornost badatelů již odedávna. Jednak proto, že jsou hodně rozšířené v rostlinné říši, a také proto, že se vyznačují širokou škálou biologických účinků<sup>33</sup>. Zde nelze celou tu šíři zachytit, pouze ilustrovat určitým výběrem.

Obecně, biologická funkce lignanů zatím ještě nebyla plně identifikována. Existují ovšem důkazy, že lignany hrají nezanedbatelnou roli v chemických interakcích mezi rostlinami a houbami, rostlinami navzájem a rostlinami a hmyzem<sup>18</sup>, a to buď přímo nebo zprostředkovaně, formou synergismu s jinými účinnými rostlinnými látkami<sup>34</sup>. To znamená, že mají svůj význam v obranném systému hostitelských rostlin a ovlivňují tak symbiózu organismů na ekologické úrovni<sup>35</sup>. Prekurzory lignanů jsou také mezi produkty nebo komponenty tvorby ligninu, tudíž mohou hrát určitou roli i v regulaci růstu rostlin.

Lignany ovšem vykazují velmi rozmanité spektrum účinků i na vyšší organismy, včetně člověka<sup>16,28,36,37</sup>. Šíře jejich biologických vlastností předpokládá také šíři mechanismů účinků<sup>38</sup>. Tato šíře podněcovala již odedávna jejich výzkum, v současnosti se soustřeďuje především k prozkoumání strukturálně aktivitních vztahů, o zmapování mís-



Obr. 8. Známé biologicky aktivní lignany



ta jejich působení, no a v konečném důsledku i o vývoj nových farmakologických preparátů. Příkladem mohou být lignany yatein a podophyllotoxin<sup>39</sup> a jeho cíleně modifikované deriváty etoposid a teniposid<sup>16</sup> (Obr. 8), které dospěly až k aplikaci v klinické medicíně. Tato léčiva působí v širokém spektru chemoterapie rakoviny<sup>16</sup>.

Podophyllotoxin (Obr. 8) byl identifikován jako biologicky účinná, ovšem gastrointestinálně toxická obsahová látka dávno známé léčivé rostliny *Podophyllum peltatum*<sup>40</sup> (tzv. americké mandragory), kterou využívali už kolonisté amerického západu proti horečkám a různým parazitárním infekcím. Dobrá pověst této rostliny přetrvala až do současné doby. Její hlavní účinné složky (lignany) byly spolu s dalšími strukturálními analogy z jiných rostlinných zdrojů (např. yatein z tropické dřeviny *Libocedrus yateensis*<sup>20,21</sup> nebo jeho analogy z rostlin rodu *Piper*<sup>41</sup>, čeledi pepřovitých, *Piperaceae*) testovány v různých modelech vyhledávacích testů. Mnohé pak postoupily i do vyšších specializovaných předklinických a klinických testů. Některé byly po vhodně provedených chemických modifikacích (jako etoposid a teniposid), s vyšší účinností, nižší toxicitou a hlavně patentovatelnou přípravou, registrovány firmou Sandoz jako léčiva<sup>16</sup>.

Dalším příkladem biologické účinnosti lignanů je jejich antivirová aktivita<sup>42</sup>. Např. lignanový glukosid trachelosid (Obr. 8), původně izolovaný z rostlin rodu *Trachelospermum*<sup>43</sup>, byl spolu s dalšími analogy syntetizován a testován. V testech byla prokázána účinnost série těchto látek proti HIV-1 viru (cit.<sup>44</sup>). Trachelosid a jeho další blízké analogy (trachelogenin, carthamosid a carthamogenin) byly získány také ze známé léčivé rostliny sibiřského původu, pěstované a analyzované i u nás z parchy saflorové, *Leuzea carthamoides*<sup>18,34</sup>. Tato rostlina je zdrojem i dalších cenných a biologicky účinných látek terpenického, flavonoidního, serotonin-fenylpropanoidního<sup>45</sup> a steroidního (především ekdysteroidního<sup>46</sup>) typu, poskytujících regenerační, tonizující a anabolické účinky<sup>47</sup>.

Zajímavým příkladem biologicky účinných lignanů jsou thujaplikatiny (Obr. 8) a jejich deriváty<sup>48</sup> z dekorativní a stavbařsky významné dřeviny *Thuja plicata* (zerav řasnatý – western red cedar). Stavby z trámů této velmi trvanlivé dřeviny jsou díky lignanům, ale také příbuzným troplonům<sup>48</sup>, biochemicky nápadně odolné vůči dřevokazným houbám<sup>2,48</sup>. Třísky, hobliny či piliny této dřeviny se ve venkovských hospodářských staveních používaly v minulosti jako přírodní insekticidy<sup>34</sup>. Bohužel, jejich vedlejším účinkem (vinou přítomné kyseliny plikatové<sup>48</sup> – strukturálně příbuzné podophyllotoxinu) byly pak astmatické alergie lidí, vystavených dlouhodobému vlivu těchto prostředků<sup>49</sup>. Podobné látky byly identifikovány i v příbuzné dřevině východního původu *Cryptomeria japonica* (japonský cedr – Sugi) a *Chamaecyparis obtusa* (japonský cypřiš – Hinoki)<sup>48</sup>. Stovky let staré chrámy postavené z těchto dřevin stále odolávají houbám i termitům. Extrakty z hinoki slouží také jako surovina pro mnohé japonské medicínské, kosmetické a voňavkářské preparáty. Majoritní lignany těchto rostlin, především však hinokinin (Obr. 8) a jeho deriváty, vykazují nadprůměrnou hmy-

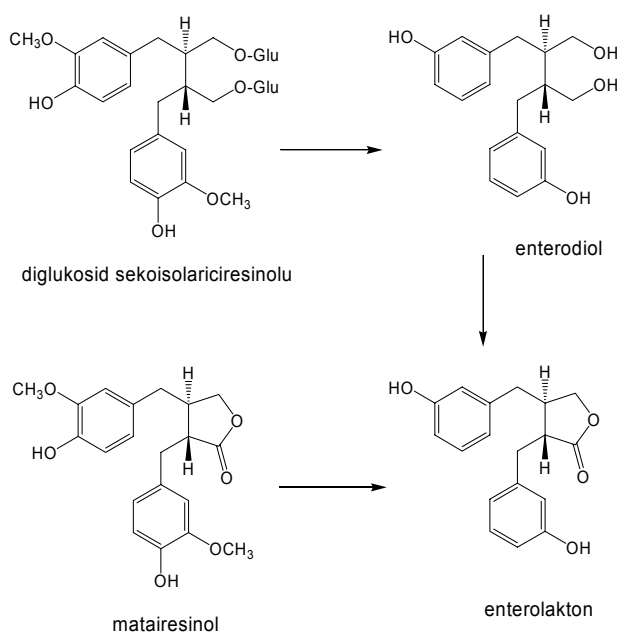
zí potravně regulační aktivitu<sup>18,34</sup> a významné imunomodulační účinky<sup>50</sup>, které jsou předmětem zájmu farmakologů i v současnosti.

Mimo thujaplikatiny (Obr. 8) a jim příbuzné lignany byly ve výše jmenovaných dřevinách identifikovány i lignanové deriváty s nižším počtem uhlíků (norlignany, Obr. 6), navíc mnohdy obsahující i konjugované dvojné vazby. Proto se některé z nich vyznačují nestálostí, vyplývající z možné oxidace na chinony, chinonmethidy a radikály, schopné tvorby následných produktů, mnohdy pestře barevných (od žluté přes oranžovou až k červené). Tyto látky dávají svým dřevinám patřicím do řádu *Coniferopsida* (odsud byl odvozen také jejich původní a chemotaxonomicky zdůvodnitelný název conioidy<sup>20</sup>) jejich neobvyklou barvu a odolnost<sup>51</sup>. Biogenetická souvislost norlignanů s thujaplikatiny je nápadně patrná a lze ji tudíž předpokládat, ba i mechanisticky vysvětlit spolupůsobením dekarboxylací a přesmyků na průběh dimerizace fenylpropanových prekurzorů<sup>20</sup>.

### 3.2. Fytoestrogeny lignanového typu a enterolignany rostlinného původu

Fenolická složka struktury je charakteristickým znakem estrogenních hormonů a jejich bioanalogů, počínaje tím nejúčinnějším estradiolem, jehož původně steroidní skelet je transformován v kruhu A na fenol. Mnohé další rostlinné polyfenoly mají také slabou estrogenní nebo antiestrogenní účinnost svědčící o jisté interakci s estrogenními receptory<sup>52</sup>. Tyto látky jsou si příbuzné nejen z hlediska své funkce, ale do značné míry i z hlediska své struktury. K nejznámějším patří látky odvozené od isoflavonoidů (genistein), kumarinů (kumestrol) a stilbenoidů (resveratrol)<sup>53</sup>. Látek s účinky agonistů či antagonistů estrogenu na zmíněném receptoru je však mnohem víc<sup>52</sup>. Patří mezi ně i lignany dibenzylbutanového typu (Obr. 1, typ A, především ve formách II a V). Vše začalo podivným nálezem lignanu enterolaktonu v tělních tekutinách těhotných žen<sup>54</sup> a pokračovalo identifikací jeho analogů enterolignanů<sup>55</sup>, objasněním jejich funkce, biogeneze i metabolismu<sup>52,56</sup>. Biologické účinky a původ těchto látek jsou dosud předmětem zájmu, především z hlediska potravinářského<sup>52</sup>, farmakologického<sup>57,58</sup>, či analytického<sup>55,59</sup>.

Lignany s fytoestrogenními účinky jsou bohatě zastoupeny v běžné rostlinné potravě: sóji, rýži, obilninách, vlákninách, oříchách, ovoci<sup>38</sup>, v menší míře ovšem také v nápojích, nutričně a gastronomicky tak významných, jakým je bílé a červené víno<sup>60</sup>. Lidstvo využívá tyto zdroje v celé své historii, ovšem s různou intenzitou. Některé zdroje jsou nepostradatelné a tudíž trvalé, některé se ve vlnách vytrácejí a vracejí, ovlivňované buď ekonomickou nutností nebo mediální/reklamní popularizací. Příkladem může být sekoisolariciresinol diglukosid ze lněných semen (s obsahem 0,9–3 %, podle kultivaru)<sup>61</sup>. Tato semena, jako vedlejší produkt lnu, byla v minulosti běžnou potravou a krmivem, stejně jako lněný olej, který byl ovšem průmyslovou revolucí degradován jen na výrobu fermeží,



Obr. 9. Enterolignany a jejich prekurzory, fytoestrogeny lignanového původu

linolea a margarínů. Přestože světová produkce lněných semen je stále asi 2,5 milionů tun ročně (čtvrtina z toho v Kanadě), nutriční využití lněných produktů vážlo. Až nyní se tyto produkty vracejí do povědomí lidí, hodně popularizované jako téměř všeléčící nutraceutika, aniž by byly jejich deklarované farmakologické a medicínální účinky uspokojivě objasněny. Známe je jen to, že matairesinol a sekoisolariciresinol (a i některé jiné lignany stejného strukturního typu) jsou prekurzory dvou prokázaných xeno-estrogenů: enterodiolu a enterolaktonu (Obr. 9).

Tyto dvě látky byly původně objeveny v moči, mateřském mléku i krevním séru žen (později i samic dalších primátů) v období těhotenství, laktace, nebo různých hormonálních změn či poruch<sup>54</sup>. Jelikož lignany s hydroxyly výlučně jen v *meta*- poloze nebyly z rostlinných zdrojů známy, dlouho se předpokládalo, že jde o látky endogenní. Až později se prokázalo, že tyto látky vznikají z exogenních zdrojů, z určitých vhodných rostlinných lignanů, a to v zažívacím traktu působením střevních bakterií<sup>54–56</sup>. Zjistilo se, že procházejí stejně jako žlučové kyseliny nebo steroidní hormony enterohepatálním oběhem (což je resorpce látek do portálního krevního oběhu zachycených játry a opět vyloučených na příslušných místech svého působení). Odtud je odvozen i jejich název. Jejich účinky jsou hlavně estrogenní a kancerostatické (např. u karcinomu prsu a střev)<sup>52,55</sup>. Vliv jejich nadměrného dávkování ovšem nebyl ještě dostatečně prozkoumán a objasněn<sup>38,52</sup>.

#### 4. Závěr

Lignany jsou bezesporu reprezentativní a významnou skupinou biologicky účinných sekundárních metabolitů polyfenolického typu a zároveň fenylypropanového původu. Jejich bohatá strukturní variabilita a různorodá biologická účinnost již odedávna poutá nemalou pozornost fytochemiků a periodicky, v určitých etapách, také botaniků, farmakologů, chemických ekologů a nyní i odborníků pro kvalitní a bezpečnou výživu. V současnosti roste zájem o informace kolem bioaktivních polyfenolů i u veřejnosti, která hodlá poučeně využívat fytofarmaka, či nutraceutika, t. j. biologicky aktivní potravní doplňky, schopné preventivně chránit zdraví před přibývajícím chronickými chorobami a zdravotními problémy z nadměrného životního a výkonnostního stresu. Současná vlna zájmů je sice orientována právě na zmíněná hlediska a na využití těchto látek pro lepší kvalitu výživy, nicméně již více než dvě dekády také na studium a využití v oblasti chemické ekologie a ochrany rostlin vůči škodlivým organismům a nepříznivým ekologickým vlivům. Proto byl výběr informací z literatury i z vlastní experimentální práce soustředěn především na tato hlediska. Jenom z části se dotýká vln zájmů nyní méně atraktivních, i když svého času také významných, jaké iniciovala farmakognozie či chemotaxonomie rostlin. Lignany, spolu s dalšími sekundárními metabolity, posloužily totiž jako významné chemické znaky pro botanickou klasifikaci v dobách, kdy proteomika a genomika nebyly ještě dostatečně rozvinuté a dostupné pro tyto účely.

*Tato práce vznikla jako součást výzkumného záměru Z40550506 a byla podkladem k přednášce v rámci postgraduálního kurzu o chemii a biochemii přírodních látek v cyklu Organická chemie na ÚOCHB AVČR.*

#### LITERATURA

1. Pelter A.: v knize *The shikimic acid pathway*. (Conn E.E., ed.), str 201. Plenum Press, New York 1986.
2. Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G., v knize: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (Buchanan B., Gruissem W., Jones R., ed.), str. 1250. American Society of Plant Physiologists, 2000.
3. Schoonhoven L. M., Jermy T., van Loon J. J. A.: *Insect-Plant Biology*, Chapman Hall, London 1998.
4. Harborn J. B.: *Introduction to Ecological Biochemistry*, 4. vyd., Academic Press, London 1993.
5. Harmatha J., v knize: *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants* (Oleszek W., Marston A., ed.), str.129. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht 2000.
6. Hartmann T.: *Entomol. Exp. Appl.* 80, 1777 (1996).
7. Harborn J. B., v knize: *Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites Vol. I.* (Rosenthal G. A., Berenbaum M. R., ed.), str. 389, 2. vyd. Acad. Press, San Diego 1991.

8. Hagerman A. E., Butler L. G., v knize: *Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites* Vol. I. (Rosenthal G. A., Berenbaum M. R., ed.), str. 355, 2. vyd. Acad. Press, San Diego 1991.
9. XXII International Conference on Polyphenols, ve sborníku: *Polyphenols Communications 2004* (Hoikkala A., Soidinsalo O., Wähälä K., ed.), Helsinki 2004.
10. Harborn J. B., v knize: *Natural Products. Their Chemistry and Biological Significance*. (Mann J., Davidson R. S., Hobbs J. B. a spol., ed.), str. 362. Longman, Harlow 1994.
11. Harborn J. B.: v knize: *Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution*. Academic Press, London 1978.
12. Harmatha J., Žďárek J.: ve skriptech: *Chemie přírodních látek* (Bláha K., ed.) 7. sv. cyklu *Organická chemie*. ÚOCHB ČSAV, Edice Macro N-8, Praha 1982.
13. Harmatha J.: ve skriptech: *Chemie a biochemie přírodních látek* (Kohout L. a spol., ed.), 27. sv. cyklu *Organická chemie*. ÚOCHB AVČR, Praha 2002.
14. Dewick P. M.: *Natural Product Reports* 4, 173 (1994).
15. Blažej A., Šutý L.: *Rastlinné fenolové zlúčeniny*. Vydavateľstvo ALFA, Bratislava 1973.
16. Ayres D.C., Loike J.D.: *Lignans. Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press 1990.
17. Umezawa T.: *Phytochemistry Rev.* 2, 371 (2003).
18. Harmatha J., Dinan L.: *Phytochemistry Rev.* 2, 321 (2003).
19. Whiting D. A.: *Nat. Prod. Rep.* 4, 499 (1987).
20. Erdtman H., Harmatha J.: *Phytochemistry* 18, 1495 (1979).
21. Harmatha J., Buděšínský M., Trka A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 644 (1982).
22. Umezawa T., Okunishi T., Shimada M.: *Wood Research (Kyoto)* 84, 62 (1997).
23. Samek Z., Harmatha J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 43, 2779 (1978).
24. Dewick P. M., v knize: *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 5. *Structure Elucidation (Part B)*, (Atta-ur-Rahman, ed.), str. 459. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam 1989.
25. Davin L. B., Lewis N. G.: *Plant Physiol.* 123, 453 (2000)
26. Davin L. B., Lewis N. G.: *Phytochemistry Rev.* 2, 257 (2003).
27. Gottlieb O. R., v ročence: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (Zechmeister L., zakl.; Herz W., Grisebach H., Kirby G. W., ed.), Vol. 35, str. 1. Springer-Verlag, Wien 1978.
28. Apers S., Vlietinck A., Pieters L.: *Phytochemistry Rev.* 2, 201 (2003).
29. Suzuki S., Umezawa T., Shimada M.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2001, 3252.
30. Yoshida K., Hiraide M., Nishiguchi M., Hishiyama S., Kato A.: *Bulletin of FFPRI, (Tsukuba, Japan)*, Vol 3, 25 (2004).
31. Chen Y., Sarkanen S.: *Phytochemistry Rev.* 2, 235 (2003).
32. Lewis N. G., Davin L. B., Sarkanen S., v knize: *Lignin and Lignan Biosynthesis* (Sarkanen S., Lewis N. G., ed.), ACS Symp. Ser. 697, str. 1–27. Amer. Chem. Soc., Washington 1998.
33. MacRae W. D., Towers G. H. N.: *Phytochemistry* 23, 1207 (1984).
34. Harmatha J., Nawrot J.: *Entomol. Exp. Appl.* 104, 51 (2002).
35. Garcia E. S., Azambuja P.: *Toxicon* 44, 431 (2004).
36. Slanina J.: *Chem. Listy* 94, 111 (2000).
37. Lee K-H., Xiao Z.: *Phytochemistry Rev.* 2, 341 (2003).
38. Westcott N. D., Muir A. D.: *Phytochemistry Rev.* 2, 401 (2003).
39. Gordaliza M., Garcia P. A., Miguel del Coral J. M., Castro M. A., Gomez-Zurita M. A.: *Toxicon* 44, 441 (2004).
40. Hartwell J. L., Schrecker A. W.: v ročence: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (Zechmeister L., ed.), Vol. 15, str. 83. Springer-Verlag, Wien 1958.
41. Jensen S., Hansen J., Boll P. M.: *Phytochemistry* 33, 523 (1993).
42. Charlton J. L.: *J. Nat. Prod.* 61, 1447 (1998).
43. Nishibe S., Hisada S., Inagaki I.: *Chem. Pharm. Bull.* 21, 1108 (1973).
44. Yang L-M., Lin S-J., Yang T-H., Lee K-H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, 941 (1996).
45. Pavlík M., Laudová V., Grüner K., Vokáč K., Harmatha J.: *J. Chromatography, B* 770, 291 (2002).
46. Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I. D.: *Ecdybase – The Ecdysone Handbook*, 3. vyd., str. 1–710. Cybersales, Praha 2002. <http://ecdycbase.org>
47. Opletal L., Sovová M., Dittrich M., Solich P., Dvořák J., Krátký F., Čerovský J., Hofbauer J.: *Čes. a Slov. Farm.* 46, 247 (1997).
48. Erdtman H., Norin T.: v ročence: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (Zechmeister L., ed.), Vol. 24, str. 206. Springer-Verlag, Wien 1966.
49. Cartier A., Chan H., Malo J. L., Pineau L., Chan-Yeung M.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 77, 639 (1986).
50. Harmatha J., Kmoníčková E., Zidek Z.: ve sborníku *Polyphenols Communications 2004*, (Hoikkala A., Soidinsalo O., Wähälä K., ed.), str. 217. Gummerus Printing, Jyväskylä, Helsinki 2004.
51. Ishiguri F., Maruyama S., Takahashi K., Abe Z., Yokota S., Andoh M., Yoshizawa N.: *J. Wood Sci.* 49, 135 (2003).
52. Committee on Toxicity of Chemicals in Food: *Phytoestrogens and health, COT Report – published by the Food Standards Agency, London*. Crown copyright 2003. Internet web site. <http://www.food.gov.uk/multimedia/webpage/phytoestrogens>

53. Moravcová J., Kleinová T.: Chem. Listy 96, 282 (2002).
54. Adlercreutz H.: ve sborníku Polyphenols Communications 2004, (Hoikkala A., Soidinsalo O., Wähälä K., ed.), str. 1. Gummerus Printing, Jyväskylä, Helsinki 2004.
55. Raffaelli B., Hoikkala A., Leppälä E., Wähälä K.: J. Chromatography, B 777, 29 (2002).
56. Heinonen S., Nurmi T., Liukkonen K., Poutanen K., Wähälä K., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H.: J. Agric. Food Chem. 49, 3178 (2001).
57. Cornwell T., Cohick W., Raskin I.: Phytochemistry 65, 995 (2004).
58. Stárka L., Hampl R., Lapčik O., Adlercreutz H.: DMEV 2/1, (1999) Tigris web. <http://www.tigris.cz/dmev/dmev199/Obsah.htm>
59. Slanina J., Glatz Z.: J. Chromatography, B 812, 215 (2004).
60. Nurmi T., Heinonen S., Mazur W., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H.: Food Chem. 83, 303 (2003).
61. Muir A. D., Westcott N. D.: J. Agric. Food Chem. 48, 4048 (2000).

**J. Harmatha** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Structural Abundance and Biological Significance of Lignans and Related Plant Phenylpropanoids**

The article reviews chemical and biological properties of lignans and related phenylpropanoids. Their rich structural variability results from their biogenesis and the dominant position among secondary plant metabolites. The information on lignans is based on relevant literature and own experimental results. The chemo-ecological role of lignans in plants as well as various pharmacological effects and utilisation of phenylpropanoids as functional nutrient additives or as established pharmaceuticals are emphasized.

## TRANSPORT LÁTOK CEZ MEMBRÁNU U ARCHAEA: MEMBRÁNOVÉ TRANSPORTNÉ PROTEÍNY

STANISLAV ŠURÍN a PETER ŠMIGÁŇ

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika  
Stanislav.Surin@savba.sk

Došlo 14.3.05, prijaté 2.5.05.

Kľúčové slová: archaea, transportné proteíny, kanály, sekundárny transportér, transportér TRAP, primárny transportér, transportér ABC

### Obsah

1. Úvod
2. Transportné systémy u archaea
3. Kanály
  - 3.1. Rodina VIC napätovo-závislých kanálových proteínov
  - 3.2. Rodina MIP transmembránových kanálových proteínov
  - 3.3. Rodina Msc mechanosenzitivných kanálových proteínov
4. Sekundárne transportéry
  - 4.1. Transportéry TRAP
5. Primárne aktívne transportéry
6. Záver

### 1. Úvod

Biologická membrána umožňuje organizmom udržiavať homeostázu prostredníctvom selektívnej kontroly pohybu molekúl, ktoré môžu do buniek alebo bunkových organel vstúpiť, a ktoré ich môžu opustiť. Za tento fenomén je zodpovedný celý rad špecifických transportných mechanizmov zabezpečujúcich vstup vitálne dôležitých molekúl resp. vylučovanie spodín metabolizmu do vonkajšieho prostredia.

Napriek existencii veľkého množstva vedeckej literatúry o transporte látok cez biologické membrány, o štruktúrnych rysoch transportérov a kanálov lokalizovaných v membránach buniek a bunkových organel, existuje relatívne málo experimentálnych údajov o transporte látok cez membrány u archaea. Archaea sa považujú za veľmi skoré formy života, ktoré sa vyvinuli v extrémnych podmienkach. Je potrebné zdôrazniť, že archaea vykazujú celý rad unikátnych charakteristických funkčných a štruktúrnych znakov. Jedným z najmarkantnejších takýchto znakov je lipidické zloženie archaeálnej membrány, ktorá obsahuje viacero komponentov nemajúcich obdobu u baktérií

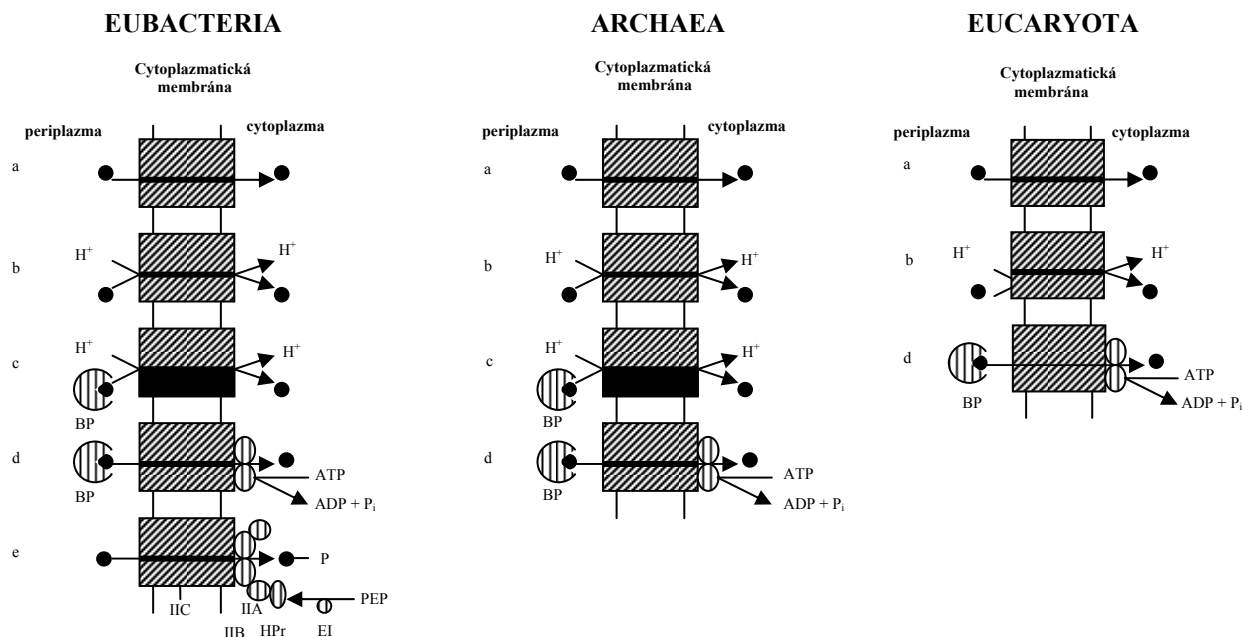
a eukaryotov. Navyše unikátne lipidické komponenty vytvárajú špecifickú architektúru archaea membrán<sup>1</sup>. Táto je v mnohých prípadoch zložená z monovrstvy, poprípade kombinácie monovrstvy s dvojrystvou lipidických molekúl vytvárajúc významne zmenenú (v porovnaní s prokaryontami a eukaryontami) matrix pre rôzne membránovo viazané transportné proteíny.

Existencia membrány s inou štruktúrou u archaea predznamenáva, že aj transportné systémy, ktoré sa v takejto membráne nachádzajú, by mohli vykazovať unikátne vlastnosti. Štúdium transportných systémov u archaea môže na jednej strane poskytnúť celý rad nových významných základných poznatkov dotýkajúcich sa transportných mechanizmov vo všeobecnosti, a zároveň môže prispieť k pochopeniu molekulových mechanizmov stratégie rôznych druhov transportu a niektorých aspektov regulácie týchto procesov. Evolučné hľadisko pri štúdiu vlastností membrán u archaea a s nimi spojených transportných mechanizmov vytvára významný princíp zameraný na pochopenie divergencie transportných funkcií v priebehu evolúcie. Na druhej strane nám výsledky štúdia takýchto systémov ponúkajú veľkú škálu možností využitia týchto poznatkov v biotechnológiách a nanotechnológiách, pretože mnohé mikroorganizmy patriace medzi archaea majú vytvorené unikátne štruktúry, ktoré im udeľujú schopnosť rásť za mimoriadne extrémnych podmienok ako sú teploty (80–113 °C), pri obrovských koncentráciách solí (extrémne halofily až pri 5M koncentrácii NaCl), extrémnych pH blízke 0 a v alkalickéj oblasti pH blízke 13, ako aj pri extrémnej anaerobióze. Súčasná znalosť sekvencie celých genómov viacerých archaea patriacich do rôznych podskupín významne podporujú tieto štúdia a bezpochyby prispeje k ďalšiemu rozšíreniu našich poznatkov v tomto smere. Navyše, je zrejme, že poznávanie transportných mechanizmov archaea poskytuje okrem výsledkov zaujímavých z hľadiska základného výskumu významný komerčný potenciál, ktorý sa určite v krátkej budúcnosti bude môcť zužitkovať.

### 2. Transportné systémy archaea

Viac ako 60 % membrán prokaryotických organizmov tvoria membránové transportné proteíny<sup>2</sup>. V závislosti na architektúre molekúl a poháňajúcej sile transportu boli transportné systémy archaea a baktérií klasifikované do 5 tried:

1. kanály (obr. 1a) – jednoduchý kanálový proteín umožňujúci pasívnu difúziu látok z jednej strany cytoplazmatickej membrány na druhú stranu bez stereošpecifického prenášača alebo využitia energie<sup>3,4</sup>,
2. sekundárne transportéry, ktoré pomocou elektrochemického gradientu protónov alebo sodíkových



Obr. 1. Modely znázorňujúce triedy transportérov; (a) kanál, (b) sekundárny transportér, (c) transportér TRAP, (d) typ ABC transportéra, (e) fosfotransferázový systém. BP (proteín naväzujúci prenášaný substrát); plné krúžky (transportovaná látka, alebo substrát)<sup>3,4</sup>

iónov poháňajú transport substrátu cez membránu (obr. 1b)<sup>2-4</sup>,

- transportéry TRAP (Tripartite ATP-independent Periplasmic Transporter), ktoré sa skladajú z periplazmového väzbového proteínu a membránového translokátora. Tieto systémy využívajú protónmotívnu a sodíkmotívnu silu ako hybnú silu transportu látok<sup>2-4</sup> (obr. 1c).
- primárne transportéry, ktoré využívajú chemickú energiu ATP alebo iných zlúčenín na prenos substrátu. Sú to ión-transdukujúce respiračné reťazce, bakteriorodopsín a ABC transportéry (ATP binding cassette)<sup>2-4</sup> (obr. 1d).
- fosfoenolpyruvát (PEP) – závislý fosfotransferázový systém (PTS), ktorý spája transport cukrov s fosforyláciou<sup>2-4</sup> (obr. 1e).

Vo všeobecnosti sa u archaea vyskytujú všetky triedy transportérov, s výnimkou systému PTS. V žiadnom z archeálnych genómov doposiaľ tento systém nebol identifikovaný. Predpokladá sa, že systém PTS je vyhradený mezofilným baktériám, čo by mohlo naznačovať, že sa vyvinul relatívne neskôr<sup>2</sup>.

### 3. Ionové kanály

Iónové kanály boli objavené v membránach všetkých troch domén života – baktérií, archaea a eukaryota<sup>3</sup>. Kanály zvyčajne katalyzujú difúziu anorganických iónov v smere ich chemického iónového gradientu medzi vonkaj-

ším prostredím a bunkovou cytoplazmou, alebo v eukaryotických bunkách aj transport iónov medzi vnútornými kompartmentmi bunky bez závislosti na bunkovej energii<sup>1,5</sup>. Na základe ich špecifickej voči iónom môžu byť rozdelené na  $\text{Ca}^{2+}$  kanály,  $\text{K}^+$  kanály,  $\text{Na}^+$  kanály, apod. Všetky známe iónové kanály sú začlenené do jednotlivých proteínových rodín, ktoré sa od seba navzájom odlišujú predovšetkým rôznym mechanizmom otvárania a zatvárania kanála.

O archeálnych transmembránových kanáloch dosiaľ existuje oveľa menej poznatkov v porovnaní s baktériami a eukaryotami. Zaujímavý je fakt, že funkčno-fylogenetický klasifikačný systém transmembránových látkových transportérov vytvorený na základe mechanizmu transportu a energetických požiadaviek, štruktúry, funkcie, substrátovej špecificity a polaritu transportu, z celkového množstva približne 157 rodín transportných kanálov identifikovaných v prírode<sup>6,7</sup> u archaea sa popisuje zatiaľ iba 6 rodín (rodina VIC (voltage-gated channel) – napätovo-závislých iónových kanálov; rodina MIP (major intrinsic protein) – aquaporínov resp. aquaglyceroporínov; rodina CIC (chloride channel) – chloridových kanálov; rodina Msc – mechanosenzitivných kanálových proteínov, rodina MIT (metal ion transporter)<sup>7-9</sup> a rodina Hsp-70 (katiónový kanál formujúci heat-shock proteín)<sup>7</sup>. Je potrebné zdôrazniť, že veľké časti sekvenovaných genómov archeálnych druhov kódujú proteíny neznámej funkcie, takže takmer s istotou môžeme predpokladať existenciu vyššieho počtu archeálnych iónových kanálov.

### 3.1. VIC rodina napätovo-závislých kanálových proteínov

Proteíny rodiny VIC sú selektívne iónové kanály ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), ktoré umožňujú tok iónov v závislosti na zmene elektrického napätia membrány bunky<sup>10</sup>. Iba donedávna boli napätovo-závislé  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  kanály považované ako unikátne nástroje eukaryotických buniek, prispôbené na tvorbu a šírenie špecializovaného elektrického signálu v neurónoch<sup>11</sup>. Neskôr boli tieto kanály objavené aj u baktérií a archaea, kde sa zúčastňujú regulácie koncentrácie iónov v cytosole, regulácie cytosolického pH, regulácie bunkového obsahu<sup>12</sup>. Ako tieto kanály zachytávajú zmeny elektrického potenciálu membrány a premenávajú ho na mechanickú prácu kanála, bolo niekoľko desaťročí záhadou. Až pri štúdiu termofilného archeálneho druhu *Aeropyrum pernix* sa podarilo po niekoľkoročnom úsilí Jianga Y. a spol. kryštalizovať napätovo-závislý  $K^+$  kanál KvAP, a odhalit neočakávaný a prekvapujúco jednoduchý mechanizmus napätového senzora a princípu otvárania a zatvárania kanála VIC (cit.<sup>13</sup>). Zaujímavé je, že hoci archaea majú prokaryotickú štruktúru bunky podobne ako baktérie, archeálny napätovo-závislý  $K^+$  kanál KvAP *Aeropyrum pernix* má veľmi podobnú štruktúru a funkciu ako klasický nervový  $K^+$  kanál živočíchov<sup>10</sup>. Predpokladá sa, že mechanizmus otvárania kanála je rovnaký ako u eukaryotických Kv kanálov, pretože bol rovnako inhibovaný prostredníctvom špecifického jedu hanatoxínu HaTX čílskeho pavúka tarantuly *Grammostola spatulata*, ktorý je schopný špecificky sa viazať na napätový senzor eukaryotického napätovo-závislého  $K^+$  kanála. Ďalší dôkaz, že KvAP je štrukturálne veľmi podobný eukaryotickým  $K^+$  kanálom bol založený na konzervácii aminokyselín v póre a molekulovom rozpoznaní väzbového miesta póru charybdotoxínom CTX. Charybdotoxín je jed škorpióna *Leiurus quinquestratus hebraeus*, ktorý špecificky blokuje póry eukaryotických  $K^+$  kanálov (ako kľúč do zámky)<sup>11</sup>. Zaujímavosťou na tomto kanáli KvAP je to, prečo je tento kanál inhibovaný HaTX, resp. CTX. Nepredpokladá sa totiž, žeby bol nejaký evolučný tlak na tarantulu žijúcu v suchých oblastiach Chile, alebo škorpióna z púští Stredného Východu, aby rozpoznávali receptorové miesta kanála KvAP archeálneho druhu *Aeropyrum pernix* žijúceho v blízkosti podmorských termálnych komínov pobrežia Japonska. Uvedené skutočnosti naznačujú veľmi blízky evolučný vzťah medzi archeálnym kanálom KvAP a eukaryotickými kanálmi Kv a zároveň poukazujú na existenciu vysoko konzervovaných molekulárnych štruktúr, ktoré tvoria základ iónovej selektivity a napätovo-závislého mechanizmu  $K^+$  kanálov v celej prírode.

### 3.2. Rodina MIP transmembránových kanálových proteínov

Rodina MIP transportných proteínov (aquaporíny, aquaglyceroporíny) má viac ako 100 zástupcov, kde všetky vytvárajú transmembránové kanály<sup>14</sup>. Kanály MIP majú podobne ako proteíny rodiny VIC homotetramérickú štruktúru. Každá podjednotka kanála prechádza membránu 6× v podobe  $\alpha$ -helixov, ktoré vznikli intragénym dupli-

kujúcim procesom z trojhelixového genetického elementu. Dve polovice proteínov sú preto opačnej orientácie v membráne<sup>14</sup>. Rozlišujú sa dve hlavné subfamílie: vodné kanály (aquaporíny) a glycerol-transportéry (aquaglyceroporíny). U *E.coli* aquaporínový proteín AqpZ selektívne transportuje vodu (nie glycerol), dokonca odpudzuje  $H_3O^+$  ióny, kým aquaglyceroporíny GlpF môžu transportovať okrem vody aj glycerol, dihydroxyacetón, propándiol, močovinu a iné malé neutrálne molekuly (ako napr.  $NH_3$ ,  $CO_2$ ) vo fyziologicky dôležitých procesoch<sup>14</sup>. Fyziologické funkcie mnohých proteínov rodiny MIP však dodnes ešte nie sú celkom známe.

U methanoarchaea *Methanobacterium marburgensis* bol identifikovaný aquaporín AqpM. Zistilo sa, že tento kanálový proteín je zaujímavý niektorými odlišnosťami od typického aquaporínu AqpZ *E.coli*, ako aj aquaglyceroporínu GlpF *E.coli*: i) AqpM proteín funguje nielen ako vodný kanál, ale aj ako veľmi slabý glycerolový transportér; ii) Je schopný udržať svoju terciárnu štruktúru v dodecylsulfáte sodnom; iii) Má vyššiu termostabilitu než AQP4 cicavcov aj ako AqpZ *E.coli*; iv) Na základe sekvencie analýzy zvyškov v oblasti P2–P5, ktorými sa v sekvencii odlišujú vodné kanály a aquaglyceroporíny a zvyškov, ktoré vytvárajú najužšie miesto kanála, u AqpM *Methanobacterium marburgensis* sa nedá jednoznačne určiť, či ide o vodný kanál, alebo o glycerolový transportér<sup>15</sup>; v) V genóme *M. marburgensis* bola objavená len jedna homologická sekvencia, kým u *E.coli* bola potvrdená existencia oboch typov kanálov rodiny MIP, aquaporíny aj aquaglyceroporíny<sup>15,16</sup>.

### 3.3. Rodina Msc mechanosenzitivných kanálových proteínov

Kanály Msc baktérií a archaea zabezpečujú dôležitú úlohu pasívneho transportu pri osmoregulácii osmotického tlaku buniek znížením membránovej tenzie vznikajúcej vo vnútri lipidovej dvojvrstvy<sup>17</sup>, ktorý je potrebný pre rast a rozmnožovanie. U húb a rastlín kanály Msc zabezpečujú ochranu cytoplazmatickej membrány pred nadmerným rozťahnutím a prasknutím, ktoré by mohla nastať za určitých osmotických pomerov vonkajšieho prostredia. U živočíchov kanály Msc vytvárajú molekulárny základ premeny mechanických signálov, ako sú dotyk, vnímanie zvuku, teploty, polohy, rovnováhy. Zachytávanie mechanických signálov z vonkajšieho prostredia zahŕňa širokú škálu fyziologických procesov, pri ktorých deformácia bunkových membrán je premenená na elektrický alebo biochemický signál. Nedávne objavenie kanálov Msc u archaea nielenže pomohlo vysvetliť a pochopiť evolučný vzťah medzi baktériami a archaea, ale zároveň to naznačilo, že kanály Msc sa pravdepodobne objavili už u prvých foriem života na Zemi<sup>18</sup>. V cytoplazmatickej membráne *E.coli* boli objavené 3 typy kanálov Msc, ktoré boli na základe ich konduktancie pomenované ako MscM (M ako mini), MscS (S ako small) a MscL (L ako large)<sup>19</sup>. Kanál MscL *E.coli* sa stal prototypom kanálov Msc na štúdiu štruktúrno-funkčných vzťahov tejto rodiny iónových kanálov. Ako genetická próba pomohol pri hľadaní príbuzných

homológov v databáze DNA iných baktérií, archaea, húb a rastlín. V bunkovej membráne archaeálneho druhu *Thermoplasma acidophilum* bol charakterizovaný iba jeden typ kanála Msc (MscTA)<sup>18</sup>, v bunkových membránach iných archaea *Haloflex volcanii* a *Metanococcus janaschii* boli objavené dva druhy kanálov Msc (MscA<sub>1</sub> a MscA<sub>2</sub>, resp. MscMJ a MscMJLR)<sup>18,20</sup>. Ukázalo sa, že kanály Msc archaea majú niektoré vlastnosti podobné s MscL a MscS *E.coli* (aktiváciu dvojvrstvom mechanizmom; závislosť od tlaku a napätia; inhibíciu gadolinom a aktiváciu amfipatínmi)<sup>18</sup>. Zaujímavé je aj to, že archaeálne kanály Msc by mohli byť najlepšie popísané ako určité hybridy štrukturálnych a funkčných vlastností kanálov MscL, MscS alebo MscM *E.coli*, ako aj niektorých eukaryotických kanálov Msc. Keď sa sledovala závislosť aktivity kanálov Msc *E.coli* od napätia (zmenami napätia 15mV), zistilo sa, že aktivita kanálov MscL a MscM nie je závislá na napätí, ale aktivita MscS sa zvyšovala s membránovou depolarizáciou. Okrem toho kanál MscS dosiahol konduktanciu približne 0,97 nS pri kladných napätiach a 0,65 nS pri záporných napätiach<sup>21</sup>. Kanály Msc archaea majú v tomto ohľade určitú variabilitu, ktorá by mohla byť určitou výhodou pre prežitie v extrémnych podmienkach. Kanál MscA<sub>1</sub> *Haloflex volcanii* má vyššiu vodivosť pri kladných napätiach (0,85 nS) a nižšiu vodivosť pri záporných napätiach (0,49 nS) podobne ako u MscS kanála *E.coli*. Kanál MscA<sub>2</sub> má ale opačnú vodivosť – nižšiu pri kladných napätiach (0,38 nS), a vyššiu pri záporných napätiach (0,68 nS). Kanály MscM a MscMJLR *M.janaschii* majú permeabilný pomer iónov K<sup>+</sup> vs Cl<sup>-</sup> (P<sub>K</sub>/P<sub>Cl</sub> ~ 5–6), čím sa v tomto ohľade podobajú kationovým kanálom v eukaryotických bunkách kostrových svalov a srdca. Pre porovnanie kanál MscS *E.coli* uprednostňuje anióny pred kationmi (P<sub>K</sub>/P<sub>Cl</sub> ~ 3), MscL je iónovo nešpecifický a MscM mierne uprednostňuje kationy pred aniónmi. Analýza sekundárnej štruktúry MscMJ však preukazuje istú štruktúrnu podobnosť s kanálmi Msc u *E.coli* (38,5% identita aminokyselínovej sekvencie proteínu)<sup>21</sup>.

#### 4. Sekundárne transportéry

Základnou charakteristikou sekundárnych transportérov je, že sú poháňané elektrochemickým gradientom (zvyčajne  $\Delta\mu_{H^+}$  alebo  $\Delta\mu_{Na^+}$ )<sup>22,23</sup>. Z celkového počtu 80 rodín sekundárnych transportérov bolo u archaea na základe funkčnej anotácie genómov objavených zatiaľ iba 34 rodín<sup>7</sup>. Všeobecne sa rozlišujú 3 typy sekundárneho transportu:

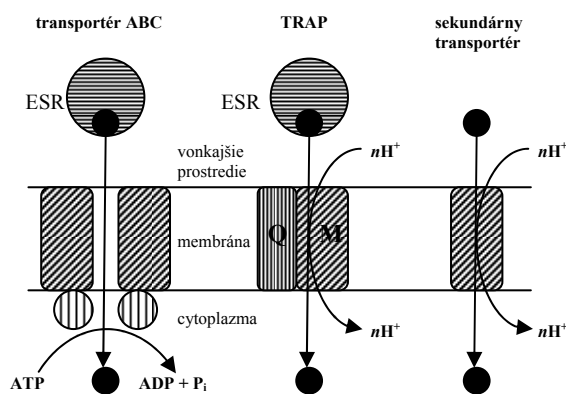
1. uniport – je transmembránový transport iba jednej látky,
2. symport – je kotransport látky s kationom,
3. antiport – je: a) látka sa vymieňa za kation (solute – ion antiport),  
b) látka sa vymieňa s inou látkou (solute – solute antiport).

Veľa sekundárnych transportérov všeobecne vytvára transmembránovú topológiu 6 + 6 = 12 transmembráno-

vých  $\alpha$ -helixov (TMSs)<sup>4</sup>. Sekundárne transportéry sú zodpovedné za transport väčšiny organických látok cez biologické membrány. Takmer všetky mono-, di-, trivalentné kationy, ako aj biologicky dôležité anorganické anióny sú transportované týmito transportérmi. Ďalej všetky triedy organických molekúl (mono-, di- a trisacharidy; aminokyseliny, amíny, amidy a polyamíny; nukleozidy; vitamíny a ich prekursori; kofaktory) sú transportované sekundárnymi transportérmi. Predpokladá sa však, že iba málo sekundárnych transportérov je zapojené do exportu makromolekúl (komplexov polysacharidov, lipidov a proteínov)<sup>6</sup>. Metanogénne archaea využívajú špecifické sekundárne transportéry aj na vyrovnávanie vnútrobunkového osmotického tlaku s extracelulárnym osmotickým tlakom akumuláciou anorganických iónov (predovšetkým K<sup>+</sup> iónov) a akumuláciou kompatibilných organických zlúčenín (napr. glycin, betain, aminokyseliny), aby minimalizovali stratu vody<sup>24</sup>. Betain je jednou z mnohých kompatibilných zlúčenín vyrovnávajúcich osmotický stres mnohých organizmov u všetkých troch domén života. Betain môže byť syntetizovaný jednak v bunke, ale aj prijímaný z vonkajšieho prostredia špecifickým glycin betainovým transportérom, ktorý je pravdepodobne poháňaný H<sup>+</sup> alebo Na<sup>+</sup> gradientom, pretože transport betainu bol inhibovaný niekoľkými typmi protonofórov a Na<sup>+</sup> ionofórov<sup>24</sup>.

##### 4.1. Transportéry TRAP

Veľmi neobvyklý typ sekundárnych transportérov objavených u archaea a baktérií iba nedávno, predstavujú TRAP transportéry. Kľúčovou charakteristikou TRAP transportérov je, že majú analóg ESR (Extracytoplasmic Solute-binding Receptor) podobne ako transportéry ABC



Obr. 2. Porovnanie stavby transportéra TRAP, transportéra ABC a klasického sekundárneho transportéra; ESR (extracytoplasmic solute binding protein) proteín; malé čierne kruhy – prenášaný substrát; obdĺžniky – transmembránové domény; krúžky so zvislým pruhovaním – ATP väzbové domény; obdĺžnik s M – DctM homológ; obdĺžnik s Q – DctQ homológ;  $nH^+$  – transmembránový elektrochemický gradient iónov, kde  $n$  je stechiometrický koeficient prenosu protonov, pričom spriahajúcimi kationmi môžu byť aj iné ióny<sup>25</sup>



(cit.<sup>25</sup>). Vzťah medzi organizáciami podjednotky TRAP-I a iných typov látkových transportérov je na obr. 2. Najlepšie charakterizovaný transportér TRAP je u baktérie *Rhodobacter capsulatus*, ktorý je špecifický pre C<sub>4</sub>-dikarboxyláty. Skladá sa z troch proteínov: DctP – periplasmatic C<sub>4</sub>-dicarboxylate-binding receptor (analog ESR u transportérov ABC), a dvoch integrálnych membránových proteínov (DctM a DctQ), ktoré prechádzajú membránu 12 resp. 4krát. Homológy týchto troch proteínov boli identifikované vo všetkých hlavných bakteriálnych pododdeleniach, ale aj u archaea<sup>4</sup>. Doposiaľ neboli identifikované u eukarya<sup>25</sup>. Okrem rodiny DctP boli s transportérmi TRAP spájané aj iné typy ESR, ktoré obsahujú hydrofilné proteíny obsahujúce okolo 300–400 aminokyselinových zvyškov. Rodina imunogénnych proteínov ESR označovaných ako TAXI proteíny (TRAP associated extracytoplasmatic immunogenic protein) sa konštantne ukazuje s TRAP systémami, ktoré obsahujú veľký DctQM fúzovaný proteín. V súčasnosti všetky známe archeálne systémy sú tohto typu<sup>25</sup>. DctQ je malý integrálny proteín (26 kDa), ktorý u *R. capsulatus* je nevyhnutný pre C<sub>4</sub> dikarboxylátový transport. Má veľkú periplazmatickú slučku medzi 1 a 2 TMS, a významný C-koniec lokalizovaný v cytoplazme. Funkcia DctQ v transportnom procese nie je úplne známa. Predpokladá sa, že sprostredkuje interakcie medzi DctP a DctM, keď funguje ako kotva pre DctP, stabilizuje DctM v membráne, a zúčastňuje sa na transporte látok s využitím energie<sup>25</sup>. DctM homológy sa pokladajú za proteíny potrebné na translokáciu substrátu cez cytoplazmatickú membránu. Tieto proteíny majú mnohopočetné TMS (10–13), s hydrofilnou slučkou často rozdeľujúcou proteín na dve polovice. Táto topológia je podobná typickým sekundárnym membránovým transportným proteínom u iných rodín, ktoré často majú 12 TMS (cit.<sup>25</sup>).

## 5. Primárne aktívne transportéry

Tieto transportéry využívajú primárny zdroj energie ako hnaciu silu pre transport látok proti koncentračnému gradientu. Na základe využívania primárnych zdrojov energie (chemická, elektrická a solárna energia) sa tieto primárne transportéry delia na:

- transportéry ABC, ktoré získavajú energiu hydrolýzou difosfátovej väzby anorganického pyrofosfátu, ATP alebo iných nukleozidtrifosfátov. Tieto transportéry sa vyskytujú u všetkých organizmov<sup>3,6</sup>,
- transportéry, ktoré získavajú energiu dekarboxyláciou cytoplazmatického substrátu (Na<sup>+</sup>-transporting carboxylic acid decarboxylase). Tieto sa vyskytujú výhradne u prokaryotov<sup>3,6</sup>,
- transportéry energizované Na<sup>+</sup> transportujúcim metyltetrahydrometanopterin koenzým M-metyltransferázou Na<sup>+</sup>-MMM. Tento transportérový komplex sa vyskytuje výhradne u methanoarchaea<sup>3,6</sup>,
- transportéry energizované tokom elektrónov z redukovaného substrátu na oxidovaný substrát<sup>3,6</sup> (H<sub>2</sub>-heterodisulfid oxidoreduktáza, Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> pumpujúca

formylmethanofuran dehydrogenáza, H<sup>+</sup> translokujúca F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> dehydrogenáza),

- transportéry, ktoré využívajú svetelnú energiu na poháňanie transportu látok<sup>3</sup> (napr. bakteriorodopsín, halorodopsín u halofilných archaea a fotosyntetické reakčné centrá u baktérií)<sup>6</sup>.

Primárne transportéry (pumpy) fungujú buď kanálovým alebo prenášačovým mechanizmom. Transport látok je však vždy energizovaný primárnym zdrojom energie. Tieto pumpy sú v biologických systémoch obzvlášť dôležité, pretože sú zodpovedné za vytvorenie iónového gradientu, membránových potenciálov, ktoré sa využívajú na poháňanie sekundárných transportérov. Primárne transportéry sú oveľa komplexnejšie transportné systémy než kanály alebo sekundárne transportéry, pretože ich transportná aktivita závisí na katalytických aktivitách, ktoré rozkladajú chemické väzby, prenášajú elektróny z donorových molekúl na akceptory, alebo absorbujú svetelnú energiu. Väčšina primárných transportérov uskutočňuje transport anorganických iónov alebo sekréciu makromolekúl<sup>3</sup>. Protóny a ióny Na<sup>+</sup> sú transportované primárnymi pumpami výlučne v smere von<sup>26</sup>. Svetlom poháňaný transport iónov prostredníctvom bakterio- alebo halorodopsínu, a Na<sup>+</sup> eflux prostredníctvom metyltetrahydrometanopterin koenzým M-metyltransferázového mechanizmu bol doposiaľ identifikovaný len v doméne archaea. Dekarboxyláciou poháňaný Na<sup>+</sup> eflux bol doteraz charakterizovaný výlučne u baktérií, ale homológy niektorých dekarboxylázových podjednotiek týchto dekarboxyláz transportujúcich Na<sup>+</sup> boli objavené aj u archeálneho druhu *Archaeoglobus fulgidus*<sup>3</sup>.

Všetky sekvenované genómy archaea a termofilných baktérií *Thermotoga maritima* a *Aquifex aeolicus* obsahujú veľké množstvo génov, ktoré kódujú transportné proteíny<sup>27</sup> patriace do skupiny di/oligopeptidových transportérov<sup>2</sup>. Vo všetkých týchto organizmoch bolo objavené veľké množstvo transportérov ABC. Transportné a sekvenčné štúdie ukázali, že tieto transportéry vykonávajú špecifický a aktívny prenos molekúl cez bunkové membrány<sup>27</sup>, a sú zapojené hlavne do príjmu organických látok<sup>1</sup>, osmosenzitivity a osmoregulácie, multidrogovej rezistencie a anti-génnych procesov<sup>28</sup>. Transportéry ABC dokážu rozlíšiť takmer každý typ substrátu, ktorý môže byť biologicky zaujímavý, bez ohľadu, či je organický alebo anorganický, malý, stredný alebo veľký<sup>3</sup>. Transportéry ABC majú v súčasnosti okolo 1100 zástupcov u organizmov počnúc od archaea až po človeka. Všetky majú spoločnú základnú štruktúru skladajúcu sa zo 4 domén: dve hydrofóbne integrálne transmembránové domény (TMS) a dve ATP viažuce domény (obr. 2). Transportéry ABC prokaryota a archaea môžeme odlišiť od iných transportérov ABC okrem TMS a ATP-viažúcej kazety aj prítomnosťou ESP (extracytoplasmatic solute-binding protein). Kým u Gram-negatívnych baktérií je ESP lokalizovaný voľne v periplazme, u Gram-pozitívnych baktérií a archaea je ukotvený na bunkovú membránu<sup>2,27</sup>. Veľa ABC transportérov majú ESP špecifické pre jednotlivé aminokyseliny, alebo príbuzné skupiny aminokyselín. Avšak niektoré aminoky-

selinové ABC permeázy sú aj také, ktoré dokážu transportovať širokú škálu L-aminokyselín. Jeden z najstriktnejších rozdielov medzi úzkou a širokou látkovou špecifickosťou transportérov sa ukázala vo veľkosti integrálnych membránových proteínov. Permeázy so širokou látkovou špecifickosťou majú integrálne membránové proteíny s 8–9 TMS, kým integrálne membránové proteíny úzko špecifických transportérov sú typicky zložené z 5 TMS (cit.<sup>27</sup>).

Všetky charakteristické proteíny ESP archaea majú veľmi vysokú afinitu pre ich substráty, ktoré môžu byť v nanomolárnych množstvách. Prítomnosť transportérov typov ABC u hypertermofilov sa ukazuje ako veľmi dôležitá pre ich prežitie v extrémnych podmienkach chudobných na živiny. Transportéry ABC majú výhodu, že dokážu zachytiť látky pri veľmi nízkych koncentráciách vďaka vysokej väzbovej afinite ( $K_d < 1 \mu\text{M}$ ) ich väzbových proteínov. Transportéry ABC dokážu katalyzovať transport látok veľkou rýchlosťou až na vysokú vnútornú koncentraciu látok a akumulovať látky oproti veľmi vysokému koncentračnému gradientu (viac ako  $10\,000\times$ ). Je potrebné zdôrazniť, že sekundárne aktívne transportéry majú väzbové afinity v mikro alebo milimolárnych množstvách, čo robí tieto systémy menej vhodné pre rast v extrémnych podmienkach<sup>2</sup>.

## 6. Záver

Hlavným zámerom tohto prehľadného článku je zhrnúť niektoré aspekty transportu látok u archaea. Život archaea sa často spája s extrémnymi vonkajšími fyzikálno-chemickými podmienkami, preto ich vnútorné prostredie musí vykazovať parametre zlučiteľné so životom. Z uvedených dôvodov je vnútro buniek archaea ohraničené membránami, ktorých architektúra je výrazne odlišná a nemá obdobu u baktérií a eukaryotov. Táto skutočnosť je bezprostredne spojená s otázkami ako závažná zmena membránového matrix ovplyvňuje chovanie membránovo viazaných proteínov vrátane proteínov podieľajúcich sa na transporte látok cez membránu. Nové experimentálne údaje o transportných mechanizmoch u archaea spolu s rozvíjajúcou sa genomikou otvárajú predpoklady na získanie nových pohľadov o funkcii membrán v udržiavaní homeostázy u archaea. Poskytujú tiež mimoriadne cenné poznatky pre molekulovú a bunkovú biológiu v spojení s evolúciou transportných systémov. Zároveň tvoria ekonomický potenciál pre priame využitie transportérov archaea v nových technológiách. V neposlednej rade štúdiom týchto systémov kumuluje nové idey o možnostiach modifikácie už známych transportérov vytvárajúc tak novú poznatkovú základňu pre moderné biotechnológie.

*Autori práce ďakujú za finančnú podporu Agentúre na podporu vedy a techniky prostredníctvom finančnej podpory č. APVT – 51024904 a VEGA finančným grantom č.2/3047/23.*

## LITERATÚRA

- Čuboňová E., Šmigáň P.: Chem. Listy 98, 75 (2004).
- Albers S. V., Van de Vossenberg J. L., Driessen A. J., Konings W. N.: *Extremophiles* 5, 285 (2001).
- Saier M. H. Jr.: *J. Bacteriol.* 182, 5029 (2000).
- Rabus R., Jack D. L., Kelly D. J., Saier M. H. Jr.: *Microbiology* 145, 3431 (1999).
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B. T., MacKinnon R.: *Nature* 417, 515 (2003).
- Saier M. H. Jr.: *Mol. Biol. Rev.* 64, 354 (2000).
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>, stiahnuté 31.1.2005.
- Smith R. L., Gottlieb E., Kucharski L. M., Maguire M. E.: *J. Bacteriol.* 180, 2788 (1998).
- Warren M. A., Kucharski L. M., Veenstra A., Shi L., Grulich P. F., Maguire M. E.: *J. Bacteriol.* 186, 4605 (2004).
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B. T., MacKinnon R.: *Nature* 423, 33 (2003).
- Ruta V., Jiang Y., Lee A., Chen J., MacKinnon R.: *Nature* 422, 180 (2003).
- Gregerson K. A.: *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 251 (2003).
- Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A., MacKinnon R.: *Nature* 423, 42 (2003).
- Kozono D., Yasui M., King L. S., Agre P.: *J. Clin. Invest.* 109, 1395 (2002).
- Kozono D., Ding X., Iwasaki I., Meng X., Kamagata Y., Agre P., Kitagawa Y.: *J. Biol. Chem.* 278, 10649 (2003).
- Smith D. R., Doucette-Stamm L. A., Deloughery C., Lee H.-M., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicare R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Safer H., Patwell D., Prabhakar S., McDougall S., Shimer G., Goyal A., Pietrovski S., Church G. M., Daniels C. J., Mao J.-i., Rice P., Nolling J. and Reeve J. N.: *J. Bacteriol.* 179, 7135 (1997).
- Kloda M., Martinac B.: *EMBO J.* 20, 1888 (2001).
- Martinac B., Kloda A.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 82, 11 (2003).
- Berrier C., Besnard M., Ajouz B., Coulombe A., Ghazi A.: *J. Membr. Biol.* 151, 175 (1996).
- Kloda A., Martinac B.: *Archaea* 1, 35 (2002).
- Martinac B., Buechner M., Delcour A. H., Adler J., Kung C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2297 (1987).
- Bloch E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H. W., Stetter K. O.: *Extremophiles* 1, 14 (1997).
- Schleper C., Pühler G., Kühlmorgen B., Zillig W.: *Nature* 375, 741 (1995).
- Proctor L. M., Lai R., Gunsalus R. P.: *Appl. Environ. Mikrobiol.* 63, 2252 (1997).
- Kelly D. J., Thomas G. H.: *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 405 (2001).

26. Schäfer G., Engelhard M., Müller V.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 570 (1999).
27. Hosie A. H., Allaway D., Jones M. A., Walshaw D. L., Johnston A. W., Poole P. S.: *Mol. Microbiol.* **40**, 1449 (2001).
28. Verdon G., Albers S. V., Dijkstra B. W., Driessen A. J. M., Thunnissen A. M. W. H.: *J. Mol. Biol.* **330**, 343 (2003).
29. Konings W. N., Albers S. V., Koning S., Driessen A. J.: *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**, 61 (2002).

**S. Šurín and P. Šmigáň** (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Transport Across Archaeal Cytoplasmic Membrane: Membrane Transport Proteins**

This review discusses recent observations regarding the mechanism of archaea transport and their relevance to studies of membrane structure. The review primarily deals with some aspects of several mechanisms by which substances are assumed to cross cell membrane in archaea. Since a number of these observations are interesting from the evolutionary point of view, they will provide guides for future studies of evolutionary aspects of the transporting mechanisms. Hopefully, the genetic and molecular biology approach, combined with biochemical and new physical techniques will extend the study of membrane transport of archaea to the molecular level.

## GELOVÉ TECHNIKY PRO MĚŘENÍ *IN SITU* VE VODÁCH, V PŮDÁCH A V SEDIMENTECH

PAVEL DIVIŠ, HANA DOČEKALOVÁ  
a VERONIKA ŘEZÁČOVÁ

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí,  
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno  
divis@fch.vutbr.cz

Došlo 27.8.04, přepracováno 18.3.05, přijato 7.4.05.

Klíčová slova: gelové techniky, difuzní gradient v tenkém filmu, difuzní rovnováha v tenkém filmu, přírodní vody, sediment, půda

### Obsah

1. Úvod
2. Technika difuzní rovnováhy v tenkém filmu
3. Technika difuzního gradientu v tenkém filmu
  - 3.1. Použití techniky difuzního gradientu v tenkém filmu pro speciální analýzu
  - 3.2. Použití techniky difuzního gradientu v tenkém filmu pro analýzu přírodních vod
  - 3.3. Použití techniky difuzního gradientu v tenkém filmu pro analýzu sedimentů a půd
4. Závěr

### 1. Úvod

Získání plně spolehlivých informací o distribuci chemických forem kovů (specií) v jednotlivých složkách životního prostředí je obtížné. V průběhu odběru a během dalšího zpracování před vlastním analytickým stanovením probíhají totiž ve vzorku fyzikálně-chemické změny, které mají za následek změnu rozdělení specií a vedou tak k chybným závěrům při interpretaci získaných výsledků<sup>1</sup>. Těmto případným transformačním změnám se lze vyhnout měřeními *in situ*. Výhodou měření *in situ* je kromě eliminace rušivých vlivů při vzorkování, a následně po vzorkování, také možnost získání detailních časových a prostorových dat, či měření koncentračních gradientů a toků látek na přírodních rozhraních.

V dnešní době je i přes více než desetiletí práce v oblasti měření *in situ* možno mluvit pouze o počátcích praktického používání technik *in situ*, neboť jejich vývoj a ověření jsou často obtížné a zdlouhavé.

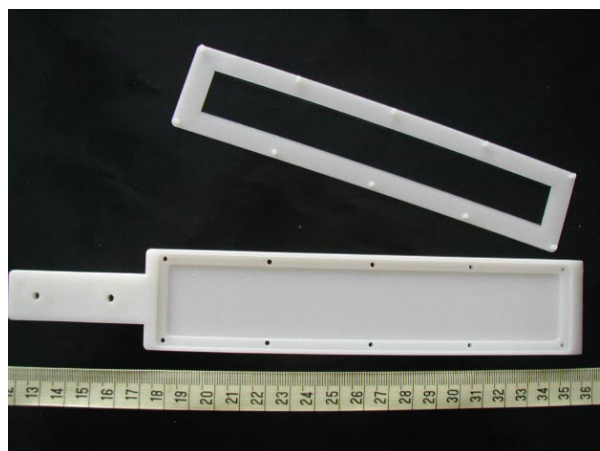
Mezi nejběžněji používané techniky pro analýzu přírodních systémů *in situ* patří aplikace elektrod a mikroelektrod<sup>2-4</sup>, které kontinuálně zaznamenávají informace o koncentraci definovaných chemických forem ve sledovaném systému. Dalšími používanými technikami jsou voltametrie<sup>5,6</sup> a dialýza<sup>7-9</sup>. Pokrok v měření *in situ* pak znamenají nové vzorkovací gelové techniky, a to technika difuzní rovnováhy v tenkém filmu (diffusive equilibrium in thin films technique – technika DET)<sup>10</sup> a technika difuzního gradientu v tenkém filmu (diffusive gradients in thin films technique – technika DGT)<sup>11</sup>.

V předkládaném příspěvku jsou představeny tyto nové *in situ* vzorkovací techniky, jejichž základem je ustavení rovnováhy a difuze sledovaných specií v tenkém filmu polyakrylamidového hydrogelu.

### 2. Technika difuzní rovnováhy v tenkém filmu

Technika difuzní rovnováhy v tenkém filmu (DET) byla vyvinuta z potřeby znalosti koncentračních gradientů na fázovém rozhraní voda-sediment s vysokým vertikálním rozlišením, neboť právě toto úzké milimetrové rozhraní je těsně spojeno s pohybem a chemickými změnami přírodních a antropogenních polutantů<sup>12</sup>.

Technika DET pracuje na podobném principu jako dialyzační jednotky. K vzorkování však používá plátek (< 1 mm) polyakrylamidového hydrogelu, běžně používaného při elektroforetickém dělení bílkovin, který je uzavřen spolu s membránovým filtrem o velikosti pórů 0,45 μm v plastové sondě (obr. 1). Tento gel obsahuje 95 % vody a hodnoty difuzních koeficientů měřených specií v gelu jsou tak velmi blízké hodnotám ve vodě<sup>13</sup>. Velikosti pórů používaného polyakrylamidového gelu jsou 2–5 nm, takže



Obr. 1. Vzorkovací jednotka pro měření *in situ* v sedimentech technikami DET a DGT

hydratované kationty kovů s poloměry 0,2–0,3 nm a menší komplexy s organickými ligandy do gelu snadno difundují<sup>13</sup>. Rovnováha mezi koncentracemi chemických forem v gelu a v okolní vodě se na rozdíl od dialyzačních jednotek ustavuje velmi rychle (řádově hodiny na rozdíl od dnů až týdnů)<sup>14</sup>. Po dosažení koncentrační rovnováhy je sonda vytažena ze sedimentu, polyakrylamidový gel je vyjmut a nakrájen na pruhy o šířce řídící se požadovaným prostorovým rozlišením hloubkového koncentračního profilu. Koncentrace měřených specií v exponovaném gelu je stanovena vhodnou analytickou metodou po eluci gelu známým objemem eluentu, kterým je většinou zředěná kyselina dusičná.

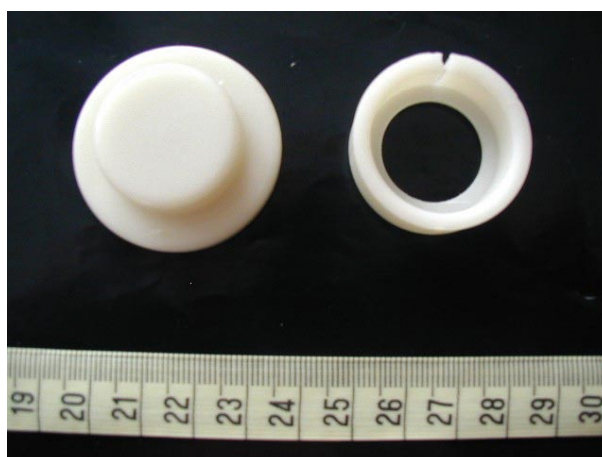
Nevýhodou použití techniky DET může být fakt, že pruh polyakrylamidového gelu je kontinuální vzorkovací médium. Měřené koncentrační hloubkové profily tak mohou být zkreslovány vlivem laterální difuze probíhající v samotném gelu, která roste s tloušťkou gelu<sup>13</sup>. Při vytažení sondy DET ze sedimentu se koncentrační profil v gelu rozmývá, a proto je nutné gel buď velmi rychle nařezat na příslušné pásy dle požadovaného prostorového rozlišení nebo ionty v gelu zafixovat<sup>13</sup>. U většiny iontů se fixace provádí ponořením sondy do zředěného roztoku NaOH nebo KOH (cit.<sup>10,13</sup>). Tloušťka gelu a rychlost fixace jsou určující pro velikost získaného hloubkového rozlišení. Zafixování iontů do 20 s umožňuje měření s milimetrovým rozlišením, pro rozlišení  $1 \cdot 10^{-3}$  mm je třeba použít velmi tenký gel a fixaci provést do 2 s (cit.<sup>13</sup>). Problém rozmývání koncentračního profilu lze obejít použitím dělených DET sond, kde je gel již při přípravě sondy DET rozdělen do vzájemně izolovaných prostor<sup>14–16</sup>.

Technika DET je v současnosti systematicky studována a aplikačně rozvíjena. Do dnešní doby byla použita v řadě studií, především pro stanovení hloubkových profilů iontů majoritních prvků Fe, Mn, Ca, Mg a K (cit.<sup>17–19</sup>), prvků minoritních i stopových Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Zn, As, Tl a dalších<sup>15</sup>, U, Mo, Re (cit.<sup>16</sup>) nebo aniontů  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  (cit.<sup>15,18–21</sup>). Technika DET byla také použita pro sledování alkality a celkového obsahu  $\text{CO}_2$  v sedimentech<sup>18</sup>.

Technikou DET lze tedy velmi snadno získat informace o koncentracích rozpuštěných specií v pórové vodě sedimentů s vysokým hloubkovým rozlišením. Koncentrace některých environmentálně zajímavých specií jsou však často velmi nízké a pod detekční schopnosti běžně dostupných analytických metod. Z toho důvodu byla vyvinuta technika DGT, která v sobě zahrnuje možnost zkoncentrování.

### 3. Technika difuzního gradientu v tenkém filmu

Technika difuzního gradientu v tenkém filmu (DGT) byla poprvé popsána v roce 1994. Jejím základem je polyakrylamidový hydrogel stejného složení jako u techniky DET. Její použití není založeno na ustavení rovnováhy mezi roztokem a gelem jako u techniky DET, ale na kine-

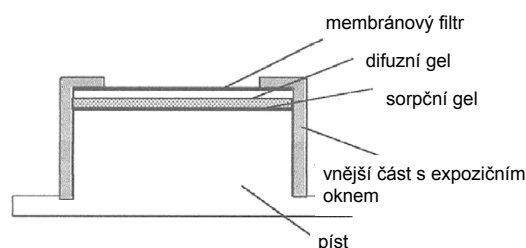


Obr. 2. Vzorkovací jednotka pro měření *in situ* ve vodách a v půdách technikou DGT

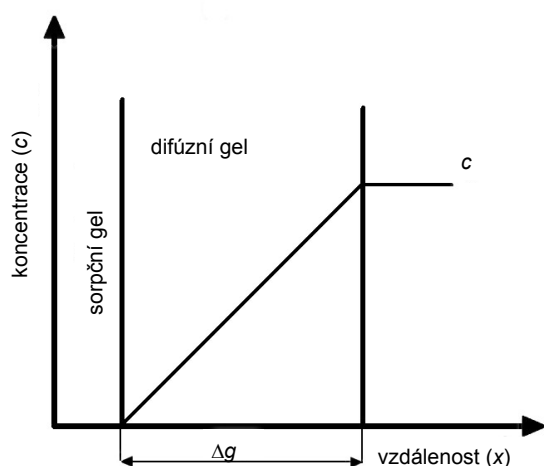
tické separaci specií z roztoku a jejich kumulaci v sorpčním médiu<sup>11</sup>. Pro měření hloubkových profilů v sedimentech využívá technika DGT stejné vzorkovací jednotky jako technika DET (obr. 1). Pro měření v půdách a ve vodách používá jednoduchou vzorkovací jednotku tvaru pístu vyrobenou z plastu (obr. 2), ve které jsou uzavřeny dvě vrstvy polyakrylamidového hydrogelu, sorpční a difuzní (obr. 3). První vrstva hydrogelu, která obsahuje specifické sorpční médium, je překryta vrstvou difuzního permeabilního hydrogelu tak, že jen tento difuzní gel přichází do styku s vnějším roztokem. Membránový filtr chrání difuzní gel před mechanickým poškozením (obr. 3).

Po ponoření jednotky DGT do měřeného roztoku difundují ionty přes dobře definovanou vrstvu difuzního gelu o známé tloušťce  $\Delta g$  k sorpčnímu médiu (obr. 4). Nejpoužívanějším sorpčním médiem pro stanovení kovů je chelataující iontoměnič Chelex-100 s vázanými skupinami kyseliny iminodiacetové. Ionty prošlé difuzním gelem jsou na povrchu iontoměniče imobilizovány na funkčních skupinách, a to tak dlouho, dokud není jeho kapacita nasycena.

V difuzním gelu se tak ve velmi krátké době (asi 60 s) ustaví lineární koncentrační gradient (obr. 4). Jestliže tento



Obr. 3. Schéma uložení gelů ve vzorkovací jednotce DGT (cit.<sup>66</sup>)



Obr. 4. Schématické znázornění koncentračního gradientu ve vorkovací jednotce DGT

gradient zůstává během doby měření  $t$  konstantní, lze podle prvního Fickova zákona difuze vypočítat tok analytu  $F$  přes difúzní vrstvu  $\Delta g$  podle vztahu (1) :

$$F = \frac{M}{A \cdot t} = \frac{D \cdot c}{\Delta g} \quad (1)$$

$M$  je množství kovu navázané na iontoměnič,  $A$  je plocha exponovaného difúzního gelu,  $D$  je difúzní koeficient kovu v gelu a  $c$  je koncentrace kovu v měřeném roztoku. Koncentrace  $c$  může být zpětně vypočtena z naměřeného toku  $F$  (rovnice 2).

$$c = \frac{M \cdot \Delta g}{D \cdot t \cdot A} \quad (2)$$

Množství kovu  $M$  navázané na iontoměnič může být po vysušení gelu stanoveno přímým měřením nedestruktivními technikami, např. rentgenovou fluorescencí XRF nebo technikou PIXE (částicemi indukovaná rentgenová emise)<sup>22</sup>. Alternativou tohoto postupu pak může být eluce kovu z iontoměničového gelu za použití známého objemu elučního činidla (při stanovení kovů nejčastěji zředěné kyseliny dusičné) a analýza eluátu technikami atomové absorpční či atomové emisní spektrometrie<sup>23</sup>.

Množství kovu zachyceného na iontoměnič a následně změřené analytickou metodou však nemusí vypovídat o jeho celkové koncentraci v okolním roztoku. Jednotka DGT automaticky hromadí pouze ty formy kovu, které se difuzí přes difúzní gel dostanou k iontoměniči a jsou schopny se na něj vázat. Tohoto faktu je možno využít pro speciální analýzu.

### 3.1. Použití techniky difúzního gradientu v tenkém filmu pro speciální analýzu

Výběrem difúzního gelu a sorpčního média lze určo-

vat, které formy kovů budou technikou DGT měřeny.

Základní vlastností difúzního gelu je velikost pórů, která určuje velikost specií schopných procházet gelem. Velikost pórů v gelu lze určovat při přípravě gelu volbou monomeru a síťovadla.

Nejběžněji používaný polyakrylamidový gel pro techniku DGT, zkráceně označovaný jako gel APA, je shodný s gelem používaným v technice DET. Gel je připravován polymerizací směsi monomerního akrylamidu a agarosového síťovadla (DGT Research, Lancaster, Velká Británie), po přidání katalyzátoru ( $N,N,N',N'$ -tetramethylethyldiamin) a iniciátoru polymerizační reakce  $(NH_4)_2S_2O_8$  (cit<sup>23</sup>). Připravený gel APA má velikost pórů 2–5 nm (cit<sup>24</sup>). Použitím jednotky s difúzní vrstvou gelu APA je tedy možno získat informace o mobilních anorganických a menších organických formách iontů ve sledovaném systému<sup>25</sup>.

Změnou použitého síťovadla nebo změnou jeho koncentrace při přípravě gelu lze kromě výše popsaného gelu APA připravit také tzv. omezující gel, označovaný jako gel RG s velikostí pórů  $< 1$  nm umožňující volnou difuzi iontů kovů, ale zabráňující difuzi objemnějších komplexních sloučenin<sup>24</sup>. Použitím gelu RG mohou být získány informace pouze o mobilních anorganických formách<sup>24,25</sup>.

Zcela jiný než běžně používaný gel APA je agarosový gel, označovaný jako gel AGA. Agarosa, lineární polysacharid složený z opakujících se jednotek agarobiosy (vzájemně vázaná  $\beta$ -D-galaktopyranosa a 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galaktopyranosa), tvoří rozpouštěním v horké vodě dvojšroubovice, které jsou pak během chlazení roztoku asociovány do trojrozměrné sítě vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi. Vzniklý gel má pory  $> 20$  nm a umožňuje difuzi i velkých přírodních komplexů s fulvovými a huminovými kyselinami<sup>24</sup>.

Použitím gelů s různou velikostí pórů tak lze od sebe rozlišit anorganické formy kovů a kovy vázané v malých a velkých komplexech<sup>25,26</sup>.

Vedle velikosti pórů difúzního gelu je významným faktorem při použití techniky DGT také tloušťka difúzního gelu. Na funkční skupiny iontoměniče v sorpčním gelu se vážou volné kovové ionty a ty frakce kovů, které jsou vázány v tzv. kineticky labilních komplexech, tedy komplexy, které v průběhu difuze vrstvou difúzního gelu stačí disociovat<sup>23</sup>. Čas  $t$  potřebný pro difuzi látky gelem tloušťky  $\Delta g$  je dán rovnicí 3 (cit<sup>23</sup>):

$$t = \frac{\Delta g^2}{\pi \cdot D} \quad (3)$$

Pro běžně používanou tloušťku difúzního gelu 0,5 mm a  $D = 7.10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  je  $t = 2$  min. Zvyšováním tloušťky gelu je však možno prodloužit dobu difuze a umožnit tak disociaci i kineticky stabilnějším komplexům.

Charakter měřených látek určuje také výběr sorpčního média v sorpčním gelu, neboť labilitu kovových komplexů je možné také ovlivnit výběrem iontoměniče s větší sorpční afinitou.

### 3.2. Použití techniky difuzního gradientu v tenkém filmu pro analýzu přírodních vod

Technika DGT využívající chelatující iontoměnič Chelex-100 je dnes běžně používána pro stanovení celé škály labilních kovových specií *in situ* v přírodních vodách. Byla úspěšně použita pro měření koncentrací stopových, ale i minoritních a majoritních kovů v jezerech, v řekách a v mořích (tab. I). Garmo a spol. (cit.<sup>40</sup>) uvádí použití techniky DGT pro měření více než 30 vybraných kovů v přírodních vodách.

V posledních letech byla vyzkoušena řada nových sorpčních gelů, které v mnoha případech umožňují stanovení širšího spektra chemických specií. Pro měření radionuklidů Cs a Sr ve vodách byl použit sorpční gel obsahující iontoměnič AG50W-X8 (cit.<sup>41</sup>) nebo gel obsahující vázaný fosfomolybdenan amonný<sup>42</sup>. Jako sorpční médium byly rovněž použity membrány na bázi celulosy s funkčními skupinami kyseliny fosforečné<sup>43</sup>. Tato modifikace techniky DGT se ukázala být vhodná pro měření Cu a Cd. Podobných výsledků bylo dosaženo při použití kopolymerního gelu z akrylamidoglykolové kyseliny a akrylamidu<sup>44</sup>. Popsána jsou také sorpční média založená na jiném principu než na iontové výměně, např. na srážení. Pro stanovení fosfátů tak bylo využito oxidů železa<sup>45</sup> a pro stanovení sulfidů jodidu stříbrného fixovaného v sorpčním gelu<sup>46,47</sup>.

Technika DGT umožňuje měřit v širokém rozsahu koncentrací kovových specií ve sledovaném systému. Při aplikaci jsou kovové ionty zkoncentrovány vazbou v sorbentu. Delší doba expozice vzorkovací jednotky DGT vede ke kumulaci většího množství kovu a tím ke snížení detekčního limitu měření. Technika DGT je proto vhodná

pro měření stopových a ultrastopových koncentrací labilních kovových specií. Touto technikou lze pohodlně stanovit koncentrace celé řady kovů řádově v jednotkách  $1 \cdot 10^{-12} \text{ g l}^{-1}$  s přesností jednotek procent za současné kontroly toku iontů<sup>23</sup> nezávisle na hydrodynamice vzorkovaného systému. Maximální doba expozice jednotek DGT závisí na kapacitě a selektivitě použitého sorbentu. Při použití neselektivního sorbentu v přírodních systémech je sorbent nasycen během několikahodinové expozice<sup>41</sup> v důsledku kumulace majoritních iontů. Pro Chelex-100, který je selektivní k iontům stopových kovů, může být doba expozice v čistých přírodních vodách až několik měsíců, aniž se sorpční vrstva DGT vzorkovací jednotky nasytí<sup>23</sup>. Koncentrace naměřené technikou DGT představují průměrné koncentrace za daný čas expozice vzorkovacích jednotek DGT a lépe vypovídají o stavu sledovaného systému než údaje zjištěné při jednorázovém odběru.

Významnými parametry ovlivňujícími měření technikou DGT je teplota, pH a iontová síla měřeného roztoku.

Polyakrylamidový difuzní gel v rozmezí teplot 5–35 °C nemění svou strukturu a vlastnosti<sup>23</sup>, a proto je při výpočtech DGT možné počítat s tabelovanými hodnotami difuzních koeficientů iontů ve vodě odpovídající teploty a techniku DGT použít pro měření ve většině přírodních vod.

Interval pH vhodný pro aplikaci techniky DGT je závislý na vlastnostech použitého sorbentu. Pro stanovení kovů za použití iontoměniče Chelex-100 bylo nalezeno optimální pH v rozmezí 4,5–9 (cit.<sup>23</sup>), což rovněž odpovídá hodnotám pH většiny přírodních vod.

Technika DGT poskytuje spolehlivé výsledky při měření v roztocích o iontové síle větší než  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  (cit.<sup>34</sup>). Pouze ve vodách s velmi nízkým celkovým obsa-

Tabulka I

Příklady použití techniky difuzního gradientu v tenkém filmu pro sledování koncentrací kovů v přírodních vodách

Kov	Vzorkovací místo	Lit.
Zn, Mn, Fe	Anglie, Atlantický oceán, průliv Menai Straits	11,23
Cu, Cd, Mn	Austrálie, Tasmánie, řeka Pieman; Victoria, řeka Hopkins	19
Mn, Fe, Co, Al, Ba, Ni	Anglie, jezero Esthwaite	26
Cd, Cu, Ni, Ca, Mg,	Kanada, jezero Tantaré	27
Fe, Mn, Zn, Cu, Cr, Pb, Ni, Ag, As	Itálie, Benátská laguna	28
Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn	Nový Zeland, Dunedin; řeka Leith	29
Ca, Mg, Cd, Cu, Ni	Švédsko, jezero Kutsasjarvi	30
Cu	Kanada, zátoky Cape Cod a San Diego; ústí řeky Elizabeth	31
Cd, Cu, Pb, Zn	Austrálie, zátoky Westernport Marina, Hastings Jetty, St. Kilda Marina, St. Kilda Pier	32
Cu, Zn, Ni, Cd, Pb, Mn	Švýcarsko, jezero Greifen	33
Cu, Cd	Kanada, jezero Tantaré	34
Fe, Mn; Cu, Zn	Anglie, jezera Windermere, Hawes, Esthwaite, Abbeystead, Lavers	35
Cu, Co, Cd, Pb	Austrálie, Fort hill Wharf, zátoka Darwin	36
Cu, Zn, Ni, Pb	Austrálie, moře, Gold Coast Broadwater	37



hem kationtů je difuze měřených iontů do jednotky DGT ovlivněna jinými ionty, především ionty  $\text{Na}^+$  uvolněnými z funkčních skupin iontoměniče Chelex-100, což vede k malé kladné chybě měření<sup>29</sup>.

### 3.3. Použití techniky difuzního gradientu v tenkém filmu pro analýzu sedimentů a půd

Techniku DGT je podobně jako techniku DET možné použít k měření hloubkových profilů kovů ve vodě v pórech sedimentů (tab. II). Prekoncentrační schopnost techniky DGT umožňuje stanovení i těch kovových specií, které není možno v důsledku jejich nízké koncentrace stanovit technikou DET.

Voda v pórech sedimentů představuje ve srovnání s přírodními vodami objemově omezený a nemíchaný systém. Při použití v sedimentu tak může jednotka DGT kvůli difuzi iontů difuzním gelem a následnému zachytu iontů v sorpčním médiu snižovat jejich koncentraci ve vodě v pórech<sup>55</sup>. Vypočtená koncentrace z rovnice (2) pak může být interpretována jako koncentrace iontů ve vodě v pórech pouze tehdy, je-li proces uvolňování iontů z tuhé fáze sedimentu do této vody velmi rychlý, takže stačí vyrovnávat deficit vzniklý odčerpáním iontů jednotkou DGT<sup>55,56</sup>.

Jestliže sediment nedokáže rychle vyrovnávat koncentrační změny iontů ve vodě v pórech, je aktuální koncentrace iontů na povrchu jednotky DGT v každém časovém okamžiku za předpokladu lineární difuze definována druhým Fickovým zákonem difuze.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (4)$$

Do jaké míry se doplňují ionty z tuhé fáze sedimentu do vody v pórech lze zjistit současnou aplikací dvou jednotek DGT s rozdílnou tloušťkou difuzní vrstvy  $\Delta g_1$  a  $\Delta g_2$  ( $\Delta g_1 > \Delta g_2$ ) (cit.<sup>51,54</sup>) nebo pomocí poměru  $R$  (rov. 5) (cit.<sup>55</sup>). Při výpočtech  $R$  musí být koncentrace kovu ve vodě v pórech

$c_{pv}$  stanovena jinou, srovnatelnou a dostupnou technikou.

$$R = \frac{c_{DGT}}{c_{pv}} \quad \{0 < R < 1\} \quad (5)$$

Technika DGT představuje nový nástroj pro odhad dostupnosti kovů v půdách (tab. II). Na rozdíl od řady postupů doporučených pro charakterizaci půd<sup>64,65</sup>, které poskytují údaje spíše o celkovém množství, či o určitém extrahovatelném podílu kovu přítomného v půdě, má technika DGT tu výhodu, že může svým aktivním, nedestruktivním způsobem vzorkování vypovídat o podílu kovu dostupného pro kořenový systém rostlin. Jednotka DGT z půdního roztoku kumuluje ionty, hydratované ionty, mobilní a labilní kovové species, tedy právě ty formy kovů, které jsou dostupné pro rostliny.

Interpretace naměřených výsledků při měření v půdách se řídí stejným principem jako při použití techniky DGT v sedimentech.

## 4. Závěr

V předložené práci jsou představeny dvě nové gelové techniky pro vzorkování *in situ*, a to technika DET a technika DGT. Tyto techniky patří k novým, moderním přístupům používaných k analýze přírodních systémů, jejichž použití neustále roste.

Technikou DET lze snadno měřit hloubkové koncentrační profily kationtů a aniontů ve vodě v pórech sedimentů s vysokým prostorovým rozlišením.

Technika DGT je jednoduchá prekoncentrační technika pro řadu prvků, která je běžně používána ke stanovení průměrných koncentrací rozpustných látek ve vodných systémech. Pro svou schopnost koncentrace poskytuje možnost stanovení obsahu kovů, které se v přírodních systémech vyskytují ve stopových množstvích. Sorpce na selektivní sorpční médium současně odděluje měřené analyty od mnohdy komplikované matrice, čímž značně zjed-

Tabulka II

Příklady použití techniky difuzního gradientu v tenkém filmu pro sledování koncentrací kovů ve vodě v pórech sedimentů a půd

Kov <sup>a</sup>	Vzorkovací místo	Lit.	Kov <sup>b</sup>	Vzorkovací místo	Lit.
Cu, Co, Ni, Fe, Zn, Cd, Mn	Anglie, jezero Esthwaite	10,48,52	Zn, Cu, Cd, Ni	Německo, Braunschweig	57
Zn, As, Fe, Mn	Anglie, řeka Sankey	22	Zn, Cu, Cd, Ni, Pb, Zn	Skotsko, Lanarkshire	58
Co, Cd, Fe, Mn	Černé moře	49	Zn, Cu, Cd, Ni, Pb, Zn	Anglie, Stagnogley	59
Co, Ni, As, Mn, Fe	Skotsko, jezero Duich	50,51,53	Cu	Anglie, Merseyside	60,63
Cd, Pb, Mn, Fe	Česká republika, rybník Ochoz	54	Cd,Cr,Ni, Cu, Cu	Česká republika, Zlín	61

<sup>a</sup> Sedimenty, <sup>b</sup> půdy



noduše konečnou analýzu.

Kombinováním více jednotek s různými typy sorpčních a difuzních gelů lze techniku DGT úspěšně použít ke speciální analýze. Při použití jednotek DGT v sedimentech slouží získaná data k odhadu hmotnostních toků ze sedimentu do okolní vody v pórech a k vytvoření hloubkových profilů. Ze získaných dat je možno matematickými modely určit termodynamické a kinetické konstanty, jako např. distribuční koeficienty kovů charakterizující rozdělení labilních forem kovů mezi tuhou a kapalnou fází v sedimentech a v půdách. V půdách pak umožňuje technika DGT ve srovnání s běžnými postupy používanými k jejich charakterizaci mnohem věrněji odhadnout množství dostupných forem kovů.

Výběr nových sorpčních médií a modifikace sorpčních a difuzních gelů otevírají široké možnosti pro další rozvoj těchto nadějných technik *in situ* a jejich použití pro monitorování znečištění životního prostředí, studium procesů probíhajících v sedimentech, dostupnosti prvků v půdách a celkového koloběhu prvků v životním prostředí.

#### LITERATURA

- Benjamin M. M.: *Environ. Sci. Technol.* 17, 686 (1983).
- Carignan R., Rapin F., Tessier A.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 49, 2493 (1985).
- Revsbech N. P., Jorgensen B. B., Blackburn T. H.: *Science* 207, 1355 (1980).
- Brendel P. J., Luther G. W.: *Environ. Sci. Technol.* 29, 751 (1995).
- Bersier P. M., Howell J., Bruntlett C.: *Analyst* 119, 219 (1994).
- Taillefert M., Luther G. W., Nuzzio D. B.: *Electroanalysis* 12, 401 (2000).
- Hesslein R. H.: *Limnol. Oceanogr.* 21, 912 (1976).
- Brandl H., Hanselmann K. W.: *Aquat. Sci.* 53, 54 (1991).
- Carignan R.: *Limnol. Oceanogr.* 29, 667 (1984).
- Davison W., Grime G. W., Morgan J. A. W., Clarke K.: *Nature* 352, 323 (1991).
- Davison W., Zhang H.: *Nature* 367, 546 (1994).
- Santschi P., Hohener P., Bendit G., Buchholtz ten Brink M.: *Mar. Chem.* 30, 269 (1990).
- Davison W., Zhang H., Grime G. W.: *Environ. Sci. Technol.* 28, 1627 (1994).
- Harper M. P., Davison W., Tych W.: *Environ. Sci. Technol.* 31, 3110 (1997).
- Dočekalová H., Clarrise O., Salomon S., Wartel M.: *Talanta* 57, 145 (2002).
- Morford J., Kalnejais L., Martin W., Francois R., Karle I. M.: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 285, 85 (2003).
- Zhang H., Davison W., Ottley C.: *Aquat. Sci.* 61, 354 (1999).
- Mortimer R. J. G., Krom M. D., Hall P. O. J., Hulth S., Stahl H.: *Mar. Chem.* 63, 119 (1998).
- Shuttleworth S. M., Davison W., Taylor J. H.: *Environ. Sci. Technol.* 33, 4169 (1999).
- Hall P. O. J., Aller R.: *Limnol. Oceanogr.* 37, 1113 (1992).
- Mortimer R. J. G., Krom M. D., Boyle D. R., Nishri A.: *Limnol. Oceanogr.* 44, 1802 (1999).
- Davison W., Fones G., Grime G. W.: *Nature* 387, 885 (1997).
- Zhang H., Davison W.: *Anal. Chem.* 67, 3391 (1995).
- Zhang H., Davison W.: *Anal. Chim. Acta* 398, 329 (1999).
- Denney S., Sherrwood J., Leyden J.: *Sci. Total. Environ.* 239, 71 (1999).
- Hamilton-Taylor J., Smith E. J., Davison W., Zhang H.: *Limnol. Oceanogr.* 44, 1772 (1999).
- Alfaro de la Torre M. C., Beaulieu P. Y., Tessier A.: *Anal. Chim. Acta* 418, 53 (2000).
- Giusti L., Zhang H.: *Environ. Geochem. Health* 24, 47 (2002).
- Sangi M. R., Halstead M. J., Hunter K. A.: *Anal. Chim. Acta* 456, 241 (2002).
- Dahlqvist R., Zhang H., Ingri J., Davison W.: *Anal. Chim. Acta* 460, 247 (2002).
- Twiss M. R., Moffet J. W.: *Environ. Sci. Technol.* 36, 1061 (2002).
- Webb J. A., Keough M. J.: *Mar. Pollut. Bull.* 44, 222 (2002).
- Odzak N., Kistler D., Xue H., Sigg L.: *Aquat. Sci.* 64, 292 (2002).
- Peters A. J., Zhang H., Davison W.: *Anal. Chim. Acta* 478, 237 (2003).
- Gimpel J.: Zhang H., Davison W., Edwards A. C.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 138 (2003).
- Munksgaard N. C., Parry D. L.: *J. Environ. Monitor.* 5, 145 (2003).
- Dunn R. J. K., Teasdale P. R., Warnken J., Schleich R. R.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 2794 (2003).
- Zhang H., Davison W.: *Anal. Chem.* 72, 4447 (2000).
- Zhang H., Davison W.: *Pure Appl. Chem.* 73, 9 (2001).
- Garmo O. A., Royset O., Steiness E., Flaten T. P.: *Anal. Chem.* 75, 3573 (2003).
- Chang L. Y., Davison W., Zhang H., Kelly M.: *Anal. Chim. Acta* 368, 243 (1998).
- Murdock Ch., Kelly M., Chang L. Y., Davison W., Zhang H.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 4530 (2001).
- Li W., Zhao H., Teasdale P. R., John R., Zhang S.: *Anal. Chim. Acta* 464, 331 (2002).
- Li W., Zhao H., Teasdale P. R., John R., Zhang S.: *React. Funct. Polym.* 52, 31 (2002).
- Zhang H., Davison W., Gadi R., Kobayashi T.: *Anal. Chim. Acta* 370, 29 (1998).
- Teasdale P. R., Hayward S., Davison W.: *Anal. Chem.* 71, 2186 (1999).
- DeVries C. R., Wang F.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 792 (2003).
- Zhang H., Davison W., Miller S., Tych W.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 4181 (1995).

49. Fones G. R., Davison W., Holby O., Jorgensen B. B., Thamdrup B.: *Limnol. Oceanogr.* **46**, 982 (2001).
50. Krom M. D., Mortimer R. J. G., Poulton S. W., Hayes P., Davies I. M., Davison W., Zhang H.: *Aquat. Sci.* **64**, 282 (2002).
51. Zhang H., Davison W., Mortimer R. J. G., Krom M. D., Hayes P. J., Davies I. M.: *Sci. Total Environ.* **296**, 175 (2002).
52. Motelica-Heino M., Naylor Ch., Zhang H., Davison W.: *Environ. Sci. Technol.* **37**, 4374 (2003).
53. Mortimer R. J. G., Krom M. D., Harris S. J., Hayes P. J., Davies I. M., Davison W., Zhang H.: *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **236**, 31 (2002).
54. Diviš P., Dočekalová H., Smetková V.: *Chem. Listy* **97**, 1184 (2003).
55. Harper M. P., Davison W., Tych W.: *Aquat. Geochem.* **5**, 337 (1999).
56. Harper M. P., Davison W., Zhang H., Tych W.: *Geochim. Cosmochim. Acta* **62**, 2757 (1998).
57. Zhang H., Davison W., Knight B., McGrath S.: *Environ. Sci. Technol.* **32**, 704 (1998).
58. Hooda P.S., Zhang H., Davison W., Edwards A. C.: *Europ. J. Soil Sci.* **50**, 285 (1999).
59. Davison W., Hooda P. S., Zhang H., Edwards A. C.: *Adv. Environ. Res.* **3**, 550 (2000).
60. Zhang H., Zhao Fang-Jie, Sun B., Davison W., McGrath S. P.: *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2602 (2001).
61. Dočekal B., Smetková V., Dočekalová H.: *Chem. Pap.* **57**, 161 (2003).
62. Nowack B., Koehler S., Schulin R.: *Environ. Sci. Technol.* **38**, 1133 (2004).
63. Song J., Zhao F., Luo Y., McGrath S. P., Zhang H.: *Environ. Pollut.* **128**, 307 (2004).
64. Ure A. M., Quevauviller P., Muntau H., Griepink B.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **51**, 135 (1993).
65. Gupta S. K., Aten C.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **51**, 25 (1993).
66. <http://www.dgtresearch.com>, staženo 19.4. 2003.

**P. Diviš, H. Dočekalová, and V. Smetková**  
*(Department of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno): Gel Techniques for *in situ* Measurement in Natural Waters, Soils and Sediments*

The diffusive equilibrium in thin films (DET) and diffusive gradient in thin films (DGT) gel techniques have been shown as a new approach to *in situ* measurements of trace metals and their species in aquatic systems. This review briefly demonstrates the ability of the DET technique to provide information about the depth profiles of solutes in sediment pore water with high resolution. The DGT technique, based on Fick's First diffusion law, is introduced as a robust technique, which is easy to use for *in situ* measurement of metal species in natural waters. The DGT technique uses a simple device, which, after passage through a hydrogel, accumulates solutes on a sorbent, such as Chelex-100, acting as a well defined diffusion layer. By simply controlling the mass transport to the sorbent, it is possible to quantify the accumulated metals by measurement of flux or concentration. The quality of diffusive layer is the major factor in determination of the measured species. Metal ions are preconcentrated *in situ* in the sorbent layer; hence, very low detection limits are possible. The deployment times can vary from 1 h to several months in natural waters. The DGT provides a time-averaged solute concentration and could be used for measuring mean concentrations over a time period. The other parameters of natural waters like temperature, pH and ionic strength do not affect the measurement. When used for assessment of element availability in soils and sediments, the DGT results are interpreted as fluxes from the solid phase to solution. Both the described gel techniques are very useful tools for monitoring of pollution as well as in study of metal availability in soils and sediments and trace metal circulation in the environment.

## DEGRADAČNÍ PRODUKTY A NEČISTOTY PARACETAMOLU Z HLEDISKA JEJICH DETEKCE

LENKA HANYŠOVÁ, PETR KASTNER  
a JIŘÍ KLIMEŠ

*Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové*

*Hanysova@faf.cuni.cz*

Došlo 12.7.04, přepracováno 8.2.05, přijato 12.3.05.

Klíčová slova: paracetamol, nečistoty, 4-aminofenol, stabilita

### Obsah

1. Úvod
2. Detekce *p*-aminofenolu
3. Detekce 4-chloracetanilidu
4. Detekce oxidačních produktů 4-aminofenolu
5. Detekce 4-acetamidofenyl-acetátu
6. Závěr

### 1. Úvod

Paracetamol (4-acetamidofenol) je široce užívané léčivo pro své analgetické a antipyretické vlastnosti. Paracetamol se často užívá pro snížení horečky u bakteriálních či virových infekcí i u dětí, těhotných žen i starších pacientů, kteří se též potýkají s osteoartritidou a nezářlivými muskuloskeletárními potížemi<sup>13,30,31</sup>.

V České republice je registrováno mnoho léčivých přípravků s obsahem paracetamolu, ať již jde o přípravky jednosložkové nebo kombinované.

V současné době je kladen důraz na zabezpečení stále účinnějších a bezpečnějších léků. Jedním z hlavních atributů je stabilita léčiv a léků. Studium stability poskytuje údaje o primárních změnách fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých složek léku proti původnímu stavu vlivem vnějších a vnitřních faktorů. Hlavním rozkladným procesem probíhajícím u léčiv se strukturou amidu je hydrolýza. V literatuře<sup>29,37,39,44</sup> byl popsán mechanismus alkalické a kyselé hydrolýzy paracetamolu. Paracetamol je také citlivý na světlo a pokud obsahuje stopy 4-aminofenolu, oxiduje se, což se projeví barevnými změnami.

4-Aminofenoly se totiž dlouhodobým vystavením na vzduchu a světle snadno oxidují na chinony, chinoniminy

a semichinoniminy<sup>3,8,17</sup>. Suspenze obsahující paracetamol po 14 dnech výrazně mění zbarvení na hnědé až černé. Tenkovrstvou chromatografií lze prokázat přítomnost 4-aminofenolu a 4-acetamidofenyl-acetátu. Zatímco množství 4-aminofenolu a jeho barevných oxidačních produktů stoupá s časem, množství 4-acetamidofenyl-acetátu klesá až k nedetekovatelným hodnotám<sup>21</sup>. Při hodnocení 4-acetamidofenyl-acetátu se využívá chromatografických metod, TLC a GC<sup>21,23</sup>. Byl sledován vliv teploty, světla a UV záření na stabilitu 4-aminofenolu<sup>18</sup>. Další dominantní nečistotou paracetamolu je 4-chloracetanilid. Profil nečistot a rozkladných produktů paracetamolu je přehledně zaznamenán v tabulce I (cit.<sup>14</sup>).

Jeden z hlavních úkolů farmaceutů je zpracování léčiva tak, aby se neporušila jeho původní stabilita a vyloučily se nevhodné kombinace léčiv s pomocnými látkami nebo nevhodný způsob uchovávání. Z toho vyplývá náročnost a složitost posuzování kvality, která se projeví v konečném důsledku v účinnosti a bezpečnosti léku. Kvalita údajů o stabilitě testovaného léčiva nebo léčivého přípravku je závislá na použitých analytických kontrolních metodách. Při studiu stability se volí takové analytické metody, které umožňují postihnout už malé změny. Při studiu stability se kromě stanovení obsahu účinné látky klade důraz i na čistotu, a proto je třeba využít širokou škálu analytických metod. Pro analytické hodnocení paracetamolu a jeho degradačních produktů či nečistot se velmi často užívá spektrálních i chromatografických metod, zvláště TLC. V lékopisech se hodnotí čistota paracetamolu na základě zkoušek limitů, které udávají povolené množství 4-aminofenolu a 4-chloracetanilidu v substanci paracetamolu. Podle lékopisu USA (USP) se využívá k hodnocení 4-aminofenolu spektrofotometrie a porovnává se absorbance zkoušeného a porovnávacího roztoku (0,005 %) při vlnové délce 710 nm (cit.<sup>40</sup>). V evropském, britském a českém lékopise se barevná reakce 4-aminofenolu s čímidlem nitroprusidem sodným hodnotí vzhledem k porovnávacímu roztoku vizuálně<sup>6,10,11</sup>. Limitní množství 4-chloracetanilidu je v evropském, britském a českém lékopise také 0,005 %, jen v USP je tato hodnota 0,001 % v substanci paracetamolu a hodnotí se TLC.

Těžištěm této práce je přehledné zpracování analytických hodnocení nečistot a rozkladných produktů paracetamolu.

### 2. Detekce *p*-aminofenolu

#### Chromatografické metody

##### TLC

1. Vzorky z léčivého přípravku s obsahem paracetamolu byly při 45 °C ponechány 4 dny a poté byl obsah

Tabulka I  
Přehled doprovodných nečistot paracetamolu<sup>14</sup>

Nečistoty	Původ	Limity (dle USP)
4-Nitrofenol	prekurzor 4-aminofenolu	–
4-Aminofenol	meziprodukt při přípravě paracetamolu	< 0,025 %
4-Chloracetanilid	nečistota	< 10 p.p.m.
4-Acetamidofenyl-acetát	vedlejší produkt přípravy paracetamolu	1,1 až 1,3 %
Azoxybenzen	produkty redukce nitrobenzenu	–
Azobenzen		–
1,4-Benzochinon	oxidační produkty 4-aminofenolu	barevné změny paracetamolu
1,4-Benzochinonimin		(modrá, šedá, hnědá)
Semichinonimin		

4-aminofenolu analyzován na desce 0,25 mm silikagel GF 254 nm a jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/acetón/kyselina octová (80:18:2). Pod UV lampou při 254 nm byla vidět zelená fluorescence. Limit detekce 4-aminofenolu byl 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>21</sup>).

2. Stopy 4-aminofenolu byly analyzovány na silikagelových deskách a jako mobilní fáze byla použita směs methylethylketon-kyselina octová (9:1). Pro vizuální detekci bylo použito činidlo 4-(dimethylamino) cinnamaldehyd. Limit detekce 4-aminofenolu byl 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>27</sup>).

#### HPLC

1. Vzorky moči byly separovány na koloně s reverzní fází C 18 (300 × 3,9 mm, 10  $\mu\text{m}$ ). Jako mobilní fáze byla použita směs 0,005 M tetrabutylamonium-hydroxidu zneutralizovaného na pH 7,2 kyselinou fosforečnou s přídavkem 0,01 M tris(hydroxymethyl)aminomethanu a 0,005 M EDTA. Podíl methanolu v mobilní fázi se pohyboval od 0–50 %. Detekce při 254 nm, průtoková rychlost 2,0 ml  $\text{min}^{-1}$  (cit.<sup>19</sup>).
2. Vzorky moči byly separovány na koloně s reverzní fází C 18 (300 × 3,9 mm, 10  $\mu\text{m}$ ). Jako mobilní fáze byla použita 1% kyselina octová/methanol/ethylacetát (90:150:1) pH 2,8. Detekce při 254 nm, průtoková rychlost 2,0 ml  $\text{min}^{-1}$  (cit.<sup>19</sup>).
3. Vzorky moči po i.v. podání paracetamolu byly analyzovány na koloně s reverzní fází C 18 (300 × 3,9 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) gradientovou elucí. Mobilní fáze A byla voda obsahující 0,005 M tetrabutylamonium-hydroxid, 0,01 M tris(hydroxymethyl)aminomethan a 0,005 M EDTA a mobilní fáze B byl 50% methanol. Mobilní fáze A protékala kolonou rychlostí 2,0 ml  $\text{min}^{-1}$  v čase 0–4 min. Mobilní fáze B pak rychlostí 5,6 ml  $\text{min}^{-1}$ . Detekce při 254 nm (cit.<sup>19</sup>).
4. Separace 4-aminofenolu a dalších analgetik probíhala na koloně s reverzní fází C 18 (150 × 6,0 mm, 7  $\mu\text{m}$ ), mobilní fáze měla složení 1% kyselina octová / methanol (4:6, v/v). Detekce při 280 nm, průtoková rychlost 1,0 ml  $\text{min}^{-1}$  a limit detekce 4-aminofenolu byl 0,33  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>46</sup>).
5. Analýza 4-aminofenolu a dalších aromatických aminů a fenolů v biologickém materiálu byla prováděna na koloně s reverzní fází C 18, mobilní fáze měla složení methanol/voda/kyselina fosforečná (0:70:0.1, v/v/v). Detekce 215 nm a průtoková rychlost 1,0 ml  $\text{min}^{-1}$ . Limit detekce 4-aminofenolu byl 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>5</sup>).
6. Vzorky léčivého přípravku s obsahem paracetamolu byly analyzovány na koloně s náplní C, mobilní fáze měla složení acetonitril/fosfátový pufr pH 5,5 (80:20, v/v), detekce při 244 nm. Limit detekce 4-aminofenolu byl 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>25</sup>).
7. Vzorky moči byly analyzovány na koloně s reverzní fází C 18, 4-aminofenol byl detekován fluorimetricky. Excitační maximum bylo 329 nm a emisní maximum při 432 nm (cit.<sup>24</sup>).
8. 4-Aminofenol v barvách na vlasy byl analyzován na koloně s reverzní fází C 18, mobilní fáze byla směs methanol / 0,1% triethylamin – 0,02 mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$  o pH 5,20 (10:90) (cit.<sup>35</sup>).
9. Vzorky léčivého přípravku s obsahem paracetamolu byly separovány na polyethylenglykolové koloně (150 × 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), jako mobilní fáze sloužila směs 20 mM fosfátový pufr pH 7 / cetonitril (90:10, v/v), průtoková rychlost byla 1,0 ml  $\text{min}^{-1}$  a detekce proběhla při 280 nm (cit.<sup>15</sup>).
10. Vzorky z biologického materiálu byly separovány na koloně s reverzní fází C 18 (200 × 4,0 mm, 7  $\mu\text{m}$ ) a jako mobilní fáze byla použita směs methanol / 50 mmol  $\text{l}^{-1}$  fosfátový pufr (10:90, v/v). Elektrochemická detekce probíhala v trojelektrodové cele (disková zlatá elektroda, Ag/AgCl, kalomelová referenční elektroda s nasyceným roztokem KCl a platinová indikační elektroda). Limit detekce 4-aminofenolu byl 0,22 mg  $\text{ml}^{-1}$  (cit.<sup>48</sup>).
11. 4-Aminofenol byl separován na chromatografické koloně s iontovýměnnou pryskyřicí (průměr 5 mm). Jako mobilní fáze byl použit 0,2 M fosfátový pufr a 0,2 M borátový pufr s pH 2–9. Detekce byla při 244 nm (cit.<sup>22</sup>).

### Metoda GC-MS

4-Aminofenol byl analyzován ve vlasech, po kapalinové extrakci byly komponenty vzorku derivatizovány *n*-hexanem s obsahem 1% heptafluorbutanoylchloridu. Jejich heptafluorbutanoyl deriváty byly koncentrovány a rozpuštěny v ethyl-acetátu. Vzorky byly analyzovány GC-MS. Jako vnitřní standard byl vybrán 2,4,6-trimethylanilin; limit detekce 4-aminofenolu byl 6 ng (cit.<sup>4</sup>).

### Imunoanalýza

Ke stanovení 4-aminofenolu bylo využito schopnosti enzymu laktasy katalyzovat oxidaci 4-aminofenolu na 1,4-benzochinonimin. V bioenzymovém elektrodoovém systému byl nadbytek glukosy redukován glukosodehydrogenasou a měřen úbytek koncentrace kyslíku. Enzymová membrána byla umístěna na povrchu kyslíkové elektrody. Měření probíhalo v 1,2 ml průtokové cele. Doba analýzy byla 5 min. Limit detekce 4-aminofenolu byl 10 pg ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>16</sup>).

### Metody průtokové injekční analýzy

1. Byly analyzovány biologické vzorky, jako pracovní elektrolyt sloužil 50 mM fosfátový pufr pH (7,0). Elektrochemický detektor pracoval při 50 mV s<sup>-1</sup> s nepokrytou zlatou elektrodou a zlatou elektrodou modifikovanou *n*-alkanthiolem. Referenční elektroda byla Ag/AgCl (s nasyceným roztokem KCl). Potenciál se měřil od 0,4 do 1,20 V. Limit detekce 4-aminofenolu byl 1,0 mmol/l<sup>48</sup>).
2. Extrakt z tablet obsahujících paracetamol a 4-aminofenol byl vstříknut jako 0,5% roztok kyseliny octové do roztoku v kapiláře, který protékal rychlostí 0,35 ml min<sup>-1</sup> a reagoval s činidlem (nitroprusid sodný) za vzniku barevné látky, která byla detekována spektrofotometricky při 710 nm. Limit detekce 4-aminofenolu byl 3 ng ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>38</sup>).
3. K roztoku 4-aminofenolu byl přidán roztok 8-chinolinolu v 0,4 mol l<sup>-1</sup> NaOH a 0,004 mol l<sup>-1</sup> KIO<sub>4</sub> bylo použito jako oxidační činidlo. Průtoková rychlost 3,5 ml min<sup>-1</sup>, detekce při 244 nm. Limit detekce 4-aminofenolu 100 μg ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>20</sup>).
4. 4-Aminofenol procházel kapilárou dlouhou 1 m, která byla chlazená ledem na 0 °C. V reakční kapiláře dlouhé 4 m probíhala reakce mezi 4-aminofenolem a derivatizačním činidlem 0,1 mol l<sup>-1</sup> *o*-kresol v 3,5 mol l<sup>-1</sup> NaOH za tvorby barevného derivátu, který byl monitorován při 620 nm (cit.<sup>45</sup>).

### HPCE

Separace 4-aminofenolu v analgetické směsi probíhala v analyzátoru HPCE, který byl nastaven na 280 nm. Použitá kapilára byla 65,5 cm dlouhá, s 50 μm vrstvou nataveného SiO<sub>2</sub>. Vložené napětí bylo 20 ± kV. Pufr, který protékal kapilárou, měl složení 40 mmol l<sup>-1</sup> borax / 10 mmol l<sup>-1</sup> β-cyclodextrin / 10% ethanol (pH 7,0 pomocí H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Limit detekce 4-aminofenolu byl 3,94 μg ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>46</sup>).

### Diferenciální scanovací kalorimetrie

Tuhé vzorky paracetamolu znečištěné 4-aminofenolem byly zataveny v kapsli a ta byla zahřívána rychlostí 1 °C min<sup>-1</sup>. Stopy 4-aminofenolu snižují bod tání ze 169 °C na 138 °C a na záznamu byl patrný pík eutektické směsi se složením paracetamol / 4-aminofenol 0,6/0,4 (cit.<sup>12</sup>).

### Spektrofotometrické metody

1. Vzorky moči s obsahem 4-aminofenolu reagovaly s resorcinolem v přítomnosti manganatých iontů za vzniku indofenolového zbarvení. Měření probíhalo při 550 nm. Limit detekce 4-aminofenolu byl 0,9 μg ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>41</sup>).
2. Biologické vzorky s obsahem 4-aminofenolu byly analyzovány s použitím derivatizace *o*-kresolem v přítomnosti jodistanu jako katalyzátoru. Vzniklý indofenolový derivát je zbarven modře. Absorpční maximum se posunulo k vlnové délce 620 nm. Limit detekce 4-aminofenolu byl 0,2 μg ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>9</sup>).
3. Roztok 4-aminofenolu s 10% alkoholickým roztokem 1-naftolu a 5 ml 30% NaOH byl zahříván 1 min při 90 °C. Poté byla měřena absorbance při 590 nm (cit.<sup>21</sup>).
4. 4-Aminofenol byl oxidován 0,1 mol l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> za vzniku fialově zbarveného oxidačního produktu. Ten byl kvantitativně extrahován do isobutylalkoholu a jeho absorbance byla měřena při 550 nm (cit.<sup>2</sup>).
5. 4-Aminofenol v biologickém materiálu byl oxidován bromnanem sodným. Jeho oxidační produkt reagoval s fenolem za tvorby indofenolového barevného produktu jehož absorpční maximum bylo 620 nm (cit.<sup>7</sup>).
6. 4-Aminofenol v tabletách s obsahem paracetamolu byl analyzován po barevné reakci se směsí 5 ml NaOCl a 0,1 mol l<sup>-1</sup> HCl pro úpravu pH na 3,4 a poté byl přidán 4% NaAsO<sub>2</sub>. Vzniklý *N*-chlor-1,4-benzochinonimin reagoval s fenolem v přítomnosti borátového pufru pH 9,9 za vzniku stabilního modrého produktu indofenolového typu. Absorbance byla měřena při 625 nm (cit.<sup>26</sup>).
7. 4-Aminofenol byl přímo oxidován kyanoželezitanem draselným v roztoku NaOH při 0 °C a po přidání fenolu vznikl barevný produkt *N*-(4-hydroxyfenyl)-1,4-benzochinonimin a ten byl stanovován při 635 nm (cit.<sup>28</sup>).
8. 4-Aminofenol reagoval s 2,4-dinitrofenylhydrazinem v přítomnosti chloraminu T za vzniku barevného 2,4-dinitrofenylhydrazon-1,4-benzochinoniminu. Po extrakci do chloroformu byl detekován při 570 nm (cit.<sup>33</sup>).
9. 4-Aminofenol ve směsi fenolů byl analyzován s využitím peroxidasy z arašídů a její katalytické aktivity v přítomnosti 4-aminofenolu. V prostředí peroxidu vodíku a po přidání *o*-dianisidinu nebo 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu byly vzorky měřeny při absorpčních maximech 440 nm, 375 nm a 465 nm. Hladiny fenolů byly hodnoceny ze spádu kinetické křivky v závislosti na čase. 4-Aminofenol byl zjištěn

v koncentracích 0,5 až 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (cit.<sup>32</sup>).

10. 4-Aminofenol byl analyzován s využitím jeho oxidačních přechodů a možnosti kopulační reakce s 2,5-dimethylfenolem, která byla katalyzována jodistanem sodným. Vzniklý indofenolový derivát byl měřen při 635 nm. Limit detekce 4-aminofenolu byl 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>1</sup>).
11. 4-Aminofenol reagoval za laboratorní teploty se sulfidem sodným v přítomnosti různých oxidačních činidel ( $\text{Ce}^{4+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ). Během deseti minut vznikl barevný produkt, který byl stabilní nejméně 3 h, měření probíhalo při 550 nm. Detekční limit 4-aminofenolu byl 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>13</sup>).
12. 4-Aminofenol byl analyzován vysoce citlivou fotometrickou metodou (thermal lensing). Reakcí s resorcinolem v alkalickém prostředí vznikl jeho derivát. Limit detekce 4-aminofenolu byl 0,1  $\text{mg ml}^{-1}$  (cit.<sup>43</sup>).

#### Gravimetrie

Paracetamolové konjugáty v moči byly extrahovány do etheru a hydrolyticky štěpeny za vyšší teploty a v kyselém prostředí; uvolněný 4-aminofenol byl hodnocen gravimetricky<sup>36</sup>.

#### Spektroelektrochemické metody

4-Aminofenol v roztoku byl kvantitativně stanoven cyklickou voltametrií. Spektroelektrochemická cela byla spojena s optickou částí spektrofotometru a dopadající paprsek byl rovnoběžný s pracující elektrodovou plochou. K trojelektrodovému systému (nasyčená kalomelová elektroda, Ag/AgCl referenční elektroda a platinová indikační elektroda) byl připojen potenciostat, na elektrody byl aplikován potenciálový skok  $+ 0,2 \pm 0,8$  V. Absorbance při 270 nm byla měřena v různých časech. Limit detekce 4-aminofenolu byl 0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>47</sup>).

### 3. Detekce 4-chloracetanilidu

#### Metoda TLC

1. Hladiny 4-chloracetanilidu v paracetamolu byly stanoveny tenkovrstvou chromatografií, jako mobilní fáze byla použita směs cyclohexan / aceton / diisobutylketon / methanol / voda (100:80:30:5:1), separace probíhala na skleněných deskách  $20 \times 20$  cm potažených bezvodým silikagelem v 0,25 mm vrstvě. Detekce UV lampou při 253–257 nm. Limit detekce 4-chloracetanilidu v paracetamolu byl 0,03 % (cit.<sup>34</sup>).
2. Hladiny 4-chloracetanilidu v paracetamolu byly stanoveny tenkovrstvou chromatografií, jako mobilní fáze byla použita směs chloroform / benzen / aceton (60:10:25), separace probíhala na silikagelových deskách. Limit detekce 4-chloracetanilidu v paracetamolu byl 0,001 % (cit.<sup>27</sup>).

### 4. Detekce oxidačních produktů 4-aminofenolu

#### Metody HPLC<sup>42</sup>

1. Vodné vzorky byly separovány na koloně Merckogel PGM, jako mobilní fáze sloužil 0,05  $\text{mol l}^{-1}$  fosfátový pufr (pH 6) popřípadě směs 0,05  $\text{mol l}^{-1}$  fosfátového pufru a 0,66  $\text{mol l}^{-1}$  borátového pufru (pH 6). Detekce probíhala při 280 nm.
2. Vodné vzorky byly separovány na koloně C18 s reverzní fází a jako mobilní fáze byl použit 0,01  $\text{mol l}^{-1}$  fosfátový pufr (pH 7). Detekce probíhala při 280 nm.
3. Hydrochinon byl analyzován po oxidaci na 1,4-benzochinon přes impregnovaný skleněný filtr manganistanem draselným. 1,4-Benzochinon byl dále sorbován na polystyrenovém kopolymeru a následně desorbován acetonitrilem. Analýza probíhala na koloně s reverzní fází s detekcí při 290 nm.
4. Vodné roztoky hydrochinonu byly analyzovány po extrakci hydrochinonu z modifikovaných celulosových filtrů 1% kyselinou octovou. Vzorky byly nasťikovány na kolonu s reverzní fází C18 a jako mobilní fáze byla použita 1% kyselina octová; detekce probíhala při 290 nm.

#### Metoda GC<sup>42</sup>

Vodné roztoky fenolů byly extrahovány do methylisobutylketonu a derivatizací byly připraveny jejich trimethylsilyl deriváty. Vzorky byly separovány na koloně Chromosorb W potažené 5% tris(2,4-dimethylfenyl)-fosfátem. Detekce plamenionizačním detektorem.

### 5. Detekce 4-acetamidofenyl-acetátu

#### Metody TLC

1. 4-Acetamidofenyl-acetát jako 2% substance v paracetamolu byl analyzován na deskách 0,25 mm silikagelu GF 254 nm a jako mobilní fáze byla použita směs chloroform / aceton / kyselina octová (80:18:2). Detekce UV lampou při vlnové délce 254 nm. Limit detekce 4-acetamidofenyl-acetátu byl 0,2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>21</sup>).
2. Vzorky získané po dvoutýdenním působení 1%  $\text{H}_2\text{O}$  při 50 °C na paracetamol s aspirinem byly nanášeny v objemech 20  $\mu\text{l}$  na silikagelovou desku. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform / ethanol / kyselina octová (88:10:2). Detekce parami jodu<sup>23</sup>.
3. 20  $\mu\text{l}$  ethanolického filtrátu z tablet paracetamolu bylo naneseno na 0,25 mm silikagelovou desku aktivovanou 1 h při 105 °C. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform / aceton / kyselina octová (80:18:2). 4-Acetamidofenyl-acetát se jevil jako žlutá skvrna pod UV lampou při vlnové délce 350 nm. Detekční limit 4-acetamidofenyl-acetátu byl 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>23</sup>).

### Metoda GC

Vzorky směsi aspirinu, paracetamolu a kofeinu byly analyzovány na hliníkové koloně 1,5 m dlouhé s náplní 5% Carbowax 20 M na Chromosorbu G 70/80. Teplota kolony byla 225 °C, plamenioionizační detektor a injektor byly temperovány na 275 °C. Průtokové rychlosti plynů byly: helium 60 ml min<sup>-1</sup>, vodík 65 ml min<sup>-1</sup> a vzduch 300 ml min<sup>-1</sup>. Množství 4-acetamidofenyl-acetátu bylo určeno porovnáním s výškou píku standardu 4-acetamidofenyl-acetátu<sup>23</sup>.

### 6. Závěr

Ze studií stability paracetamolu je patrný význam analytických hodnocení jeho rozkladných produktů. Hladiny 4-acetamidofenyl-acetátu a 4-chloracetanilidu v paracetamolu byly hodnoceny tenkovrstvou chromatografií<sup>21,23,27,34</sup>. Ke stanovení 4-acetamidofenyl-acetátu bylo také využito plynové chromatografie<sup>23</sup>. Při monitorování lékových hladin, hodnocení metabolitů paracetamolu v moči a separaci paracetamolu v analgetické směsi s obsahem 4-aminofenolu byla nejčastěji využívána metoda HPLC.

Podle lékopisů (EP, BP, USP, ČL)<sup>6,10,11,40</sup> se 4-aminofenol jako nečistota v substanci paracetamolu hodnotí barevnou reakcí s činidlem nitroprusidem sodným. Vzniklé modré zbarvení se porovnává s roztokem, který obsahuje limitní množství *p*-aminofenolu 0,005 %. Což odpovídá 25 µg 4-aminofenolu v 500 mg paracetamolu v 1 tabletě. Další metody už umožňují stanovení *p*-aminofenolu v paracetamolu. Pro rutinní analýzu a rychlé stanovení byly prezentovány vysoce citlivé a automatizované metody používající deprivatizaci a průtokovou injekční analýzu ke stanovení nižších množství tohoto produktu degradace. Průtoková injekční analýza ve srovnání s HPLC zvyšuje citlivost detekce a posunutím detekce k vyšším vlnovým délkám také specifitnost. Reakcí s derivatizačním činidlem se zabrání interferenci matrice absorbující v UV oblasti při stanovení stopového množství 4-aminofenolu. Dále byly prezentovány metody HPLC se spektrofotometrickou, elektrochemickou a fluorescenční detekcí. Srovnáním analytických dat získaných analýzou HPLC a HPCE byly zjištěny nižší detekční limity a rozlišení píků analyzovaných látek při použití HPLC než u HPCE. V této práci byly také prezentovány imunologické metody, GC a spektrofotometrické metody využívající UV detekci nebo reakci vedoucí k barevnému derivátu. Oblíbená podskupina derivatizačních metod používá různé indofenolové deriváty 4-aminofenolu. Některé vysoce citlivé fotometrické techniky s vysokou reprodukovatelností byly používány pro stanovení 4-aminofenolu jako nečistoty v přípravcích s obsahem paracetamolu a dosažené detekční limity byly pětikrát nižší než limity získané standardním postupem barevnou reakcí s nitroprusidem sodným.

*Práce byla vypracována za podpory výzkumného záměru MSM 111600001.*

### LITERATURA

1. Afshari J. T., Tsan-Zon Li: *Anal. Chim. Acta* 443,165 (2001).
2. Basu A. P.: *Indian J. Pharm.* 30, 280 (1968).
3. Beňo P. a kol.: *Stabilita liečiv a liekov*. Bratislava 2003.
4. Bloomfield M. S.: *Talanta* 58, 1301 (2002).
5. Brega A., Prandini P., Amaglio C., Pafumi E.: *J. Chromatogr., A* 535, 311 (1990).
6. *British Pharmacopoeia*, Vol. 1, 1. vyd., HMSO, London 1993.
7. Brodie B. B., Axelrod J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 94, 22 (1948).
8. Carmel G. W., Angelis J. (Warner-Lambert Pharmaceutical Co.): *U. S.* 2,998, 450 1961.
9. Criado A., Cárdenas S., Gallego M., Valcárcel M.: *Talanta* 53, 417 (2000).
10. *Český lékopis 2002*, 1. vyd. Grada, Praha 2002.
11. *European Pharmacopoeia*, 4. vyd., EPQM, Strasbourg 2002.
12. Fahrensarsang D., Kadejinda W., Sunthornpit A.: *Pharm. Sci. Technol.* 23 (2000).
13. Fardous A. M., AbdAllah M. A., Shammat S. M.: *Talanta* 44, 61 (1997).
14. Florey K. (ed.): *Analytical Profiles of Drug Substances* 3. Academic Press, New York, London 1974.
15. García A., Rupéres F. J., Marín A., de la Maza A., Barbas C.: *J. Chromatogr., B* (2002).
16. Ghindilis A. L., Makower A., Bauer C. G., Bier F. F., Scheller F. W.: *Anal. Chim. Acta* 304, 25 (1995).
17. Hahn J. H., Quinn J. F. (Monsanto Chemical Co.): *U. S.* 3,042,719 (Cl.260-562) 1962.
18. Hanyšová L., Kastner P., Klimeš J.: *Chem. Listy* 98, 152 (2004).
19. Hart S. J., Tontodonati R., Calder I. C.: *J. Chromatogr., B* 225, 387 (1981).
20. Hasan B. A., Khalaf K. D., Morales-Rubio A., de la Guardia M.: *J. Anal. Chem.* 354, 216 (1996).
21. Kalatzis E.: *J. Pharm. Sci.* 59, 193 (1970).
22. Koshy K. T., Lach J. L.: *J. Pharm. Sci.* 50, 113 (1961).
23. Koshy K. T., Troup A. E.: *J. Pharm. Sci.* 56, 1117 (1967).
24. Meyer J., Karst U.: *Chromatographia* 54, (2001).
25. Monser L., Darghouth F.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27, 851 (2002).
26. Murfin J. W.: *Analyst* 97, 670 (1972).
27. *National Formulary*, 13. vyd., str. 856. American Pharmaceutical Press, Washington 1970.
28. Ninomiya T.: *Yakugaku Zasshi* 85, 39 (1965).
29. Noble M., Clough G. F.: *Hepatol. Nutr.* 4, 58 (2001).
30. Reynolds J. (ed.): *Martindale 31., Royal Pharmaceutical Society*. London 1996.
31. Rodenas V., García M. S.: *Talanta* 52, 517 (2000).
32. Rumack B. H.: *Drug Intell. Clin. Pharm.* 19, 911

- (1985).
33. Sakurai H., Umeda M.: *Yakugaku Zasshi* 82, 1282 (1962).
  34. Savidge R. A., Wragg J. S.: *J. Pharm. Pharmacol.* 17, 60 (1965).
  35. Shao B. H., Xu X. Z., Yan J. W., Fu X. Y.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24, 241 (2001).
  36. Smith J. N., Williams R. J.: *Biochem. J.* 42, 538 (1948).
  37. Song H., Chen T. S.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 34 (2001).
  38. Tanada N., Kashimura S., Kageura M.: *J. Forensic Sci.* 44, 292 (1999).
  39. Thompson D. C., Perera K., London R.: *Drug Metab. Dospod.* 24, 866 (1996).
  40. United States Pharmacopoeia, 21. vyd., Rockville, U. S. Pharmacopoeial Convention, 2003.
  41. Van Bocxlaer J. F., Clauwaert K. M., Lambert W. E., De Leenheer A. P.: *Clin.Chem.* 43, 627 (1997).
  42. [www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc157.htm](http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc157.htm)
  43. [www.tls-msu.narod.ru/Conferences/SETAC-2001.htm](http://www.tls-msu.narod.ru/Conferences/SETAC-2001.htm)
  44. Yoshida R., Oikawa S., Ogawa Y., Miyakoshi Y.: *Mutat. Res.* 415, 139 (1998).
  45. Zhang W. H., Galal A., Rubinson J. F., Marawi I., Ridgway T. H., Lunsford S. K.: *Electrochim. Acta* 23, 3511 (1998).
  46. Zhang S. S., Liu H. X., Yuan Z. B.: *J. Chromatogr., B.* 705, 165 (1998).
  47. Zhang J., Yao S., Nie L., Wei W.: *J. Anal. Sci.* 16, 87 (2000).
  48. Zhiming L., Jinghong L., Shaojun D., Erkang W.: *Anal. Chem.* 68, 2432 (1996).

**L. Hanyšová, P. Kastner, and J. Klimeš**  
(*Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Degradation Products and Impurities of Paracetamol from Viewpoint of Analytical Detection**

A review on impurities and basic degradation products of paracetamol and their evaluation is presented. A wide variety of separation and non-separation methods are available for the purpose, such as derivatisation colorimetric, HPLC and FIA methods. The methods are compared with those used in pharmacopoeias.

## TECHNICKÝ SLOVNÍK NAUČNÝ



Projekt největšího výkladového slovníku z oblasti techniky za poslední půlstoletí se úspěšně uzavřel.

### OSMÝ - POSLEDNÍ - SVAZEK JIŽ VYŠEL

Celý Technický slovník naučný o celkovém rozsahu 330 AA zahrnuje ve svých 8 svazcích na celkem 3711 stránkách téměř 40 000 hesel, která jsou průběžně doplněna 2481 černobílými ilustracemi a 130 tabulkami.

V každé knize je 8 stran barevné přílohy s celkem 453 tematicky zaměřenými ilustracemi.

Vy, kteří jste si postupně kupovali jednotlivé svazky, si jistě koupíte i tento poslední. Vy, kteří jste zatím váhali - kupte celý technický slovník naučný najednou za ceny, které s rostoucími rozsahy jednotlivých svazků rostly:

- |                  |                  |
|------------------|------------------|
| 1. svazek 390 Kč | 5. svazek 410 Kč |
| 2. svazek 410 Kč | 6. svazek 410 Kč |
| 3. svazek 410 Kč | 7. svazek 490 Kč |
| 4. svazek 410 Kč | 8. svazek 550 Kč |

Při osobním odběru v redakci Encyklopedického domu a pro knihovny a školy sleva 10 %. Při nákupu celého díla obdržíte dárek z dílny našeho vydavatelství.

Informujte se na adrese: Encyklopedický dům, s.r.o., Prvního pluku 8-10, 186 30 Praha 8, tel. 224 918 831, fax 224 920 576 a na stránkách [www.encyklopedie.cz](http://www.encyklopedie.cz)



## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### ÚPRAVA OPTOSONDY LUMINISCENČNÉHO SPEKTROMETRA PERKIN-ELMER LS 55 NA MERANIE FLUORESCENČNÝCH SPEKTIER KOŽNÝCH POVRCHOV

MICHAL MOKRÝ<sup>a</sup>, JAROSLAV KUŠNÍR<sup>b</sup>,  
PETER GÁL<sup>a</sup>, KATARÍNA DUBAYOVÁ<sup>b</sup>,  
MIROSLAV SYNEK<sup>b</sup> a JÁN SABO<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav lekárskej biofyziky, <sup>b</sup>Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, SR  
sabo.jan@upjs.sk, mmokry@kosice.upjs.sk

Došlo 23.11.04, prepracované 12.5.05, prijaté 31.5.05.

Kľúčové slová: luminiscenčný spektrometer, synchronne fluorescenčné spektrum, hojenie rán

#### Úvod

Vývoj optických vlákien umožnil použiť fluorescenčnú spektroskopiu na monitorovanie fluorescenčných vlastností povrchov tkanív<sup>1</sup>.

Medzi najbežnejšie fluorofóry nachádzajúce sa v živých systémoch, a teda aj v povrchových vrstvách pokožky, patria: tryptofán, tyrozín, kolagén, elastín, FAD, NADH, fosfolipidy, lipofuscín, vitamíny B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, A, D, K, a mnoho iných<sup>2,3</sup> (Tab. I). Biologické procesy, akými sú nádorový rast, alebo hojenie rany sú nesmierne dynamické, počas nich sa kvalitatívne aj kvantitatívne mení zostava fluorofórov<sup>4</sup>. Taktiež sa menia optické vlastnosti prostredia, v ktorom sa nachádzajú, čo má zákonite vplyv na výsledné fluorescenčné spektrá<sup>2</sup>. Tieto javy sú dostatočným markerom patologických procesov.

V súčasnosti je možné pomocou rôznych typov fluorescenčných spektier diagnostikovať prekancerózne stavy niektorých orgánov: krčka maternice, hrubého čreva, mliečnej žľazy alebo bronchov<sup>5-7</sup>. Táto diagnostika je často presnejšia a citlivejšia ako zaužívané štandardné metódy (endoskopia, cytodiagnostické metódy a iné), pričom záťaž pacienta vzhľadom na nízky stupeň invazivnosti a rýchlosť merania je minimálna<sup>8</sup>. Fluorescenčné metódy často používajú ako excitačné svetlo laserové žiarenie len jednej vlnovej

dĺžky, pričom v emisnom spektre sa sústreďujú len na jednu vybranú vlnovú dĺžku. Takáto metóda síce dokáže ľahko určiť hranice zdravého a patologicky zmeneného tkaniva, avšak má len obmedzené použitie pri bližšom určení patologického stavu (napr. diagnostikovanie konkrétneho podtypu nádoru, a iné). Tento problém môžu vyriešiť metódy, ktoré by analyzovali celé spektrum emisných a excitačných vlnových dĺžok.

Vývoj rýchlej, exaktnej a minimálne invazívnej metódy, nezávislej od skúseností hodnotiaceho lekára, schopnej odhaliť už prvé patologické náznaky v tkanive ešte predtým, ako nastanú viditeľné zmeny zaznamenateľné ľudským okom, by bol prínosom najmä pre rizikových pacientov, medzi ktorých patria pacienti s diabetes mellitus, ikterickí a onkologickí pacienti, stavy spojené s malnutríciou, imunokompromitovaní jedinci a mnoho iných<sup>9-13</sup>.

Cieľom práce bolo technicky upraviť a doriešiť zakončenia komerčného optického kábla luminiscenčného spektrometra LS 55 (Perkin-Elmer), vyvinúť stojan a držiak na sondu, ktorý by umožnil presné nastavenie

Tabuľka I  
Prírodné fluorofóry v živých systémoch a ich fluorescenčné parametre<sup>2</sup>

Endogénne fluorofóry	Excitačné maximum [nm]	Emisné maximum [nm]
Tryptofán	280	350
Tyrozín	275	300
Fenylalanín	260	280
Kolagén	325	400, 405
Elastín	290, 325	340, 400
FAD	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
Vitámín A	327	510
Vitámín K	335	480
Vitámín D	390	480
Pyridoxín	332, 340	400
Pyridoxamín	335	400
Pyridoxal	330	385
Pyridoxal 5'-fosfát	330	400
Vitámín B <sub>12</sub>	275	305
Fosfolipidy	436	540, 560
Lipofuscín	340–395	540, 430–460
Ceroid	340–395	430–460, 540
Porfyríny	400–450	630, 690

sondy kolmo nad meraný povrch, v definovanej vzdialenosti od povrchu, čo má umožniť reprodukovateľnosť meraní rôznych druhov fluorescenčných spektier kožných povrchov.

## Experimentálna časť

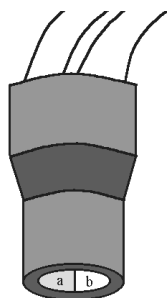
### Prístroje a zariadenia

Luminiscenčný spektrometer LS 55 (Perkin-Elmer) vybavený optickým káblom na externé meranie s pripojeným počítačom na spracovanie dát s programom FLWinLab, ktorý je dodávaný výrobcom prístroja.

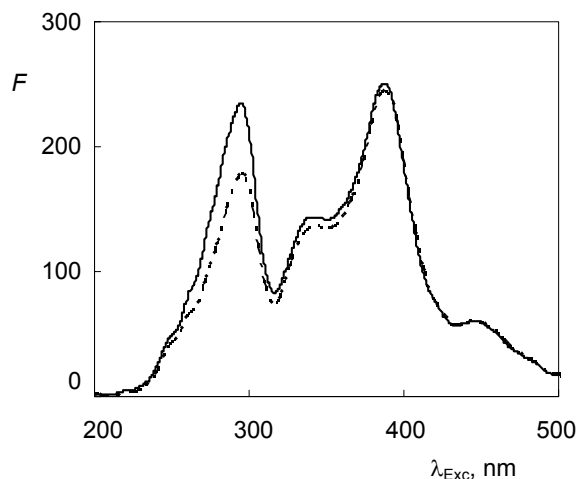
Spektrá pokožky boli snímané u zdravých dobrovoľníkov, spektrá rán boli snímané u experimentálnych zvierat (potkan).

### Výsledky a diskusia

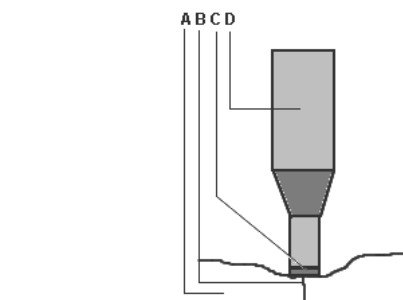
Prístroj bol vybavený dvojitém svetlovodným káblom, z ktorého jedna polovica je určená na privod excitujú-



Obr. 1. Schéma spodnej časti svetlovodného kábla; a) zakončenie vlákna privádzajúceho excitáciu svetlo k meranému povrchu, b) zakončenie vlákna odvádzajúceho emitované svetlo



Obr. 2. Synchronné fluorescenčné spektrum tej istej kožnej rany pre  $\Delta\lambda = 60$  nm, pri rôznej vzdialenosti zakončenia svetlovodných káblov od rany



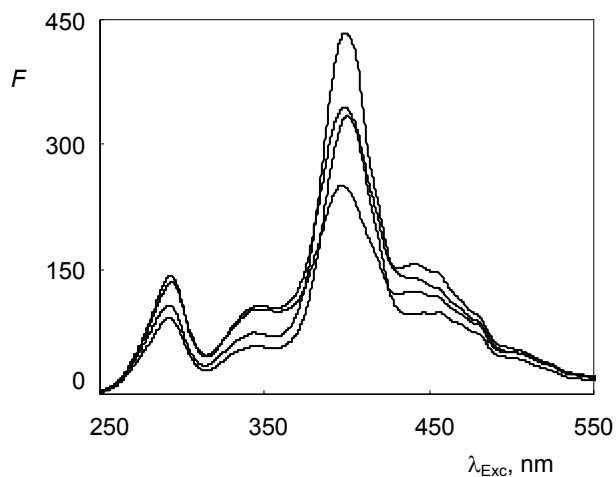
Obr. 3. Schéma sondy so sklenenou koncovkou; A – meraná pokožka, B – kožná rana, C – sklenená koncovka z optického skla, D – telo sondy. Podkožie je tlakom sondy deformované a ischemizované, čo má negatívny vplyv na reprodukovateľnosť takto nameraných spektier

ceho svetla z prístroja a druhá na zachytávanie svetla emitovaného povrchom. Konce oboch káblov sú umiestnené v jednoduchšej koncovke tesne vedľa seba (Obr. 1).

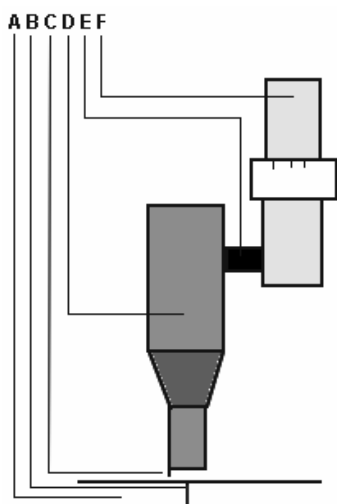
Keďže intenzita signálu je aj funkciou vzdialenosti zakončenia svetlovodných vlákien od meraného objektu<sup>2</sup> (Obr. 2), pre reprodukovateľnosť merania bolo nevyhnutné zabezpečiť jej presné nastavenie.

Problém sme spočiatku riešili pomocou upravenej koncovky, kde nastavenie vzdialenosti zabezpečovalo 1 mm hrubé optické sklo oddeľujúce povrch rany od zakončenia svetlovodných vlákien (Obr. 3).

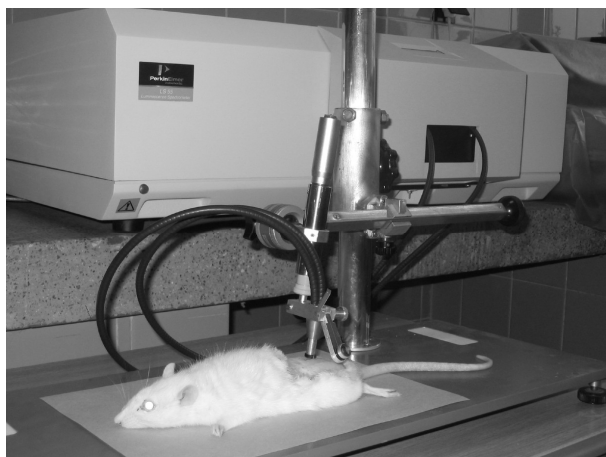
Ukázalo sa, že charakter a intenzita nameraných spektier sa menia v závislosti od tlaku a času, ktorým pôsobila koncovka na povrch (Obr. 4). Tieto rozdiely sú pravdepodobne spôsobené okrem iného hlavne zmenou intenzity prekrvenia rany. Pri meniacej sa intenzite prekrvenia sa



Obr. 4. Synchronné fluorescenčné spektrá pre  $\Delta\lambda = 30$  nm tej istej kožnej rany merané pomocou sondy so sklenenou koncovkou; Keďže nie je možné zabezpečiť konštantný tlak sondy na pokožku spektrá nie sú reprodukovateľné



Obr. 5. Schéma sondy s koncovkou na bezdotykové meranie; A – meraná pokožka, B – kožná rana, C – koncovka s 0,7 mm dlhým oceľovým hrotom, D – telo sondy, E – držiak sondy, F – mikroskop. Podkožie nie je deformované ani ischemizované, vďaka čomu sú namerané spektrá reprodukovateľné



Obr. 6. Luminiscenčný spektrometer spolu s prídavnými zariadeniami počas merania

mení aj množstvo hemoglobínu v rôznych vrstvách rany a hemoglobín je zodpovedný za znižovanie intenzity signálu<sup>6</sup>.

Kvôli týmto problémom sme zvolili bezdotykové nastavenie vzdialenosti pomocou ďalšej úpravy koncovky, ktorú sme vybavili 0,7 mm dlhým kontaktným oceľovým hrotom (Obr. 5). Na zabezpečenie presnej vzdialenosti sme skonštruovali stojan s mikroskopom umožňujúci pohyb sondy v troch rovinách. Takto sme boli schopní nastaviť presnú vzdialenosť sondy od rany. Táto vzdialenosť sa kontrolovala vizuálne pomocou lupy (Obr. 6).

Dáta získané zo spektrofluorimetra boli spracované v programe FLWinLab.

Vyhodnocovali sme synchronne fluorescenčné spek-

trá pre  $\Delta\lambda_1 = 30$  nm,  $\Delta\lambda_2 = 60$  nm a  $\Delta\lambda_3 = 90$  nm, pre tento typ spektier a parametre vlnových dĺžok sme sa rozhodli preto, lebo nám umožnili zachytiť maximum relevantných fluorofórov pri relatívne malom počte meraní. Ramanujam<sup>2</sup> uvádza, že väčšina relevantných fluorofórov, ktoré sa nachádzajú v živých systémoch, má rozdiel excitačného a emisného maxima práve v tomto intervale.

Analýza nameraných spektier a ich interpretácia nie je predmetom tejto práce.

## Záver

Po technickej úprave optosondy fluorescenčného spektrofotometra je možné reprodukovateľne merať fluorescenčné spektrá z povrchu kožnej rany u potkanov, povrchu pokožky a sliznic človeka. Meranie fluorescenčných spektier je neinvazívna, rýchla a objektívna diagnostická metóda na posúdenie normálneho a patologického stavu hojenia rán. V budúcnosti bude potrebné vyriešiť problémy spojené s nízkou intenzitou signálu a vysokou variabilitou kožných rán, pravdepodobne použitím vhodných fluorescenčných markerov na monitorovanie meniacich sa parametrov v hojacej sa rane.

## LITERATÚRA

- Gillenwater A., Jacob R., Ganeshappa R., Kemp B., El-Naggar A. K., Palmer J. L., Clayman G., Mitchell M. F., Richards-Kortum R.: Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 124, 1251 (1998).
- Ramanujam N.: *Fluorescence Spectroscopy in Vivo, Encyclopedia of Analytical Biochemistry*. John Wiley, Chichester 2000.
- Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E.: Ann. Rev. Phys. Chem. 1999, 555.
- Vidinský B., Gál P., Lakyová L., Toporcer T., Špaková T., Rybár D., Kilík R., Sabo J., Longauer F.: *Lojda Symposium on Progress in Basic, Applied and Diagnostic Histochemistry, Košice 28.6.–1.7. 2004*, (Kluchová D., ed.) str. 9.
- Palmer G. M., Keely P. J., Breslin T. M., Ramanujam N.: Photochem. Photobiol. 78, 462 (2003).
- Ramanujam N.: Neoplasia 2, 89 (2000).
- Sokolov K., Follen M., Richards-Kortum R.: Curr. Opin. Chem. Biol. 6, 651 (2002).
- Mitchell M. F., Cantor S. B., Ramanujam N., Tortolero-Luna G., Richards-Kortum R.: Obstet. Gynecol. 93, 462 (1999).
- Armstrong C. P., Dixon J. M., Duffy S. W., Elton R. A., Davies G. C.: Br. J. Surg. 71, 267 (1984).
- DeGraaf P. W., Zwaveling A.: J. Surg. Oncol. 24, 32 (1982).
- Mousley M.: Nurs. Times. 99, 73 (2003).
- Mowat A., Baum J.: N. Engl. J. Med. 284, 621 (1971).
- Mullen J. L., Gertner M. H., Buzby G. P., Goodhart G. L., Rosato E. F.: Arch. Surg. 114, 121 (1979).

**M. Mokřý<sup>a</sup>, J. Kušnír<sup>b</sup>, P. Gál<sup>a</sup>, K. Dubayová<sup>b</sup>, M. Synek<sup>b</sup>, and J. Sabo<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Medical Biophysics, <sup>b</sup>Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Pavol Jozef Šafárik University, Košice, Slovakia*): **Modification of the Optical Probe of the Perkin-Elmer LS 55 Luminiscent Spectrometer for Measurement of Fluorescence Spectra of Skin Surface**

One end of the double cable in commercial instruments is installed in the cuvette space of the instrument and the other one is free. As the optical cables do not include either optical components or an optimal fixation mechanism for the distance adjustment, the measurements using those accessories do not give reproducible results. Our modification including addition of other components to the cable terminal enables the instrument to monitor biological processes on skin surface.

## STANOVENÍ JODU V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU METODOU HPLC S ELEKTROCHEMICKÝM DETEKTOREM

ALENA HEJTMÁNKOVÁ<sup>a</sup>, MARIE VEJDOVÁ<sup>b</sup>  
a EVA TRNKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Katedra chemie, Česká zemědělská univerzita, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, <sup>b</sup> MILCOM a.s. – Výzkumný ústav mlékárenský, Ke Dvoru 12, 160 00 Praha 6  
Hejtmank@af.czu.cz

Došlo 3.8.04, přepracováno 29.4.05, přijato 31.5.05.

Klíčová slova: jod, HPLC, elektrochemický detektor, biologický materiál, mineralizace

### Úvod

Problematika stanovení jodu v biologickém materiálu je aktuální již od druhé poloviny minulého století, kdy začaly být řešeny problémy jodového deficitu zaváděním jodované soli do potravního řetězce. Průzkumy, které provedl Endokrinologický ústav v Praze začátkem 90. let 20. století však ukázaly, že až 50 % obyvatel ČR trpí různě závažným nedostatkem jodu v důsledku klesající spotřeby jodované soli<sup>1</sup>. V této souvislosti se do popředí opět dostává problematika stanovení tohoto důležitého mikroelementu. V České republice je ke stanovení jodu nejčastěji používána spektrofotometrická metoda<sup>2</sup> založená na Sandellových-Kolthoffových reakcích<sup>3</sup> po předchozí alkalické mineralizaci vzorku, optimalizované podle Fiedlerové<sup>4</sup>. Sandellovy-Kolthoffovy reakce využívá ke stanovení jodu v potravinách po modifikované kyselé mineralizaci vzorku<sup>5,6</sup> i Rudolfová<sup>7,8</sup>.

V roce 2001 Česká zemědělská a potravinářská inspekce (ČZPI) se sídlem v Brně úspěšně uspořádala mezilaboratorní validaci metody stanovení jodu v potravinách podle Sandella-Kolthoffa pro čtyři druhy poživatin<sup>9</sup>. Těto validace se účastnily i dvě laboratoře, jejichž výsledky byly vyloučeny ze souboru dat pro mezilaboratorní validaci, protože byly získány metodou principiálně odlišnou od validované. Přesto výsledky stanovení poskytnuté těmito metodami jsou v dobré shodě s výsledky validované metody.

Jednou z těchto metod je stanovení jodu v biologickém materiálu metodou iontově párové vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED), která byla zavedena a ověřena ve Společné laboratoři České zemědělské univerzity a Výzkumného ústavu mlékárenského (ČZU-VÚM) na Fakultě

agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze. Testovaná metoda vychází z prozatímní technické normy mezinárodní mlékařské federace IDF-Standard 167:1994, jejíž předmětem je stanovení jodu v čerstvém mléce nebo v sušeném mléce po rekonstituci<sup>10</sup>. Po odstranění nerozpustných a vysokomolekulárních částic centrifugací a následně filtrací přes membránový filtr se vzorek mléka přímo dávkuje do kapalinového chromatografu. Vlastní stanovení je prováděno na koloně s reverzní fází Partisphere C-18, 5 μm, 110 × 4,7 mm nebo jejím ekvivalentem s mobilní fází – vodný roztok 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> obsahující 1,0 mM hexadecyltrimethylamonium-chlorid/acetonitril (68:32 v/v, pH 6,8; průtok mobilní fáze 2 ml min<sup>-1</sup>) – se zařazeným elektrochemickým detektorem (DC nebo pulsní amperometrický režim, pracovní elektroda Ag v rozsahu napětí 0–50 mV, referenční elektroda Ag/AgCl).

Kromě iontově párové HPLC lze z metod kapalinové chromatografie ke stanovení jodu v biologickém materiálu využít i iontově výměnnou HPLC s elektrochemickou<sup>11,12</sup> nebo spektrofotometrickou<sup>13,14</sup> detekcí. Iontově výměnnou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí ke stanovení jodu v potravinách obecně popsali Kuwahira a Asai<sup>11</sup>. Před vlastním stanovením byl každý vzorek mineralizován přidávkou 4 M hydroxidu draselného a 25% dusičnanu draselného a spalován v muflové peci nejdříve při teplotě 100 °C a potom při teplotě 550 °C po dobu celkem 5 h. Mineralizát byl rozpuštěn v destilované vodě, rozpouštění bylo podpořeno umístěním zkumavky do ultrazvukové lázně. Vlastní stanovení bylo provedeno na koloně Shodex IC-524A (mobilní fáze: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> obsahující 5 mM ethylendiamin, průtok mobilní fáze 1,5 ml min<sup>-1</sup>) se zařazeným elektrochemickým detektorem (pracovní elektroda Ag, vloženo napětí 60 mV, referenční elektroda Ag/AgCl).

Ve srovnání s validovanou metodou stanovení jodu podle Sandella-Kolthoffa při chromatografickém stanovení odpadá jodidy katalyzovaná reakce mezi arsenitanovými a ceričitými ionty, která vyžaduje vedle naprosto přesného dodržení reakčních podmínek i dokonale čisté sklo. K vlastní analýze se používá přímo naředěný mineralizát. Právě nedodržení reakčních podmínek v Sandellových-Kolthoffových reakcích je pravděpodobně příčinou poměrně častého neúspěchu při stanovení jodu validovanou metodou.

### Experimentální část

#### Materiál a metody

Použité chemikálie (KOH, ZnSO<sub>4</sub>, KClO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O) byly čistoty p.a. (Lachema, Brno), KI čistoty p.a., CH<sub>3</sub>CN čistoty gradient grade pro chromatografii LiChrosolv<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt), CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl (25% vodný roztok) (Sigma-Aldrich). Pro přípravu roztoků a mytí nádobí byla použita redestilovaná a demineralizovaná voda.

Vzorky biologického materiálu (referenční materiál, čerstvé mléko odebrané přímo na farmách, mléčné výrobky, maso a masné výrobky zakoupené v tržní síti) pro stanovení jodu byly podrobeny alkalickému tavení za přítomnosti KOH, ZnSO<sub>4</sub> a KClO<sub>3</sub> podle postupu Fiedlerové<sup>4</sup>. Vlastní stanovení jodu bylo prováděno na stavebnicovém kapalinovém chromatografu firmy Waters (vysokotlaké čerpadlo Waters 616, automatický dávkovač Waters 717) na koloně Nova-Pak C-18, 4 μm, 60 Å, 150 × 3,9 mm, při teplotě 30 °C. Mobilní fázi tvořil vodný roztok 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> obsahující 1,0 mM hexadecyltrimethylamoniumchlorid/acetonitril (68:32 v/v, pH 6,8; průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>). Detekce byla prováděna pulsním elektrochemickým detektorem Waters 464 v DC režimu (na elektrody je vloženo konstantní stejnosměrné napětí 5 mV a měří se výsledný proud v závislosti na čase) s pracovní elektrodou Ag a referenční elektrodou Ag/AgCl).

## Výsledky a diskuse

Pro ověření správnosti popisované metody byly použity certifikované referenční materiály: sušené odstředěné mléko BCR 063R s certifikovaným obsahem jodu 0,81 ± 0,05 μg g<sup>-1</sup> sušiny a hovězí játra BCR 185 s indikativní hodnotou jodu 105 ng g<sup>-1</sup> sušiny. Výrobce obou referenčních materiálů je Community Bureau of Reference, Belgie. Výsledky experimentálního stanovení jodu v certifikovaných referenčních materiálech metodou HPLC jsou uvedeny v tabulce I.

V roce 2001 proběhla pod vedením ČZPI v Brně validace stanovení jodu v potravinách podle Sandella-Kolthoffa. Na obsah jodu byly analyzovány multivitaminový nápoj v prášku (vzorek A), instantní černý čaj (vzorek B), instantní směs pro ochucení mléka (vzorek C) a bylinková sůl obohacená jodem (vzorek D). Všechny vzorky byly souběžně analyzovány i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí, ale

výsledky nebyly zahrnuty do souboru dat pro mezilaboratorní validaci testované metody, protože byly získány principiálně odlišnou metodou. Validace metody se účastnilo jen velmi málo laboratoří (8), což ukazuje na obtížnost validovaného stanovení, a proto z hlediska matematické statistiky není soubor primárních dat dostatečně reprezentativní. Přesto lze na základě porovnání výsledků analýzy obsahu jodu ve vzorcích A–D metodou HPLC s elektrochemickou detekcí s výsledkem statistického zpracování dat, získaných při mezilaboratorní validaci metody podle Sandella-Kolthoffa (viz Tab. II), chromatografické stanovení jodu s elektrochemickou detekcí považovat za vyhovující metodu pro stanovení jodu. Výsledky analýzy HPLC vzorků C a D se plně shodují s výsledky validované metody a analýzu HPLC vzorků A a B lze vzhledem k velkému rozpětí výsledků validované metody a malému počtu analýz rovněž považovat za uspokojivou. Vzhledem k výše uvedeným výhodám lze iontově párovou vysokoúčinnou chromatografií s elektrochemickou detekcí navr-

Tabulka I  
Stanovení jodu v referenčním materiálu

Parametr	Hodnota	
	BCR 063	BCR 185
Počet analýz	15	10
Jednotky	μg g <sup>-1</sup>	ng g <sup>-1</sup>
Certifikovaná hodnota či indikativní* hodnota	0,81	105*
Nejistota	0,05	–
Rozsah experimentálních hodnot	0,761–0,845	93–107
Průměr	0,814	101
Relativní směrodatná odchylka, %	4,49	8,74

Tabulka II  
Výsledky mezilaboratorní validace metody stanovení jodu podle Sandella-Kolthoffa

Statistické parametry	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Vzorek D
Počet laboratoří zahrnutých do výpočtu	6	8	7	6
Počet odlehlých laboratoří	2	0	1	2
Průměr, mg kg <sup>-1</sup>	41,33	27,77	48,02	9,75
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, mg kg <sup>-1</sup>	0,807	1,423	1,019	0,638
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, %	1,95	5,12	2,12	6,55
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, mg kg <sup>-1</sup>	2,667	4,576	4,976	1,610
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, %	6,45	16,48	10,36	16,50
Rozsah, mg kg <sup>-1</sup>	37,60–45,51	21,47–37,49	41,35–55,10	8,15–12,22
Průměr stanovení metodou HPLC, mg kg <sup>-1</sup>	47,66	19,67	51,66	10,30
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, mg kg <sup>-1</sup>	0,07	0,11	0,21	1,62
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, %	0,14	0,56	0,41	15,73

Tabulka III  
Obsah jodu ve vybraných potravinách živočišného původu

Výrobek	Obsah jodu <sup>a</sup> [ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ]	Průměr [ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ]	$S_R$ <sup>b</sup> [%]
Mléko čerstvé (7 farem ČR)	53 – 605	242	11,0
Trojské mléko	117 – 229	176	9,4
Jogurt	177 – 341	266	9,3
Měkký tvaroh	338 – 443	403	4,5
Tvrký tvaroh	390 – 891	576	12,3
Tavený sýr Maratonec	133 – 282	204	17,3
Sýr eidamského typu Želetavské plátky	284 – 488	391	11,8
Balkánský sýr	173 – 271	202	5,7
Vepřová kýta	105 – 171	130	12,1
Vepřová plec	80 – 153	106	12,0
Vepřová játra	107 – 182	158	17,9
Vepřové srdce	99 – 169	132	13,2
Vepřová ledvina	82 – 206	138	16,2
Hovězí kýta	69 – 160	112	17,5
Hovězí plec	65 – 170	112	11,9
Hovězí játra	50 – 182	114	13,1
Kuřecí prsa	< MD	< MD	–
Kuřecí srdce	163 – 245	191	15,2
Kuřecí játra	62 – 265	144	13,2
Aljašská treska	124 – 243	193	4,7
File	608 – 725	656	9,4
Pstruh	408 – 531	479	13,3
Kapr	230 – 358	302	13,6
Losos libový	320 – 500	427	14,1
Losos tučný	657 – 819	719	12,0
Lososová paštika	193 – 318	272	16,3
Rybičky v konzervě – Jadran	282 – 363	320	12,7
Špekáček	64 – 71	68	5,5
Šunka drůbeží	437 – 464	448	3,2
Salám Vysočina	52 – 58	55	6,9
Salám šunkový	53 – 69	59	14,6

<sup>a</sup> Mez detekce (MD) = 54  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ; <sup>b</sup>  $S_R$  – relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti

nout jako metodu alternativní ke klasickému stanovení jodu s využitím Sandellovy-Kolthoffovy reakce.

Mez detekce byla vyhodnocena z kalibrační závislosti sestavené v rozsahu 1–105 ng jodu v 1 ml kalibračního roztoku standardním statistickým postupem v programu Excel<sup>15</sup>. Rovnice regresní přímky závislosti odezvy detektoru  $D$  [mV s] na koncentraci jodu v roztoku [ $\text{ng ml}^{-1}$ ] má tvar  $D = 12541c$  a koeficient determinace  $R^2 = 0,9965$ .

Mez detekce je 4,55 ng jodu v 1 ml mineralizátu, lineární dynamický rozsah je 0–250  $\text{ng ml}^{-1}$ .

Ověřenou metodou iontově párové HPLC s elektrochemickou detekcí byly v průběhu let 2000–2003 opakovaně stanoveny obsahy jodu ve vybraných vzorcích masa, mléka a masných a mléčných výrobců. Jednotlivé vzorky byly analyzovány ve třech paralelních opakováních s průměrnou relativní směrodatnou odchylkou 11,7 %. Rozmezí stanovených hladin jodu v analyzovaných vzorcích potravin udává tabulka III.

## Závěr

Správnost stanovení jodu v biologickém materiálu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí po alkalické mineralizaci vzorku byla ověřena analýzou referenčních materiálů a dobrou shodou výsledků stanovení jodu ve čtyřech vzorcích poživatin testovanou metodou. Paralelní výsledky byly získány v rámci mezilaboratorní validace metody stanovení jodu v potravinách podle Sandella-Kolthoffa. Metoda je vhodná pro mineralizáty s obsahem jodu nejméně 4,55 ng v 1 ml mineralizátu. Metodou HPLC-ED byl stanoven obsah jodu v různých potravinách živočišného původu.

*Autoři děkují Grantové agentuře MŠMT za finanční podporu (výzkumné záměry MSM 4121 00003 a MSM 6046070901) při řešení uvedené problematiky.*

## LITERATURA

1. Řehůřková I., Ruprich J., Borkovcová I., Müllerová I.: *Mikroelementy '98: Sborník přednášek XXXII. Semináře o metodice stanovení a významu stopových prvků v biologickém materiálu, Řež u Prahy 2.–4.9. 1998*, (Helán J., ed.) str. 95. 2 THETA, Český Těšín 1998.
2. Bednář J., Röhling S., Vohnout S.: *Česk. Farm.* 56, 1426 (1964).
3. Sandell E. B., Kolthoff I. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 56, 1426 (1934).
4. Fiedlerová V.: *Czech J. Food Sci.* 16, 163 (1998).
5. Tušl J.: *Chem. Listy* 70, 533 (1976).
6. Wiechen A., Kock B.: *Fresenius Z. Anal. Chem.* 319, 569 (1984).
7. Rudolfová J., Čurda L., Koplík R.: *Chem. Listy* 95, 642 (2001).
8. Rudolfová J., Čurda L., Koplík R.: *Mikroelementy 2000: Sborník přednášek XXXIV. Semináře o metodice*

*stanovení a významu stopových prvků v biologickém materiálu, Zámek Liblice 5.–7.9. 2000*, (Helán J., ed.) str. 73. 2 THETA, Český Těšín 2000.

9. Zpráva z mezilaboratorní validace metody stanovení jodu v potravinách. Krajský inspektorát ČZPI v Brně, Brno 2001.
10. IDF Standard 167:1994 – Milk and dried milk–determination of iodide content – high-performance liquid chromatographic method. /www.fil-idf.org/
11. Kuwahira H., Asai, Y.: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 35, 253 (1994).
12. Chadha R. K., Lawrence J. F.: *J. Chromatogr.* 518, 268 (1990).
13. Hurst W. J., Snyder K. P., Martin R. A. Jr.: *J. Liq. Chromatogr.* 6, 2067 (1983).
14. Schwehr K. A., Santschi P. H.: *Anal. Chim. Acta* 482, 59 (2003).
15. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Plus, Praha 1994.

**A. Hejtmánková<sup>a</sup>, M. Vejdová<sup>b</sup>, and E. Trnková<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup>*Department of Chemistry, University of Agriculture, Prague,* <sup>b</sup>*Dairy Research Institute, Prague):* **Determination of Iodine in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection**

The accuracy of iodine determination in biological samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED), after preliminary alkaline dry ashing, was verified by analysis of reference materials as well as by good agreement with the results obtained in interlaboratory validation of a spectrophotometric method based on the Sandell-Kolthoff reaction. The HPLC method is suitable for mineralizates containing not less than 4.55 ng I/ ml. The method was used for determination of iodine in milk and meat as well as in milk and meat products.

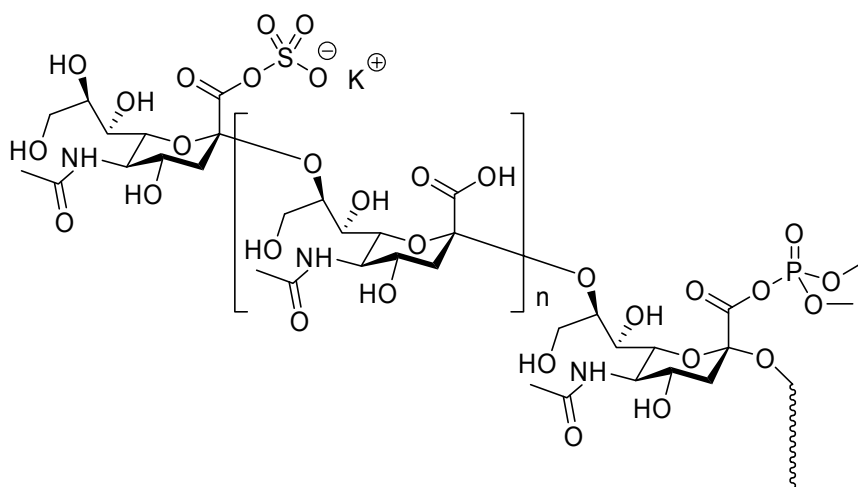


Ústav chemie a technologie  
sacharidů VŠCHT Praha



Ústav živočišné fyziologie  
a genetiky AV ČR

Česká společnost chemická



## KONFERENCE „STRUKTURA A BIOLOGICKÉ ÚČINKY POLYSACHARIDŮ A JEJICH DERIVÁTŮ“

11. listopadu 2005  
Novotného lávka 5, Praha 1

Vážení kolegové,

dne 11.11.2005 se koná pod patronátem České společnosti chemické konference „Struktura a biologické účinky polysacharidů a jejich derivátů“, která má za cíl uspořádat setkání chemiků, kteří se zabývají studiem polysacharidů a zejména jejich biologickým využitím. Česká odborná veřejnost má možnost na řadě konferencí a symposií se seznámit s úrovní výzkumu v mnoha oblastech chemie, avšak podle organizátorů konference, není v České republice věnována systematická pozornost úrovni studia a aplikace polysacharidů. Konference je skromným pokusem tuto mezeru zaplnit. Na konferenci budou prezentovány příspěvky, které se zabývají studiem struktury určitých polysacharidů, pozornost bude věnována zejména derivátům pektinu, chitinu a  $\beta$ -glukanům a dále příspěvky, jejichž tématem bude studium biologických účinků opět zejména těchto polysacharidů.

Doufám, že obsah konference bude zajímavý nejen pro vědecké a výzkumné pracovníky, ale také pro producenty polysacharidů a společnosti, které aplikují polysacharidy tradičním způsobem v potravinářských, farmaceutických nebo kosmetických výrobcích nebo vyrábějí produkty, které mají mít určitou biologickou účinnost.

Přeji konferenci úspěch a mám radost, že se jí zúčastňuje řada mladých kolegů.

Jana Čopíková  
předseda odborné skupiny Chemie a technologie  
sacharidů České společnosti chemické

## IMMUNOLOGICALLY ACTIVE XYLAN-TYPE POLYSACCHARIDES: A STRUCTURE/FUNCTION RELATION- SHIP STUDY

A. EBRINGEROVÁ<sup>a</sup>, Z. HROMÁDKOVÁ<sup>a</sup>,  
A. KARDOŠOVÁ<sup>a</sup>, J. HIRSCH<sup>a</sup>, and V. HŘÍBALOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia,* <sup>b</sup>*National Institute of Public Health, Šrobárová 48, 100 42 Prague, Czech Republic*  
*chemebri@savba.sk, havlin@czu.cz*

Phytotherapy has at its disposal a wide range of biologically active compounds, which nowadays play an important role in alternative medicine. Next to the numerous, more investigated low molecular compounds from medicinal plants, polysaccharides are, recently, reaching growing interest due to the broad variety of physiological and biological activities of these biopolymers. Most of the so far studied immunologically active cell wall carbohydrates belong to the group of pectic polysaccharides, less frequently they were of the xylan-type<sup>1-5</sup>, which are components of the cell wall found in every higher plant tissues.

A structure/biological activity relationship study was performed with xylans isolated from beechwood, corn cobs, corn bran, and the herbs *Rudbeckia fulgida*, *Mahonia aquifolium*, and *Althaea officinalis*. No relation was found between the biological response of the xylans in the mitogenic and comitogenic tests and their structural (primary structure and distribution of uronic acid side chains) and molecular properties. In contrast to the carboxymethylated hardwood xylan<sup>6</sup>, which activated the T-lymphocytes and immunocytes, the inactive beechwood xylan after a similar chemical modification did not gain immunomodulatory activity.

*The Slovak Scientific Grant Agency VEGA, Grant No. 2/3162/23 and SAS-COST D28/006/03 WG action are acknowledged for financial support.*

### REFERENCES

1. Paulsen B. S.: *Curr. Org. Chem.* 5, 939 (2001).
2. Samuelson A. B., Lund I., Djahromi J. M., Paulsen B. S., Wold J. K., Knutsen S. H.: *Carbohydr. Polym.* 38, 133 (1999).
3. Ebringerová A., Heinze, Th.: *Macromol. Rapid Commun.* 21, 542 (2000).
4. Ebringerová A., Kardošová A., Hromádková Z., Malvíková A., Hříbalová V.: *Int. J. Biol. Macromol.* 30, 1 (2002).
5. Kardošová A., Ebringerová A., Alföldi J., Nosál'ová G., Matáková T., Hříbalová V.: *Carbohydr. Polym.* 57, 165 (2004).
6. Fan Y. R., Feng Z. H.: *Acta Pharmacol. Sin.* 8, 166 (1987).

## TESTOVÁNÍ POLYSACHARIDŮ JAKO PREBIOTIKA

VLADIMÍR ERBAN

*Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31  
Praha 10*  
*v.erban@vupp.cz*

Optimální výživa je klíčový faktor ovlivňující fyziologické funkce každého jednotlivce. Kromě vitaminů, optimálního obsahu energetických a strukturálních složek potravy, které jsou většinou z potravy uvolňovány trávicími enzymy a resorbovány již v tenkém střevu, patří k optimální výživě i zdraví prospěšné střevní mikroorganismy, které se obecně nazývají probiotika. Jsou to mikroorganismy schopné kolonizovat tlusté střevo a úpravou prostředí střevní niky působí jako konkurenti patogenní mikroflóry.

Schopnost kolonizovat střevní niku je dána jednak genetickými vlastnostmi mikroorganismů a jednak vhodným prostředím podporujícím růst. Hlavními součástmi prostředí, které pozitivně ovlivňují růst probiotik, jsou látky označované jako prebiotika. Jedná se převážně o v tenkém střevě nestravitelné oligo- a polysacharidy ve formě rozpustné a nerozpustné vlákniny. Komplex vhodných probiotik a prebiotik se označuje jako synbiotikum.

Funkční vlastnosti synbiotik spočívají: ve zpomalené fermentaci vedoucí ke zvýšené perzistenci ve střevu, tím jsou zlepšené efekty a metabolické fermentace i v distálních oblastech střeva, kde je lokalizováno mnohé chronické střevní choroby (ulcerativní kolitis, nádory apod.). K hlavním zdravotně příznivým účinkům rozpustné vlákniny patří prokazatelný vliv na snížení hladiny cholesterolu v krevním séru, a to zejména jeho nežádoucí LDL frakce. Přídavek vlákniny k potravinám s vysokým glykemickým indexem je jeden z dietetologických přístupů při léčení obezity i diabetu II. typu. Zvýšený příjem beta-glukanů v potravě má příznivý vliv na nižší iniciaci a růst novotvarů v soustavě trávicího traktu. Zvětšení obsahu vázané vody zlepšuje fermentaci ve střevním lumenu vytvořením gelovité struktury, která interferuje s mukózou střevní stěny, a tím simuluje vazbu probiotik střevního lumenu. Tím se vytváří ochranná vrstva mezi střevní stěnou a adhezujícími patogenními mikroorganismy. Kromě těchto fyzikálních efektů synbiotik mají pozitivní vliv produkty fermentace prebiotik probiotiky – krátké mastné kyseliny, které jsou resorbovány specifickými střevními buňkami, které je využívají jako stavební látky pro tvorbu střevní mukózy, a tím se zvyšuje ochrana střevní stěny.

Testování biologického vlivu na zažívací trakt je velmi náročné, neboť dobrovolníci tvoří velmi heterogenní část populace. Proto je nutné používat velké soubory po dlouhou dobu, aby se projevil účinek synbiotika jako potravního doplňku. Proto je nutné testovat vhodnost jak probiotických bakterií, tak prebiotik zejména dietetických vláknin „*in vitro*“ v co nejširším rozsahu. V přednášce

budou demonstrovány jednak způsoby výběru vhodných probiotických bakterií (rezistence ke žlučovým kyselinám a k nízkému pH, jako stresovým podmínkám), jednak vlivy vláknin různých rostlinných zdrojů na fyziologické charakteristiky probiotických bakterií. Bude vliv prebiotik na stresové podmínky probiotik na základě ovlivnění fyziologických charakteristik bakterií a na základě stanovení různých minimálních inhibičních koncentrací (MIC). U kmene 107 je MIC kyselinou taurocholovou (TCH) 0,8 % pro variantu bez glukovaného extraktu. 1,6 % glukovaného extraktu umožňuje ještě téměř plný růst při koncentraci 1,5 % TCH, a při koncentraci 1,7 % TCH je růst ještě patrný. Vazba žlučových kyselin na vlákninu je demonstrována změnou MIC stanové difúzní metodou. Závislost MIC na koncentraci glukovaného extraktu je dána vztahem:

$$\text{MIC} = 0,1829 \times \text{koncentrace betaglukanů} + 0,6687.$$

*Práce byla podpořena Grantovou agenturou ČR (číslo grantu 525 05 0273) NAZV (číslo grantu QF 3297 a QF 0183).*

## PLANT POLYSACCHARIDES WITH IMMUNOMODULATORY AND ANTI-OXIDANT PROPERTIES

Z. HROMÁDKOVÁ<sup>a</sup>, A. KARDOŠOVÁ<sup>a</sup>,  
E. MACHOVÁ<sup>a</sup>, V. HRÍBALOVÁ<sup>b</sup>,  
and A. EBRINGEROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia,* <sup>b</sup>*National Institute of Public Health, Šrobárová 48, 100 42 Prague, Czech Republic*  
*chemhrom@savba.sk, havlin@czu.cz*

Medicinal plants have been used in traditional healing all over the world since ancient time. About only twenty years ago, intense research started on the biological activity (such as anti-inflammatory, antiulcer, antitumor, etc.) of polysaccharides isolated from higher plants<sup>1</sup>. A lot of the resulting reports indicated that many polysaccharides exhibit immunological activity<sup>2</sup>. However, the scientific understanding of how they work on the immune system is still incomplete. In the recent years, the antioxidant activity of polysaccharides has been under investigation. This is due to the protective action of antioxidants in inflammation and degenerative processes such as aging and carcinogenesis.

Herein, we review representative examples of our recent research on biologically active polysaccharides isolated from some European herbs (roots of *Valeriana officinalis* and *Arctium lappa*, aerial part of *Salvia officinalis*, and leaves of *Aloe barbadensis*) as well as the seed coat of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*)<sup>3-6</sup>. The iso-

lated polysaccharide complexes as well as there from prepared homogeneous and structurally well-defined polysaccharides were tested for immunomodulatory activity by the *in vitro* comitogenic test and for antioxidant activity by the inhibition effect on liposome peroxidation. The results were discussed in relation to the structural properties and presence of phenolic components.

*The Slovak Scientific Grant Agency VEGA, Grant No. 2/3162/23 and SAS-COST D28/006/03 WG action are acknowledged for financial support.*

## REFERENCES

1. Hensel A., Schmidgall J., Kreis W.: *Pharm. Acta Helv.* 73, 37 (1998).
2. Paulsen B. S.: *Curr. Org. Chem.* 5, 939 (2001).
3. Hromádková Z., Ebringerová A., Valachovič P.: *Ultrason. Sonochem.* 9, 37 (2002).
4. Kardošová A., Ebringerová A., Alföldi J., Nosáľová G., Fraňová S., Hříbalová V.: *Int. J. Biol. Macromol.* 33, 135 (2003).
5. Hromádková Z., Ebringerová A., Valachovič P.: *Ultrason. Sonochem.* 5, 163 (1999).
6. Hromádková Z., Ebringerová A., Hirsch J.: *Chem. Papers* 59, 223 (2005).

## POLYSACCHARIDY VE VYŠŠÍCH HOUBÁCH A JEJICH ÚČINKY

IVAN JABLONSKÝ

Vyšší houby jsou zatím neprobádaným zdrojem léčivých látek. Biologicky aktivní látky obsahují v plodnicích, myceliu i kultivačním mediu. U 700 druhů hub byly zjištěny léčivé látky. Jednou ze skupin látek s léčivými účinky jsou polysaccharidy, a to zejména glukany a heteroglukany. Tyto látky tvoří většinou buněčnou stěnu plodnic a mycelia. Hlívy (*Pleurotus* spp.) obsahují glukán Pleuran, houževnatec jedlý (*Lentinus edodes*) Lentinan, klanolístka (*Schizophyllum commune*) Schizophilan. U lesklokorky lesklé (*Ganodema lucidum*) byl zjištěn β-D-glukan označovaný jako Gl-1. V outkovce pestré (*Trametes versicolor*) jsou obsaženy 2 polysaccharidy a to Krestin a PSP (polysaccharidpeptid). Korálovec (*Grifola frondosa*) obsahuje glukán Grifon. V poslední době se studium glukánů zaměřuje na brazilský žampion (*Agaricus brasiliensis*). Experimenty *in vitro* i klinické pokusy prokázaly, že konzumací plodnic bazidiomycét lze předcházet onkogenezi, dále byla prokázána protinádorová aktivita houbových glukánů. Glukany působily preventivně proti vzniku metastáz. Mechanismus působení glukánů ještě není přesně znám, ale je nepochybné, že polysaccharidy z hub neatakuji rakovinné buňky přímo, ale aktivují imunitní systém.

*Práce byla podpořena z grantu GA ČR 525/03/0358.*

## NOVÉ TRENDY VE VYUŽITÍ VLÁKNINY V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU

DANIELA KRAMÁŘOVÁ, HELENA VELICHOVÁ  
a IGNÁC HOZA

Ústav potravinářského inženýrství a chemie, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín  
kramarova@ft.utb.cz

Současný životní styl vyvolal drastické změny ve stravovacích zvyklostech, spotřeba vlákniny je značně nižší než její doporučená hodnota. Na zmíněnou situaci reagují výrobci obohacováním potravin vlákninou<sup>1-3</sup>.

Vhodnou potravinou pro aplikaci  $\beta$ -D-glukanů ve formě hydrogelů se ukazují jogurty. Pravidelná konzumace 5 mg glukanů ve 150 ml jogurtu by měla pozitivně přispět k potlačení infekčních chorob<sup>4</sup>. Jako prebiotikum bývá využíván inulin. Vliv inulinového preparátu *Raftilose® Synergy 1* na zvyšování absorpce vápníku a hořčiku byl prokázán u adolescentních dívek i u starších žen<sup>5</sup>. Testy ukázaly, že s přidáním inulinu lze vyrobit mikrobiologicky stabilní masný výrobek s obsahem tuku sníženým až na 12 % (cit.<sup>6</sup>). Důležitou dietetickou zeleninou, obsahující místo škrobu inulin, je černý kořen (*Scorzonera hispanica*). Má nejvyšší obsah vlákniny (5,3 %) ze všech kořenových zelenin<sup>7</sup>. Společnost Enzymatic Therapy uvedla na trh výrobek nazvaný *Fiber Delights*, který obsahuje ve vyváženém poměru vlákninu z ovesných otrub a inulinu vlákninu s fruktooligosacharidy z čekankového kořene<sup>8</sup>.  $\beta$ -Glukan společnosti Cargill Health & Food Technologie, který se prodává pod názvem *Barley Betafiber*, se vyrábí extrakcí ze zrn ječmene. Neobsahuje žádné geneticky modifikované složky a od června 2003 má status výrobku GRAS (cit.<sup>9</sup>). Britská společnost Proxexis Ltd. připravila banánový extrakt, který je možno používat jako podpůrný prostředek při léčbě chronických zánětlivých gastrointestinálních onemocnění jako je Crohnova choroba<sup>10</sup>. Chronická zácpa patří k rozšířeným civilizačním chorobám. V řadě zemí se již delší dobu k její léčbě využívá psyllium<sup>11</sup>. Francouzská firma Roquette specializující se na aditiva nabídla novou generaci vlákniny s označením *Nutriose FB*, ve které jsou molekuly dextrinů více rozvětvené než obvykle se vyskytující dextriny a škroby<sup>12</sup>. Čeští výrobci se snaží orientovat na fortifikaci svých produktů vlákninou, ale ve výrobě doplňků stravy stále převažují zahraniční výrobci. Ze světových výzkumů dále vyplývá, že vyspělé státy se více orientují na nové trendy ve vývoji a využití nových typů vlákniny než ČR.

### LITERATURA

1. Marounek M., Březina P., Šimůnek J.: *Fyziologie a hygiena výživy*, 2. vyd., str. 148. VVŠ PV, Vyškov 2003.
2. Velíšek J.: *Chemie potravin 1.*, 1. vyd., str. 352. OSSIS, Tábor 1999.
3. Pánek J., Pokorný J., Dostálová J., Kohout P.: *Základy výživy*, 1. vyd., str. 207. Svoboda Servis, Praha 2002.
4. *Mliekarstvo* 35, 35 (2004).
5. *Milling&Baking News* 83, 25 (2004).
6. *Fleischwirtschaft* 85, 22 (2005).
7. Pekárková E.: *Výživa a potraviny* 53, 54 (2003).
8. dostupné na <http://www.enzy.com/>
9. dostupné na <http://www.cargillhft.com>
10. dostupné na <http://www.nutraingredients.com>
11. *Ernährungs-Umschau* 48, 482 (2001).
12. *Dairy Ind. Int.* 3, 12 (2002).

## METABOLISMUS PEKTINU U ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ TRÁVICÍHO TRAKTU ZVÍŘAT

MILAN MAROUNEK<sup>a,b</sup>, KAMIL SIROTEK<sup>a</sup>,  
ZDENĚK VOLEK<sup>b</sup> a OXANA SAVKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha, <sup>b</sup>Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 01 Praha  
marounek@iapg.cas.cz

V trávicím traktu všech býložravých a omnivorních živočichů jsou bakterie, které získávají energii fermentací pektinu. V sérii čtyř prací jsme se zabývali metabolismem pektinu u bakterií izolovaných z bachelu přežvýkavců<sup>1,2</sup> a slepého střeva králíků<sup>3,4</sup>. Všechny zkoušené pektinolytické bakterie, tj. *Butyrivibrio fibrisolvens* 787, *Prevotella ruminicola* AR29 a *Lachnospira multiparus* ATCC 19207 z bachelu, stejně jako *Bifidobacterium pseudolongum* P6 a *Bacteroides caccae* KWN ze slepého střeva, produkovaly při růstu na pektinu více acetátu a méně metabolitů, k jejichž syntéze jsou potřebné redukční ekvivalenty, než při růstu na glukose. V buněčných extraktech všech uvedených bakterií byla aktivní 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát aldolasa (EC 4.1.2.14), což je enzym Entnerovy-Doudoroffovy dráhy katabolismu hexos. Možnost, že galakturonát je dekarboxylován na L-arabinosu jsme vyloučili: jednak měřením tvorby CO<sub>2</sub> v kulturách *B. pseudolongum* P6, jednak úvahou, že pokud by tomu tak bylo, pak po ztrátě oxidované části molekuly by nebyl rozdíl v redoxním stavu fermentačních produktů. U bakterií *L. multiparus* ATCC 19207 a *B. caccae* KWN se na rozkladu molekuly pektinu podílely jak pektin lyasa, tak i pektin hydrolasa. *B. pseudolongum* P6 disponovalo jen hydrolasou, lyasová aktivita nebyla přítomna, což u pektinolytických bakterií není běžné. Bližší charakterizaci pektinolytických enzymů jsme pomocí viskozimetrických měření provedli u kmene KWN. Enzymy, které rozkládají pektin na oligogalakturonidy jsme určili jako extracelulární oxopektát hydrolasu (EC 3.2.1.67) a extracelulární en-

dopektát lyasu (EC 4.2.2.2). V kulturách pektinolytických bakterií jsme také vždy nacházeli methanol, tj. produkt účinku pektin methylesterasy (EC 3.1.1.11).

*Práce byla podpořena z grantu GA ČR 525/03/0358 a VZ ÚŽFG AV ČR č. AV0Z50450515*

#### LITERATURA

1. Marounek M., Dušková D.: Lett. Appl. Microbiol. 29, 429 (1999).
2. Dušková D., Marounek M.: Lett. Appl. Microbiol. 33, 159 (2001).
3. Slovácová L., Dušková D., Marounek M.: Lett. Appl. Microbiol. 35, 126 (2002).
4. Sirotek K., Slovácová L., Kopečný J., Marounek M.: Lett. Appl. Microbiol. 38, 327 (2004).

## POLARIZAČNÍ A ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE PŘÍRODNÍCH MATERIÁLŮ

MARTIN MARYŠKA

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Martin.Maryska@vscht.cz*

Polarizační a elektronová mikroskopie jsou techniky, které se doplňují při zkoumání biologického materiálu a potravinářských produktů. Na příkladech bude prezentováno poškození nebo zmažování škrobových zrn, výskyt nežádoucích krystalů v amorfních systémech, struktura produktů, které se skládají z amorfní fáze, krystalické struktury, nasyceného roztoku a pěn. Polarizační a elektronová mikroskopie se uplatňují při studiu tkání vyšších hub.

*Využití polarizační a elektronové mikroskopie při studiu biologických tkání je podporována projektem GA ČR (č. 525/05/0273).*

## STUDIUM $\beta$ -GLUKANŮ IZOLOVANÝCH Z *Pleurotus sp.* A *Agaricus sp.*

KATEŘINA MÍČKOVÁ, PETRA BLAFKOVÁ, JANA ČERNÁ, JANA ČOPÍKOVÁ, ANDRIY SYNYTSYA, ALLA SYNYTSYA, JIŘÍ SPĚVÁČEK, IVAN JABLONSKÝ a VLADIMÍR ERBAN

*Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, Česká Republika  
katerina.mickova@vscht.cz*

V posledních několika letech vzrostl zájem o  $\beta$ -glukany, izolované z buněčných stěn hub pro jejich schopnost pozitivně působit na imunitní systém. Mohou být použity jako imunomodulační, protinádorové a radioprotektivní působky<sup>1</sup>. Tyto účinky  $\beta$ -glukanů vyplývají z jejich chemické struktury. Jedná se o heteroglykany, jejichž postranní řetězce mohou obsahovat glukuronovou kyselinu, galaktosu, mannosu, arabinosu a xylosu. Rozdíly v aktivitě jednotlivých glukanů jsou dány jejich rozpustností ve vodě, velikostí molekuly a stupněm větvení. Pro protinádorové účinky jsou nezbytné vazby  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) a dále pak glukany s větší molekulovou hmotností jsou účinnější než ty nízkomolekulární.

Určení struktury polysacharidů je velmi důležitou charakteristikou jejich fyzikálních vlastností a následně i biologických účinků.

*Pleurotus sp.* a *Agaricus sp.* jsou významnými zdroji zdraví prospěšných polysacharidů, zejména pak  $\beta$ -glukanů. Pro jejich izolaci z těchto hub byla použita modifikovaná metoda podle Freimunda<sup>2</sup>, která zahrnuje extrakci 80% ethanolem, vodou za varu a následně alkalickou extrakci směsí 1M-NaOH a 0,05% NaBH<sub>4</sub>. Během izolace bylo nutné odstranit z extraktu glukany vázané  $\alpha$ -glykosidovými vazbami a dále také bílkoviny. Struktura jednotlivých polysacharidů byla určena pomocí IČ, Raman a NMR spektroskopie. Obsah  $\beta$ -glukanů byl stanoven jako 1,3:1,6- $\beta$ -glukany enzymovým setem KYBGL 11/2003 (Megazyme, Ireland), a to jak v lyofilizátech, tak v čerstvých vzorcích hub.

*Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České Republiky (projekt GA ČR 525/05/0273).*

#### LITERATURA

1. Šandula J., Kogan G., Kačuráková M., Machová E.: Carbohydr. Polym. 38, 247, (1999).
2. Freimund S., Sauter M., Käppeli O., Dutler H.: Carbohydr. Polym. 54, 157 (2003).

## VLIV CIZORODÝCH PRVKŮ NA OBSAH ŠKROBU V BRAMBOROVÝCH HLÍZÁCH

PAVEL BŘEZINA, PAVEL VALÁŠEK  
a OTAKAR ROP

*Ústav potravinářského inženýrství a chemie, Technologická fakulta, Univerzita Tomáše Bati, nám. T.G.M. 275, 762 72 Zlín  
rop@ft.utb.cz*

Přítomnost cizorodých prvků v prostředí vyvolává u rostlin řadu změn<sup>1</sup>. Expozice rostlin cizorodým prvkům inhibičně ovlivňuje průběh fotosyntézy, snižuje se obsah

chlorofylu v listech a polysacharidů v zásobních orgánech rostlin<sup>2</sup>. V důsledku velkého množství ploch půdy, které jsou u nás kontaminovány cizorodými prvky, je sledování jejich vlivu na kulturní plodiny vysoce aktuální.

Práce se zabývá sledováním obsahu škrobu v bramborových hlízách velmi rané odrůdy KRYSTALA vypěstovaných na půdách kontaminovaných arsenem, který byl aplikován ve formě  $As_2O_3$  (rozpuštěný v min. množství 25% NaOH), beryliem přidávaným ve formě  $BeCO_3$  (rozpuštěný v min. množství konc. HCl), rtuť, která byla použita ve formě HgO (rozpuštěný v min. množství konc.  $HNO_3$ ) a kadmii aplikovaným ve formě  $Cd(NO_3)_2$  (rozpuštěný v destilované vodě). Problematika byla řešena formou pokusu, který byl prováděn v plastových vegetačních nádobách. Byla použita jednotná zemina, přičemž hladina obsahu jednotlivých cizorodých prvků byla upravena následovně – u arsenu byly použity varianty s 4,5 mg As  $kg^{-1}$  zeminy a dále potom s 30,0; 60,0; a 120;0 mg As  $kg^{-1}$ , u berylia byl jeho obsah upraven na 2,0; 7,0; 14,0 a 28,0 mg Be  $kg^{-1}$  zeminy, u rtuťi bylo použito 0,8; 6,4; 12,8 a 25,2 mg Hg  $kg^{-1}$  zeminy a u kadmia byla zvolena hladina jeho obsahu na úrovni 0,4; 1,0; 2,0 a 4,0 mg Cd  $kg^{-1}$  zeminy. Vypěstované bramborové hlízy byly po mineralizaci analyzovány na obsah cizorodých prvků metodou atomové absorpční spektrofotometrie (přístroj PHILIPS PU 9200X) a škrob byl stanoven metodou podle Ewese<sup>4</sup>.

Se stupňovanými obsahy cizorodých prvků v půdě docházelo ke statisticky průkaznému zvyšování jejich obsahu v bramborových hlízách. Obsah škrobu se snižoval u všech variant s kontaminací zeminy ve srovnání s variantou kontrolní. Statisticky významné snížení obsahu škrobu se potom projevilo u variant s nejvyššími kontaminacemi zeminy kadmii (snížení obsahu škrobu na 12,21 % ve srovnání s 15,49 % v kontrolní variantě). Statisticky vysoce významné bylo snížení obsahu škrobu u variant s kontaminací rtuťi (u varianty s nejvyšší hladinou Hg v půdě na 10,79 %) a arsenem (u varianty s nejvyšší hladinou As v půdě na 10,65 %). Vliv berylia na obsah škrobu v bramborových hlízách se projevil jako statisticky nevýznamný.

#### LITERATURA

1. Ledvina R., Kolář L.: Rostl. Výroba 8, 353 (1997).
2. Greger M.: J. Exp. Bot. 42, 729 (1992).
3. Rop O.: *Obsah cizorodých prvků v rostlinách velmi raných odrůd brambor*, str. 7. MZLU, Brno 1999.
4. Novotný F.: *Metodiky chemických rozborů pro hodnocení kvality odrůd*, str. 83. ÚKZÚZ, Brno 2000.

## SORPCE ŽLUČOVÝCH KYSELIN NA *N*-ALKYLPEKTINAMIDY

LUCIE SIHELNÍKOVÁ, ANDRIY SYNYTSYA  
a JANA ČOPÍKOVÁ

*Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha,  
Technická 5, 16628 Praha 6  
lucie.sihelnikova@vscht.cz*

Sorbenty žlučových kyselin představují polymery sloužící ke snížení hladiny cholesterolu v krevní plasmě. K léčbě hypercholesterolemie se již mnoho let využívá Cholestyraminu® a Colestipolu®, jejichž nízká účinnost se odráží v nutnosti podávání vysokých dávek. Možnou náhradou těchto přípravků by mohly být *N*-alkylpektinamidy, které jsou předmětem této studie.

*N*-Alkylpektinamidy jsou deriváty pektinu, přírodního polysacharidu, který se nachází v buněčných stěnách vyšších rostlin. *N*-Alkylpektinamidy pro tuto studii byly získány heterogenní aminodealkoxylací vysokomethylovaného citrusového pektinu (typ XSS, Danisco) s oktyl-, dodecyl- a oktadecylaminem v prostředí *N,N*-dimethylformamidu. Reakce probíhala při teplotě 50 °C a za nepřetržitého míchání. Doba reakce se pro každý z použitých aminů pohybovala v rozmezí od 6 do 72 h, čímž byly získány deriváty o různých stupních amidace. Přítomnost alkylamidových substituentů a čistota produktů byly prokázány pomocí FT-IR spekter. Stupeň amidace byl vypočten na základě obsahu dusíku ve vzorku, který byl stanoven metodou dle Kjeldahla.

Sorpce žlučových kyselin z volské žluči na *N*-alkylpektinamidy byla vyhodnocena na základě jejich koncentrace před a po přidavku těchto derivátů. Sorpce probíhala při 37 °C po dobu 1 h. Koncentrace žlučových kyselin v roztoku byla určena enzymovou metodou (Bile Acid Procedure No. 450, Trinity biotech). Bylo provedeno srovnání sorpčních schopností jednotlivých derivátů pektinu a vyhodnocena závislost sorpce žlučových kyselin na délce alkylového řetězce a stupni amidace.

*Práce byla podpořena z grantu GA ČR 525/03/0358.*

## STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE GLUKANŮ <sup>13</sup>C NMR SPEKTROSKOPIÍ PEVNÉHO STAVU

JIRÍ SPĚVÁČEK

Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6  
spevacek@imc.cas.cz

Před 30 lety Schaefer a spol.<sup>1</sup> popsali způsob umožňující detegovat <sup>13</sup>C NMR spektra vysokého rozlišení v pevném stavu. Při měření těchto tzv. <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spekter se paralelně užívají následující tři metody: (i) rušení dipolárních interakcí <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (dipolar decoupling); (ii) rotace vzorku pod magickým úhlem (magic angle spinning – MAS), jež eliminuje rozšíření způsobené anisotropií chemických posunů; (iii) křížová polarizace (cross polarization – CP) vedoucí ke zvýšení citlivosti měření. Při splnění určitých podmínek<sup>2</sup> je možné takto měřená <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spektra užít i ke kvantitativní analýze. <sup>13</sup>C NMR spektroskopie vysokého rozlišení pevného stavu je v současné době metodou velmi často užívanou v mnoha vědních oblastech včetně chemie polysacharidů. Některé možnosti této metody při strukturní charakterizaci glukanů a jejich derivátů budou ilustrovány na příkladech níže uvedených systémů.

1. Celulosa: <sup>13</sup>C NMR spektra celulosy poskytují kromě chemické struktury i informaci o její krystalinitě, protože v důsledku odlišné konformační struktury se pro C4 a C6 uhlíky liší jejich chemické posuny v krystalických a amorfních oblastech. <sup>13</sup>C NMR spektroskopie pevného stavu je též vhodnou metodou ke sledování degradačních změn, ke kterým v celuloze dochází vlivem  $\gamma$ -záření<sup>2</sup>.
2. Chitin a chitosan: Důležitým parametrem pro charakterizaci chitinových materiálů je stupeň acetylace, který lze z <sup>13</sup>C NMR spekter velmi dobře stanovit. <sup>13</sup>C NMR spektra vysokého rozlišení též umožňují rozlišit  $\alpha$ - a  $\beta$ -chitin.
3. Chitin/glukanové komplexy: Studovány byly vzorky chitin/glukanových komplexů izolované jednak z plísňe *Aspergillus niger*, jednak jako nerozpustné podíly po extrakci z hub (hlíva, *Pleurotus* sp.). <sup>13</sup>C NMR spektra vysokého rozlišení potvrdila, že se skutečně jedná o komplexy chitin/ $\beta$ -glukan a umožnila stanovit složení těchto komplexů v závislosti na podmínkách přípravy vzorků.

Práce byla podpořena Grantovou agenturou ČR (číslo grantu 525/05/0273). Autor děkuje doc. J. Čopíkové, CSc. a Mgr. A. Synytsovi, PhD. za poskytnutí vzorků chitin/glukanových komplexů a Ing. J. Brusovi, Dr. za pomoc při měřeních NMR těchto vzorků.

## LITERATURA

1. Schaefer J., Stejskal E. O., Buchdahl R.: *Macromolecules* 8, 291 (1975).
2. Spěvák J., Straka J., Schneider B.: *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.* 48, 371 (1991).

## AMIDOVANÉ DERIVÁTY HM PEKTINU: PŘÍPRAVA, CHARAKTERIZACE A VYUŽITÍ

ANDRIY SYNYTSYA<sup>a</sup>, JANA ČOPÍKOVÁ<sup>a</sup>, LUCIE SIHELNÍKOVÁ<sup>a</sup> a MILAN MAROUNEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 Dejvice, <sup>b</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, 277 21 Liběchov, Česká republika  
sinicaa@vscht.cz

Pektiny jsou rostlinné polysacharidy široce používané v potravinářském průmyslu. Pektiny jsou také známy jako součást vlákniny snižující obsah cholesterolu v krvi<sup>1,2</sup>. Chemická modifikace pektinů, mezi které patří amidace, ovlivňuje jejich fyzikálně-chemické a technologické vlastnosti. Amonolýza methylesterových skupin vysokomethylovaných (HM) pektinů v heterogenní reakci s amoniakem v prostředí methanolu je běžně používána k amidaci pektinu. Amidované pektiny jsou důležité želírující látky pro výrobu cukrovinek. Aminodealkoxylace (aminolýza) HM pektinu pomocí primárních aminů, hydrazinu a hydroxylaminu vede ke vzniku *N*-alkylpektinamidů, pektinhydracidů a pektinhydroxamových kyselin<sup>3,4</sup>. Reakci pektinu s těmito látkami do makromolekuly polysacharidu zavádí nové funkční skupiny, které ovlivňují fyzikální a chemické vlastnosti derivátů a jejich možné aplikace. *N*-Alkylpektinamidy obsahující dlouhý alkylový řetězec jsou více hydrofobní než původní pektin, zatímco deriváty obsahující polární skupiny mají výrazný hydrofilní charakter. *N*-Okta-decylpektinamid, produkt reakce HM pektinu s *n*-okta-decylaminem, byl charakterizován jako perspektivní, levný a biologicky odbouratelný hydrofobní sorbent, který by mohl najít uplatnění jako součást potravinových doplňků snižujících obsah tuku a cholesterolu<sup>5</sup>.

Táto práca bola podporovaná grantem Grantové Agentury České Republiky (GA 525/03/0358).

## LITERATURA

1. Judd P. A., Truswell A. S.: *Br. J. Nutr.* 53, 409 (1985).
2. Hexeberg S., Hexeberg E., Willmsen N., Berge R. K.: *Br. J. Nutr.* 71, 181 (1994).
3. Synytsya A., Čopíková J., Prutyánov V., Skoblyá S.,



- Machovič V.: Carbohydr. Polym. 42, 359 (2000).
- Synytsya A., Čopíková J., Marounek M., Mlčochová P., Blafková P., Tkadlecová M., Havlíček J.: Czech J. Food Sci. 21, 162 (2003).
  - Synytsya A., Čopíková J., Marounek M., Mlčochová P., Sihelníková L., Skobly S., Havlátová H., Matějka P., Maryška M., Machovič V.: Carbohydr. Polym. 56, 169 (2004).

## **β-OLIGOFUKTANY Z JAKONU (*Smallanthus sonchifolius*) JAKO PREBIOTIKA V DOPLŇCÍCH STRAVY**

**VILÍM ŠIMÁNEK a KATEŘINA VALENTOVÁ**

*Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta,  
Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc  
vilim@tunw.upol.cz*

Fytochemikálie a nutraceutika, které podporují růst a proliferaci probiotických bakterií, např. *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, v trávicím traktu (TT) člověka mají výrazně pozitivní účinky na imunitní systém trávicího traktu a celkový stav organismu. Jejich preventivní a terapeutické účinky na chronická zánětlivá a nádorová onemocnění TT jsou uznávána moderní medicínou<sup>1</sup>. Hlízy jakonu (*Smallanthus sonchifolius*, Asteraceae) obsahují jako zásobní látky β-oligofruktany s nízkým zastoupením glukosy. Struktura fruktanů je stejného typu (β(2→1)fruktofuranosylsacharosa) jako v jiných druzích rostlin čeledi Asteraceae, např. topinamburu (*Helianthus tuberosus*)<sup>2,3</sup>. Ve srovnání s hlízami topinamburu mají fruktany obsažené v hlízách jakonu nižší stupeň polymerizace<sup>4</sup>. Fruktany o nízkém stupni polymerizace jsou dobře fermentovány v tlustém střevě nepatogenní mikrobiální flórou<sup>1</sup>. V kombinaci s přírodními chemoprotektivy mají také pozitivní fyziologický účinek na lipidový metabolismus. V příspěvku je hodnocen význam nestravitelných sacharidů v dietě rizikových skupin populace.

*Autoři děkují MŠMT ČR za finanční podporu (grant MSM 6198959216).*

### LITERATURA

- Modrianský M., Valentová K., Přikrylová V., Walterová D.: Chem. Listy 97, 540 (2003).
- Valentová K., Frček J., Ulrichová, J.: Chem. Listy 95, 594 (2001).
- Valentová K., Ulrichová J.: Biomed. Pap. 147, 119 (2003).
- Valentová K., Přikrylová V., Křen V., Halada P., Ulrichová J., Šimánek V.: Chem. Listy 96, 496 (2002).

## **POLYSACHARIDY KAKAOVÉHO PRÁŠKU**

**ANEŽKA TRILČOVÁ<sup>a</sup>, JANA ČOPÍKOVÁ<sup>a</sup>,  
MANUEL A. COIMBRA<sup>b</sup>, ANTÓNIO S. BARROS<sup>b</sup>  
a ANDRIY SYNYTSYA<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha,  
Technická 5, 166 28 Praha 6, ČR, <sup>b</sup>Departamento de Química,  
Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago,  
3810-193 Aveiro, Portugal*

Kakaový prášek je legislativně definován jako potravinu získaná z pražených kakaových bobů zbavených slupek, upravených do formy prášku. Kakaový prášek je nejen výrobkem, ale i surovinou při výrobě čokolády, čokoládových cukrovinek, trvanlivého pečiva, mléčných nápojů, směsí kakaa s cukrem, kakaa na pečení aj.

Polysacharidy jsou jednou z komponent, které se mohou podílet na kvalitě kakaového prášku. Bylo stanoveno složení neutrálních cukrů polysacharidů kakaového prášku. U souboru vzorků kakaového prášku byla také naměřena spektra ve střední infračervené oblasti. Získaná spektra byla vyhodnocena metodou hlavní komponenty v oblasti vlnočtů 1200–800 cm<sup>-1</sup>, kde se vyskytují pásy odpovídající polysacharidům. Střední infračervená spektroskopie v oblasti charakteristické pro polysacharidy může být použita k identifikaci kakaového prášku, jehož složení neodpovídá požadované kvalitě.

*Práce byla podpořena z projektu MSM 6046137305.*

## **VLIV PEKTINU A AMIDOVANÉHO PEKTINU NA METABOLISMUS CHOLESTEROLU A FERMENTAČNÍ AKTIVITU MIKROORGANISMŮ V SLEPÉM STŘEVĚ POTKANŮ**

**ZDENĚK VOLEK<sup>a</sup>, MILAN MAROUNEK<sup>a,b</sup>  
a EVA SKŘIVANOVÁ<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, Praha 10 – Uhřetěves, 104 01, <sup>b</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Videňská 1028, Praha 4, 142 20  
volem.zdenek@vuzv.cz*

Cílem pokusu bylo zjistit účinky pektinu a amidovaného pektinu (oktadecylpektinamid s vyšším stupněm substituce<sup>1</sup>) na živočišný organismus, zejména ve vztahu k metabolismu cholesterolu. Při laboratorních zkouškách byla pozorována nižší dostupnost amidovaných pektinů

pro intestinální mikroorganismy<sup>2</sup>, což může přinést, v porovnání se snadno fermentovatelným pektinem, vyšší efekt takto upraveného pektinu na zdraví a metabolismus v kaudálních částech trávicího traktu.

Potkani kmene Wistar byli rozděleni do tří skupin po sedmi. Do krmné směsi všech zvířat bylo přidáno 1 % cholesterolu a 5 % Megalacu. Megalac je komerční název pro směs vápenatých solí mastných kyselin s převahou kyseliny palmitové. První skupina byla kontrolní, 2. dostávala v krmné směsi 6 % citrusového pektinu a 3. skupina 6 % modifikovaného pektinu. Po 1-týdenní adaptační periodě následoval vlastní pokus v délce 4 týdnů. Během experimentu se denně zjišťovala individuální spotřeba krmiva a vody, týdně individuální živá hmotnost zvířat. Po ukončení pokusu byli potkani usmrceni, odebrány vzorky krve, obsahu slepého střeva a jaterní tkáně a zjištěna hmotnost slepých střev, jejich obsahu, jater a sleziny. V játrech potkanů a výkalech odebraných v poslední den pokusu byl stanoven cholesterol a koprostanol metodou plynové chromatografie. U potkanů krmených dietou doplněnou o modifikovaný pektin byla zaznamenána nižší živá hmotnost na konci pokusu ( $P = 0,01$ ), nižší denní přírůstek živé hmotnosti ( $P = 0,01$ ) stejně jako nižší spotřeba krmiva ( $P = 0,03$ ). U potkanů s modifikovaným pektinem byla dále zjištěna signifikantně vyšší hmotnost sleziny. Oproti očekávání nebyly pozorovány větší rozdíly v hmotnosti slepého střeva a jeho obsahu. Nálezy mikrobiálních metabolitů v obsahu slepého střeva se vyznačovaly velkým rozptylem a většina rozdílů mezi skupinami nebyla statis-

ticky významná. Pokud se týká složení krve, statisticky významný rozdíl byl pozorován v obsahu sérových triacylglycerolů. Nejnižších hodnot bylo dosaženo u potkanů přijímajících v krmné směsi neupravený citrusový pektin ( $P < 0,05$ ). Velmi významným výsledkem je signifikantní snížení obsahu cholesterolu v játrech doprovázené zvýšením obsahu cholesterolu ve výkalech potkanů přijímajících modifikovaný pektin. Ukazuje se tedy, že hydrofobní sorbent, kterým je výše substituovaný oktadecylpektinamid, je účinným prostředkem k vyloučení cholesterolu výkaly. Zároveň s tím lze učinit závěr, že přerušení enterohepatálního oběhu cholesterolu zvýšením střevní viskozity vlivem přídatku neupraveného pektinu (skupina 2), se zdá být méně účinné. K podobným závěrům jsme dospěli i při zkouškách s oktadecylpektinamidem o nižším stupni substituce.

*Studie byla podporována VZ (MZe-0002701403) a GA ČR (projekt: 523/03/0358).*

#### LITERATURA

1. Synytsya A., Čopíková J., Marounek M., Mlčochová P., Sihelníková L., Skoblyba S., Havlátová H., Matějka P., Maryška M., Machovič V.: Carbohydr. Polym. 56, 169 (2004).
2. Marounek M., Čopíková J., Skřivanová V., Synytsya A., Sihelníková L.: Reprod. Nutr. Dev. 44 (Suppl.1), S73, 2004.

**Autorský rejstřík**

Barros A. S.	669	Maryška M.	666
Blažková P.	666	Míčková K.	666
Březina P.	666	Rop O.	666
Coimbra M. A.	669	Savka O.	665
Černá J.	666	Sihelníková L.	667, 668
Čopíková J.	666, 667, 668, 669	Sirotek K.	665
Ebringerová A.	663, 664	Skřivanová E.	669
Erban V.	663, 666	Spěváček J.	666, 668
Hirsch J.	663	Synytsya Al.	666
Hoza I.	665	Synytsya An.	666, 667, 668, 669
Hromádková Z.	663, 664	Šimánek V.	669
Hříbalová V.	663, 664	Trilčová A.	669
Jablonský I.	664, 666	Valášek P.	666
Kardošová A.	663, 664	Valentová K.	669
Kramářová D.	665	Velichová H.	665
Machová E.	664	Volek Z.	665, 669
Marounek M.	665, 668, 669		

<b>OBSAH</b>		<b>CONTENTS</b>	
<b>ÚVODNÍK</b>	621	<b>EDITORIAL</b>	621
<b>REFERÁTY</b>		<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů</b>	622	<b>Structural Abundance and Biological Significance of Lignans and Related Plant Phenylpropanoids</b>	622
J. Harmatha		J. Harmatha	
<b>Transport látek cez membránu u Archaea: membránové transportné proteíny</b>	633	<b>Transport Across Archaeal Cytoplasmic Membrane: Membrane Transport Proteins</b>	633
S. Šurín a P. Šmigáň		S. Šurín and P. Šmigáň	
<b>Gelové techniky pro měření <i>in situ</i> ve vodách, půdách a v sedimentech</b>	640	<b>Gel Techniques for <i>in situ</i> Measurement in Natural Waters, Soils and Sediments</b>	640
P. Diviš, H. Dočekalová a V. Smetková		P. Diviš, H. Dočekalová, and V. Smetková	
<b>Degradační produkty a nečistoty paracetamolu z hlediska jejich detekce</b>	647	<b>Degradation Products and Impurities of Paracetamol from Viewpoint of Analytical Detection</b>	647
L. Hanyšová, P. Kastner a J. Klimeš		L. Hanyšová, P. Kastner, and J. Klimeš	
<b>LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY</b>		<b>LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS</b>	
<b>Úprava optosondy luminiscenčního spektrometra Perkin-Elmer LS 55 na meranie fluorescenčných spektier kožných povrchov</b>	653	<b>Modification of the Optical Probe of the Perkin-Elmer LS 55 Luminiscent Spectrometer for Measurement of Fluorescence Spectra of Skin Surface</b>	653
M. Mokřý, J. Kušnír, P. Gál, K. Dubayová, M. Synek a J. Sabo		M. Mokřý, J. Kušnír, P. Gál, K. Dubayová, M. Synek, and J. Sabo	
<b>Stanovení jodu v biologickém materiálu metodou HPLC s elektrochemickým detektorem</b>	657	<b>Determination of Iodine in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection</b>	657
A. Hejtmánková, M. Vejdová a E. Trnková		A. Hejtmánková, M. Vejdová, and E. Trnková	
<b>POLYSACHARIDY 2005</b>	661	<b>POLYSACHARIDES 2005</b>	661

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 99 (2005), čís./no. 9 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 129, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 115 • 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: M. Bláhová, I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • 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 • 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 PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; t el/fax +420 222 220 184, e-mail: mblahova@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 © 2005 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plně předplatné 2005 (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 2005 (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 23.8.2005.**