

Jak to nejlépe říci mládeži?

Jde, to se rozumí, o chemii. O výuku chemie. A o něco navíc, jde též o obory chemii blízké včetně molekulových věd. Je vůbec aktuální v r. 2004 o tom hovořit? Myslím, že je to velmi aktuální; mám dokonce dojem, že alespoň někde, jakoby výuka středoškolské chemie byla postižena určitou krizí. Dilem jde o krizi, jež se týká všech rychle rostoucích oblastí věd, tedy kromě chemie i fyziky a biologie, dilem jde o specifické svízele chemie.

Začneme těmi specifickými. Domnívám se, že v souvislosti se středoškolskou výukou v pozadí stojí úpadek zájmu o experiment a připsání nepřiměřeně velké role teorii, konkrétně teorii chemické vazby. První svízel možná někde a někdy souvisí s růstem pohodlnosti (to se týká i vysokoškolských přednášek), druhá bývá často spjata s nedostatečným porozuměním základům kvantové teorie a z toho plynoucímu špatnému výkladu. Nešťastní učitelé, ubozí studenti. A tak místo růstu mladých obdivovatelů chemie to spíše napomáhá k růstu počtu těch, kteří pocítují po celý život k chemii nechut'. Konečně v souvislosti s potíženími specifickými pro chemii nutno uvést někdy takřka fanatické útoky proti chemii, jako ničitelce životního prostředí. (Úroveň a hloubka neznalosti lidí vedoucích tyto útoky bývá neuvěřitelná. Přesto často média tyto zprávy – ke škodě lidské společnosti – přebírají.) V zásadě jde o záměnu viny chemie s vinou bezuzdně realizované konzumní společnosti. Je však nesporné, že stejného odsouzení jako bezbřehý konsum si zaslouží chemický průmysl v případech i jen mírně pokleslé zodpovědnosti.

Pokud jde o svízele, jež postihují všechny rychle rostoucí oblasti věd, je zřejmé, že nemůžeme bezrestně k dané osnově přidávat další a další nové partie. Alespoň jednou za čas je nutné odhodlat se k sestavení osnovy nové. Partie z hlediska „faktického“ či didaktického postradatelné, nutno eliminovat. Mnozí ovšem víme a všichni patrně tušíme, jak svízelné je navrhnout osnovu novou, opravdu kvalitní a odpovídající potřebám doby. Růst množství látky je velký, představuje opravdové nebezpečí a neohrožuje zdaleka jen chemii. To nebezpečí vidím v tom, že hrozivě roste tendence látku rychle zvládnout (povrchnost patří k tomu téměř vždy) a ještě rychleji zapomenout. Tento postup se často praktikuje i při vysokoškolském studiu. To se rozumí, že touto cestou vzdělanců nepřibývá. Budme však sami (tedy ti, kteří vznášejí požadavky) zodpovědní a realističtí. Při velikých objemech látky, prezentovaných ve většině předmětů, se nám může stát, že budeme požadovat nemožné. Ve všech předmětech by však měl existovat umírněný základ, jenž by se měl vyžadovat trvale, který by se měl stát součástí duševního vlastnictví absolventů dané školy.

V této souvislosti je vhodné zmínit tísnivý jev, jenž je spjat se zmíněnými nešvary. Je to k nevíře, avšak často požadavky na studenty na gymnáziu, při přijímacím hovoru na vysokou školu, při zkouškách na vysokých školách, při státních závěrečných zkouškách a řekneme při doktor-

ském (PhD.) studiu se příliš neliší. Jde o letité pozorování zdaleka nikoli pouze moje. To přece není v pořádku! (Čím dříve s tím examinátoři na všech úrovních skončují, tím lépe. Vzpomínám s respektem na úroveň přijímacích hovorů a zkoušek před obhajobou disertace v době před 40 lety v ústavech R. Brdičky a J. Heyrovského. Atmosféra byla noblesní, avšak požadavky byly věru rigorosní. To se týkalo jak úrovně, tak rozsahu znalostí.)

Bezprostředním impulsem k napsání této poznámky byla středoškolská učebnice, jež se mi dostala nedávno do ruky. Kvalitní, dvoudílná práce německých autorů. Učebnice dobře přeložená do češtiny. Ptáte se, kde je potíže? Je v tom, že kdyby mě vyzval archanděl Gabriel, abych postupně vyzkoušel ze vši té materie své kolegy v chemických ústavech, středoškolské profesory chemie a školní inspektory z oblasti chemie, dopadlo by to špatně, možná velmi špatně. Přitom by mi bylo uloženo, abych byl zdrženlivý v požadavcích a navíc abych byl vlídný examinátor. Té látky je totiž zoufale mnoho. Tak mnoho, že to vše ztrácí smysl.

Je smutné, je-li učebnic málo, je-li výběr nedostatečný. Myslím, že u nás bylo dosaženo jiného extrému: učebnic je příliš mnoho a kvalitního recenzování příliš málo. Je možné, že se dnes (část) učebnic píše nejen pro usnadnění přístupu ke kvalitní literatuře, k dobrým či velmi dobrým učebnicím, ale též z důvodů ryze komerčních.

Nyní jde o to, co s tím? V této poznámce to lze naznačit pouze heslovitě. Je dobře si uvědomit, že jen menšina středoškoláků bude potřebovat rozsáhlé znalosti z chemie v každodenní práci. Ta většina by si měla ze střední školy odnést příjemný pocit, že mají představu o struktuře hmoty, jakož i o tom, jakým hlavním přeměnám podléhají molekuly v laboratoři, v průmyslových reaktorech, ale též v živé hmotě.

Je dobře začít krátkou historií oboru, která, v případě chemie, je myšlenkově poutavá a inspirující. Oč jde v chemii. Atom a jeho struktura, stavební částice hmoty. Jednoduché představení periodického systému prvků. Proč (za laboratorních podmínek) přecházejí atomy v molekuly. Chemické názvosloví (v moudrém, tedy spíše v malém rozsahu). A zpět k molekulám a k pevné fázi: hlavní typy vazeb mezi atomy. Slovo o geometrické struktuře molekul. Proč se nepodařilo popsat vazebné poměry v molekule pomocí Newtonovy mechaniky. Převrat ve 20. letech 20. století: vznik nové mechaniky, jež popisuje velmi dobře poměry u atomů, molekul a v pevné fázi – těšte se na vysokoškolský kurs – zde jen krátký, kvalitativní a maximálně průhledný miniúvod. Chemické rovnice: společné a specifické rysy ve srovnání s matematickými rovnicemi. Rovnováhy a rychlosti chemických reakcí. Role katalýzy. Ilustrace pomocí acidobazických a redukčně-oxidačních reakcí. Chemická syntéza a chemická analýza (velmi konkrétní, jednoduché ilustrace). Molekuly a makromolekuly

(především s ohledem na biodisciplíny).

Tato látka by měla být rozložena na tři roky. V průběžných testech je třeba po celou dobu se vracet k základním znalostem. Každý druhý týden demonstrace základních chemických operací a velmi promyšleně zvolených pokusů.

V této poznámce nemohu vyčerpát všechny aktuální rysy této tematiky. A tak jen heslovitě: střední škola má poskytnout solidní základní vzdělání, vést trvale k logickému myšlení, seznamovat s induktivní a deduktivní metodou rozšiřování poznání. Takto připravení absolventi budou schopni využívat databázi a elektronického komunikování. Navíc nenaletí šarlatánům, nabízejícím podvodné výrobky a podvodné metody léčení.

Ještě něco: obecná výuka nesmí být vláčena přepjatými či nešťastnými otázkami u přijímacích zkoušek na některé fakulty vysokých škol. Je věcí uchazeče, aby se seznámil s požadavky a aby se připravil i na (velmi) speciální otázky.

Konečně: bylo by dobře, kdyby tato poznámka iniciovala diskusi o této tematice.

Svým kolegům, Haně Heroldové, Bohumilu Kratochvilovi, Františku Liškovi, Josefu Pacákovi a Martinu Srncovi, děkuji za rozpravy o tématu tohoto příspěvku a za přečtení rukopisu.

Rudolf Zahradník

XANTHOMOL – CHMELOVÁ PRYSKYŘICE NEBO POLYFENOL?

PAVEL HOFTA, PAVEL DOSTÁLEK a
GABRIELA BASAŘOVÁ

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
pavel.hofta@vscht.cz

Došlo 18.8.03, přepracováno 17.10.03, přijato 27.11.03.

Klíčová slova: xanthomol, chmel, *Humulus lupulus*, pivo, prenylované flavonoidy, polyfenoly

Obsah

1. Úvod
2. Flavonoidy chmele
 - 2.1. Prenylflavonoidy chmele
3. Chemické vlastnosti xanthomolu a isoxanthomolu
 - 3.1. Biotransformace xanthomolu
4. Vliv prenylflavonoidů chmele na lidské zdraví
5. Bilance xanthomolu během výroby piva
6. Závěr

1. Úvod

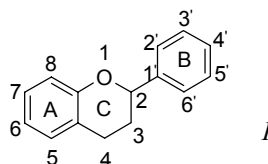
Hlávky samičích rostlin chmele (*Humulus lupulus* L.) čeledi Cannabaceae jsou jednou ze základních surovin na výrobu piva. Obohacují pivo nejen o tolik oblíbenou hořkost, plnost chuti a vůni, ale i o řadu látek, jež zvyšují jeho hodnotu z pohledu pivovarské technologie, moderního lékařství a farmakologie. Mezi tyto látky patří polyfenoly chalkonové řady, prenylovaný flavonoid xanthomol (XN) a jeho izomer flavanon isoxanthomol (IX). XN byl izolován již v roce 1892, pojmenován a získán ve větším množství byl až v roce 1913 a objev struktury XN a jeho izomeru byl učiněn týmem prof. Verzela již před 46 lety¹⁻³. Pozornost odborníků si však tato látka zaslouží až nyní, s rozvojem biochemických věd a výzkumu zaměřeného na lidské zdraví.

Polyfenolické látky se obecně podílejí na chemicko-fyzikální stabilitě piva, na formování pěny a na odolnosti proti stárnutí a oxidaci piva. Navíc některé z těchto látek mají silné antioxidační, antikarcinogenní, protimikrobiální, protitrombózní a další vlastnosti, které pozitivně působí na lidské zdraví. Z celkového množství polyfenolů obsažených v mladíně jich pouze 20 až 30 % pochází z chmele, ostatní pochází ze sladu⁴. Řada polyfenolických látek obsažených ve chmelu má obdobné antioxidační účinky jako syntetické antioxidy, které zabraňují nepříznivým projevům oxidace a jsou dnes součástí mnoha potravin. Pivo

tak může zvyšovat hladiny antioxidantů v lidském organismu, a tím zabraňovat nežádoucím oxidacím volnými radikály, které jsou příčinou řady civilizačních chorob⁵.

2. Flavonoidy chmele

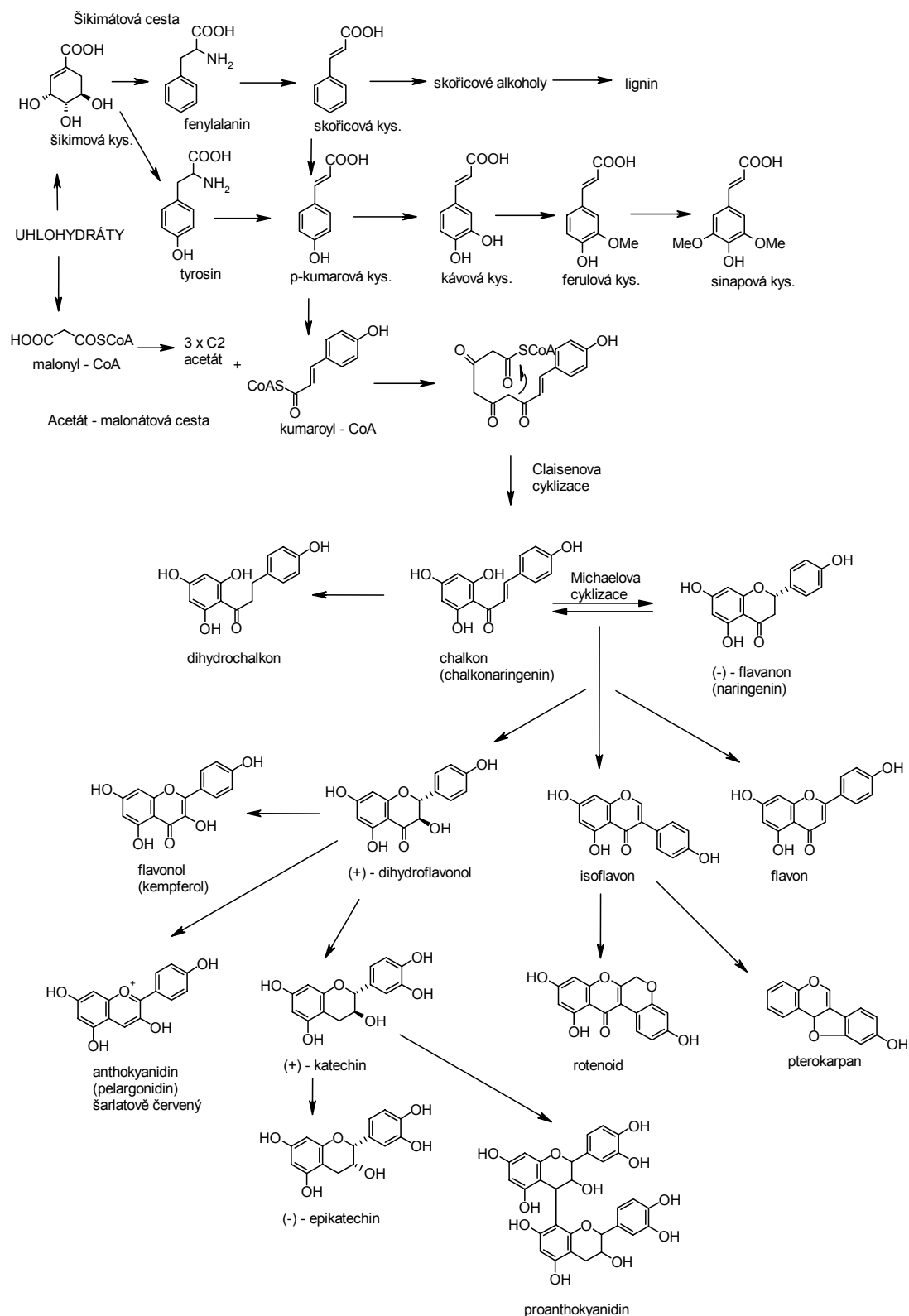
Metodou HPLC bylo ve chmelu, mladíně a pivu nalezeno a izolováno více než 100 polyfenolických látek. Nejvíce zastoupenou skupinu polyfenolových složek chmele v pivu představují flavonoidy, které patří do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů obsahujících v molekule dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání C₆–C₃–C₆, a jejichž struktura se odvozuje od skeletu heterocyklického flavanu (*I*, cit.⁶). Majoritními složkami chmele jsou nejčastěji katechin, epikatechin a jejich polymery proanthokyanidiny, dále flavonoly rutin, kvercetin a kempferol⁷. Dále také prenylovaný chalkon xanthomol⁸.

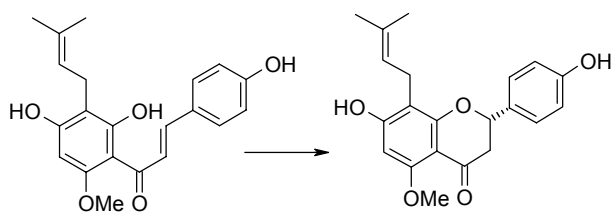
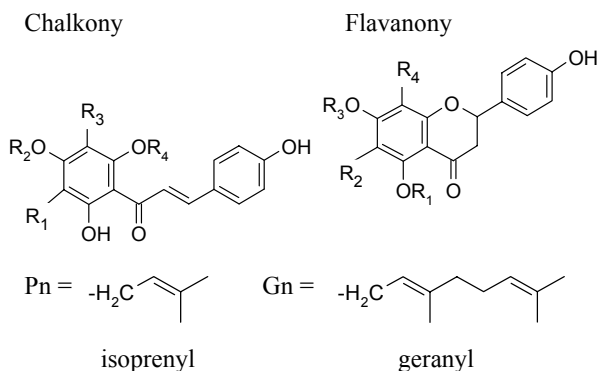


Chmelové flavonoidy se obvykle rozdělují do čtyř podskupin na chalkony, flavanoly, flavonoly a anthokyanidiny⁹. Chalkony jsou prvními intermediáty v biosyntéze flavonoidů vznikajícími reakcí mezi kyselinou kumarovou a třemi acetátovými jednotkami, katalyzovanou enzymem chalkonsynthasou. Další adice prenylu nebo geranylu mohou vést k izomeraci chalkonů. Flavanonová struktura vzniká izomerací chalkonu enzymem chalkonisomerasou a její následná oxidace vede k flavanolům, kdežto redukce k flavanolům. Flavanolová polymerace může dále vést k dobře známým proanthokyanogenům. V tomto případě se vytváří vazba mezi C-8 kruhu A a C-4 kruhu C. Krátké polymery s méně než 10 jednotkami jsou obvykle označovány jako oligomery, kdežto dlouhé řetězce jsou známy jako taniny, viz. (schéma 1, cit.^{6,10,11}).

2.1. Prenylflavonoidy chmele

Pouze několik málo vyšších rostlin umí syntetizovat prenylované flavonoidy, asi 5 % známých prenylovaných flavonoidů pochází z chmele. Rostlina biosyntetizuje a sekretuje prenylflavonoidy spolu s chmelovými pryskyřicemi a silicemi do lupulinových žlázek. Chmelové hlávky obsahují poměrně velké množství flavonoidů s prenylovým nebo geranylovým substituentem na kruhu A. Více než 80 až 90 % z nich tvoří XN v množstvích 0,2 až 1,1 hm.% v sušině chmele⁸, který přechází do piva

Schéma 1. Biosyntéza flavonoidů^{6,10,11}

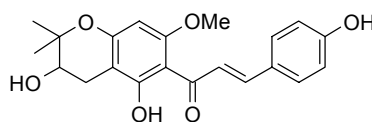
Obr. 1. Izomerační přeměna xanthohumolu v isoxanthohumol během chmelovaru¹²

Č.	Triviální název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>Chalkony</i>					
I	Xanthohumol	Pn	H	H	Me
II	Xanthogalenol	Pn	H	Me	H
III	4'-O-Methylxanthohumol	Pn	Me	H	Me
IV	4',6'-Di-O-methylchalconaringenin	H	Me	H	Me
V	Desmethylxanthohumol	Pn	H	H	H
VI	3'-Geranylchalconaringenin	Gn	H	H	H
VII	3',5'-Diprenylchalconaringenin	Pn	H	Pn	H
VIII	5'-Prenylxanthohumol	Pn	H	Pn	Me
<i>Flavanony</i>					
XIII	Isoxanthohumol	Me	H	H	Pn
XIV	7-O-Methyl-6-prenylnaringenin	H	Pn	Me	H
XV	7-O-Methyl-8-prenylnaringenin	H	H	Me	Pn
XVI	5,7-Di-O-methyl-8-prenylnaringenin	Me	H	Me	Pn
XVII	5,7-Di-O-methylnaringenin	Me	H	Me	H
XVIII	6-Prenylnaringenin	H	Pn	H	H
XIX	8-Prenylnaringenin	H	H	H	Pn
XX	6-Geranylnaringenin	H	Gn	H	H
XXI	8-Geranylnaringenin	H	H	H	Gn
XXII	6,8-Diprenylnaringenin	H	Pn	H	Pn

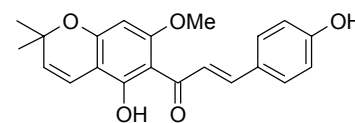
Obr. 2. Prenylované flavonoidy chmele a chmelových výrobků a jejich izomery; Pn – isoprenyl, Gn – geranyl

v izomerované formě jako IX, podobně jako např. α -hořká kyselina na iso- α -hořkou kyselinu. Tato podobnost a skutečnost, že se při analytickém stanovení používá extrakce organickými rozpouštědly, ho řadí mezi chmelové pryskyřice (obr. 1). Dále je ve chmelu více zastoupen desmethylxanthohumol (2–5 %) a xanthohumol C (1–2 %), ostatní prenylflavonoidy se ve chmelu nachází pouze ve stopovém množství^{12,13}. Chemické vzorce prenylflavonoidů chmele jsou uvedeny na obr. 2 (cit.⁸).

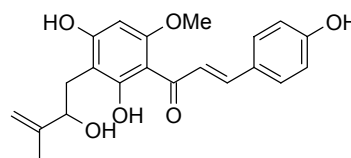
Prenylflavonoidy chmele prozkoumal zatím nejlépe Stevens a spol. Ve více než 120 vzorcích chmele (*Humulus lupulus*) a (*Humulus japonicus*) z 52 odrůd a tří divokých taxonů objevil 22 prenylovaných flavonoidů. XN byl hlavní prenylflavonoid ve všech vzorcích chmele a byl doprovázen 11 strukturálně podobnými chalkony. Deset flavonoidů bylo identifikováno jako flavanonové izomery těchto chalkonů. Tři jiné prenylované chalkony byly objeveny v americké odrůdě Galena, jeden z nich, který byl identifikován jako 3'-prenyl-4'-O-methylchalconaringenin,



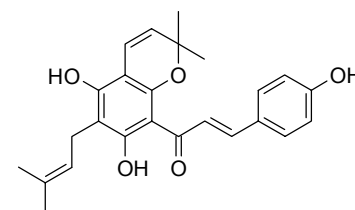
IX Xanthohumol B



X Xanthohumol C



XI Xanthohumol D



XVII Xanthohumol E

byl pojmenován xanthogalenol. K identifikaci byla používána HPLC s hmotnostní detekcí fragmentů (MS-CID a CAD), která však neuměla rozdělit chalkony od jejich izomerovaných flavanonů, proto byla používána i UV detekce. Většina chalkonů má absorbní maxima blízko 370 nm, kdežto jejich izomerované flavanony blízko 290 nm. Z českých odrůd byly zkoumány bezvirozní klony č. 36, 38 a 72 Žateckého poloraného červeňáku (Saazer). Bylo zjištěno, že ze zkoumaných odrůd obsahují nejvíce desmethylxanthohumolu, zato však neobsahují žádný xanthogalenol ani jiné 4'-*O*-methylchalkony, a tudíž ani žádné jejich izomerované flavanony⁸.

Obsah XN a ostatních prenylflavonoidů ve chmelu závisí na odrůdě a stresových faktorech, dále pak na skladování podobně jako u α -hořkých kyselin. Během půlročního skladování může obsah prenylflavonoidů poklesnout až o 50 % (cit.¹⁴). U odrůd Nugget a Perle pěstovaných v USA a Německu bylo zjištěno, že množství XN ve chmelu závisí nejen na odrůdě, ale i na pěstební oblasti a pěstebních podmínkách^{15,16}. Aromatické odrůdy ho obsahují méně než odrůdy vysokoobsažné. Žatecký poloraný červeňák ho obsahuje podle Fostera asi 0,35 hm.% v sušině¹⁶. České odrůdy ze sklizně 2002 obsahovaly podle Chmelařského institutu průměrně: Žatecký poloraný červeňák 0,33 hm.% XN v sušině, Premiant 0,37 hm.% XN v sušině, Sládek 0,71 hm.% XN v sušině, Bor 0,49 hm.% XN v sušině, Agnus 1,01 hm.% XN v sušině. Obsahy XN u zahraničních odrůd se pohybovaly v rozmezí 0,22–1,09 hm.% v sušině¹⁷.

3. Chemické vlastnosti xanthohumolu a isoxanthohumolu

XN je žluto-oranžová krystalická látka nepolární povahy obsažená spolu s chmelovými pryskyřicemi a silicemi v chmelových hlávkách všech chmelových odrůd. Je to látka, která patří mezi chalkony a prenylované flavonoidy. Její povahou je možné ji řadit mezi polyfenoly i mezi chmelové pryskyřice. Bod tání této látky je 160 °C. Podle Stevense je XN téměř nerozpustný ve vodě (1,3 mg.l⁻¹ při 8 °C, cit.¹²), petroletheru a pivu (4 mg.l⁻¹ při 8 °C, cit.¹²), krystalizuje v 50% ethanolu, 50% acetonu, kyselině octové, chloroformu, benzenu a toluenu. S ethanolovým roztokem chloridu železitého tvoří hnědo-černé sloučeniny. Není opticky aktivní. Rozpouští se v silném hydroxidu a v kyselině sírové za tvorby tmavě červené sloučeniny. Chalkon XN se ve slabě alkalickém prostředí (5% NaOH) izomeruje z 95 % na flavanon IX, zpětná konverze na XN s výtěžkem okolo 5 % je možná pomocí 40% kyseliny fluorovodíkové³. Molekulový vzorec XN je C₂₁H₂₂O₅ a jeho molekulová hmotnost je 354,4 g.mol⁻¹. Číslo v databázi CAS je [6754-58-1]. Maximální absorbance XN v UV záření je při 367,8 nm (1 mg XN/ 100 ml methanolu)¹⁸. Chemické vlastnosti ostatních prenylflavonoidů chmele jsou uvedeny v tabulce I, cit.⁸.

IX je světle žlutá krystalická látka, méně rozpustná než XN. S ethanolovým roztokem chloridu železitého tvoří

Tabulka I
Chromatografická a spektrální data prenylflavonoidů⁸

Č.	Triviální název	UV λ_{\max} [nm] v MeOH	APCI- MS, m/z (MH) ⁺
<i>Chalkony</i>			
1	Xanthohumol	368	355
2	Xanthogalenol	365	355
3	4'- <i>O</i> -Methylxanthohumol	367	369
4	4',6'-Di- <i>O</i> - methylchalkonaringenin	367	301
5	Desmethylxanthohumol	366	341
6	3'-Geranylchalkonaringenin	367	409
7	3',5'-Diprenylchalkonaringenin	372	409
8	5'-Prenylxanthohumol	371	423
9	Xanthohumol B	370	371
10	Xanthohumol C	371	353
11	Xanthohumol D	369	371
12	Xanthohumol E	369	407
<i>Flavanony</i>			
13	Isoxanthohumol	287	355
14	7- <i>O</i> -Methyl-6-prenylaringenin	291	355
15	7- <i>O</i> -Methyl-8-prenylaringenin	291	355
16	5,7-Di- <i>O</i> -methyl-8- prenylaringenin	287	369
17	5,7-Di- <i>O</i> -methylaringenin	283	301
18	6-Prenylaringenin	291	341
19	8-Prenylaringenin	291	341
20	6,8-Diprenylaringenin	295	409
21	6-Geranylaringenin	294	409
22	8-Geranylaringenin	294	409

tmavě žluté sloučeniny³. Maximální absorbance IX v UV záření je při 287 nm (1 mg IX/ 100 ml methanolu)¹⁸.

Typické polyfenoly jsou koncentrovány v listenech chmelových šištic a mají polární charakter, a proto jsou dobře rozpustné v horké vodě. V nepolárních rozpouštědlech jako je např. CO₂ nebo hexan jsou velmi málo rozpustné. Ačkoli většina flavonoidů je dobře rozpustná v horké vodě, nepolární XN tvoří výjimku. Hromadí se spolu s tvrdými pryskyřicemi a oleji v lupulinových žlá-
z-

kách, ale ne v listenech chmelových šištic. V superkritickém CO₂ (např. při 30 MPa, 50 °C) je XN rozpustný pouze ve stopách. V ethanolu se rozpouští 90 % všech prenylflavonoidů chmele, XN je proto zastoupen v ethanolových extraktech chmele a jeho koncentrace zde může dosáhnout až k 10 hm.% (cit.¹⁵).

3.1. Biotransformace xanthohumolu

Ačkoliv se flavonoidy hojně vyskytují v přírodě, o jejich metabolismu v živočišných organismech toho víme málo. Primárně se flavonoidy biotransformují játry a střevní mikroflórou. Pomocí glukuronidace (na volnou OH skupinu flavonoidu se naváže kyselina glukuronová) se vylučují např. kvercetin, rutin, genistein a kempferol, avšak o biotransformacích prenylovaných flavonoidů víme jen málo. Glukuronidace je hlavní metabolická cesta 2. fáze detoxifikačních procesů většiny xenobiotik, včetně flavonoidů a je katalyzována enzymem UDP-glukuronosyl transferasou, která je součástí membrány endoplazmatického retikula buněk jaterních mikrosomů. Výzkum se zaměřil na glukuronidy XN z potkaních a lidských jater. Metodou HPLC byly nalezeny dva hlavní glukuronidy XN. V glukuronidu G1 se navázala kyselina glukuronová na XN přes hydroxylovou skupinu jádra A a v glukuronidu G2 se navázala kyselina glukuronová na XN přes hydroxylovou skupinu jádra B (cit.¹⁹). V další studii se výzkum zaměřil na metabolismus XN potkaními jaterními mikrosomy a odhalil, že je XN odbouráván na 3 polární metabolity. Dva byly identifikovány jako hydroxylované isopropylidihydrofurano deriváty XN a třetí jako 2- nebo 3-hydroxyxanthohumol (cit.²⁰). Odbourávání XN kvasinkou *Pichia membranifaciens* vedlo ke třem metabolitům, vznikl (*E*)-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofurano[2'',3'' : 4',3']-2',4-dihydroxy-6'-methoxychalkon, dále pak (2*S*)-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofurano[2'',3'' : 7,8]-4'-hydroxy-5-methoxyflavanon a (*E*)-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofurano[2'',3'' : 2',3']-4'-hydroxy-6'-methoxychalkon. Odbourávání probíhá tak, že nejprve vzniká z prenylové skupiny epoxid mezi 2. a 3. uhlíkem prenylu, posléze probíhá nukleofilní cyklizace za vzniku dvou chalkonů jako produktů²¹.

4. Vliv prenylflavonoidů na lidské zdraví

Preparát obsahující jako účinné látky XN a humulon byl v USA patentován jako léčebný prostředek na osteoporózu^{22,23}. Dále u něj byla prokázána vysoká antioxidační aktivita při inhibici mědi katalyzované oxidace LDL (nizkodenzitní lipoprotein), která hraje roli při vzniku aterosklerózy a může vést k cévním chorobám, infarktu myokardu, arterioskleróze či mrtvici²⁴⁻²⁶. XN a xanthohumol B inhibují enzym diacylglycerolacyltransferasu (DGAT) [EC 2.3.1.20], která přeměňuje diacylglycerol na triacylglycerol, a tím chrání opět proti ateroskleróze. Vyšší hladiny triacylglycerolů v určitých orgánech a tkáních těla zvyšují

riziko obezity, ztučnění jater (steatózy) a hypertriglyceridemie vedoucí k vážným chorobám jako např. ateroskleróze, cukrovce, metabolickému zvratu a snížení funkčnosti některého orgánu²⁷. Tyto a jiné vlastnosti řadí XN, IX a ostatní prenylflavonoidy chmele spíše mezi polyfenoly, neboť antioxidační kapacita je přímo spjata s počtem hydroxylových skupin.

IX, který se nachází v pivu, má prokázané antikarcinogenní účinky. Při blokování škodlivě působících enzymů je dokonce účinnější než XN (cit.²⁸).

XN a některé chmelové prenylflavonoidy mohou inhibovat enzymy cytochromu P-450, které přeměňují prokarcinogeny v karcinogenní sloučeniny. Poznatky naznačují, že tyto chmelové prenylflavonoidy mohou být efektivními protinádorovými léčivy, které blokují cytochromem P-450 zprostředkovanou aktivaci prokarcinogenů a indukují karcinogen-detoxifikační enzym chinonreduktasu²⁹. Studie ukazují, že XN, xanthohumol C a IX mají efektivní protinádorové účinky na buňky lidského karcinomu prsu (MCF-7), tlustého střeva (HT-29) a vaječníků (A-2780) v dávkách od 0,1 do 100 μM (cit.³⁰).

Chmel je vedle sóji a jetele jedním z nejbohatších přírodních zdrojů fytoestrogenů. Zvláště zajímavé jsou fytoestrogenní vlastnosti prenylflavonoidů. Estrogenní aktivita prenylovaných flavonoidů je dobře známa, dříve se myslelo, že ji způsobuje XN, někdy také pro tuto vlastnost nazývaný chmelový hormon, avšak z novějších poznatků vyplývá, že samotný XN nemá žádnou estrogenní aktivitu. Estrogenní vlastnosti byly však prokázány u IX a 8-prenylnaringeninů a u několika dalších prenylovaných flavanonů. 8-Prenylnaringenin patří mezi nejsilnější rostlinné estrogény neboli fytoestrogény vůbec. Ve chmelu jsou tyto látky obsaženy pouze v nepatrném množství, v hotovém pivu se tak nalézají ve stopovém množství a jejich obsah se pohybuje od 0,4 do 4,0 mg.l⁻¹ (cit.³¹⁻³³).

V dnešní době se můžeme setkat i na našem trhu s řadou přírodních preparátů obsahujících flavonoidy sóji, isoflavony, které údajně snižují riziko výskytu různých typů rakoviny a mají i příznivý vliv proti kornatění srdečních tepen. Pomáhají údajně i při klimakterických potížích, při poruchách menstruace, při depresích, zvýšené únavě, bolestech hlavy, migrénách, závratích, nespavosti apod. Podobné účinky se předpokládají i u některých chmelových flavonoidů, zvláště u těch s fytoestrogenní aktivitou.

5. Bilance xanthohumolu během výroby piva

Prenylflavonoidy chmele se dostávají do piva během chmelovaru nebo druhotného chmelení. Stevens a spol. provedli několik pokusných chmelení. Jestliže se chmelilo jednou dávkou na začátku chmelovaru (172 g na 12° pivo) byla účinnost extrakce XN horkou vodou asi 87 rel.% Z množství XN, který přešel do mladiny chmelovarem, bylo asi 18 rel.% navázáno na zkoagulované bílkoviny a asi 12 rel.% se ztratilo v horkých kalech. V odpadním chmelu zůstalo asi 13 rel.% Další ztráty vznikaly během chlazení kalů (6 %) a fermentace (11 %). Pouze asi

30 rel.% se nalézalo v hotovém pivo, 98 % bylo však ve formě IX. Celková ztráta XN byla kolem 60 rel.% + 13 rel.% ztráty extrakcí. Stabilizace piva polyvinylpyrrolidonem (PVPP) snížila obsah IX asi o 30 rel.% Jestliže se chmelilo na dvě dávky, na začátku chmelovaru 128 g a na konci 137 g, celkem tedy 265 g na 12° pivo, pak bylo ztraceno v odpadním chmelu a horkých kalech asi 40 rel.% Pouze asi 22 rel.% se nalézalo v hotovém pivo. Celková ztráta byla asi 64 rel.% + 14 rel.% ztráty extrakcí. Konečný obsah IX v lahvových pivech světových značek se proto pohybuje od 0,4 do 4,0 mg.l⁻¹, obvykle okolo 1,5 mg.l⁻¹ (cit.^{12,16}).

Forster zkoumal, jaké množství přidaného XN zůstane v hotovém pivo. Z počáteční dávky 5 mg XN do 1 litru sladiny zbylo na konci 35 min dlouhého chmelovaru v mladině 0,4 mg XN a 1,5 mg IX, celkem byla suma látek 1,9 mg, což je 38 rel.% Na konci kvašení byla suma obou látek už jen 30 rel.% A po konečné filtraci a stabilizaci jen 15 rel.% (cit.³⁴).

6. Závěr

XN, IX a ostatní prenylflavonoidy chmele jsou pozoruhodné sloučeniny, které teprve nyní nacházejí využití jak v pivovarském průmyslu, tak i v řadě jiných odvětví. XN může sloužit jako přírodní antioxidant a jako látka prospěšná lidskému zdraví nejen v pivo, ale i v nových typech léčiv a potravinových doplňcích. Je to látka, která zvyšuje trvanlivost piva i jeho užitnou hodnotu. Vzrůstající počet zpráv o využití těchto látek k léčbě řady nádorů a civilizačních nemocí nabízí využití v chemoprevenci těchto chorob. Už nyní se XN používá k léčbě osteoporózy a v budoucnu se jeho aplikace jistě rozšíří. V Německu se vážně zabývají využitím zbytku po extrakci CO₂, který obsahuje velké množství prenylflavonoidů, a přidávají ho do piva za účelem zlepšení trvanlivosti, hořkosti a užitné hodnoty piva³⁵. Potenciál prenylovaných flavonoidů je obrovský, v blízké budoucnosti si tyto látky mohou najít uplatnění i v oborech, kde bychom je vůbec nečekali.

LITERATURA

- Seyfferth: Ztschr. f. d. ges. Brauwesen 6, 31 (1892).
- Power F., Tutin F., Rogerson H.: J. Chem. Soc., 1267 (1913).
- Verzele M., Stockx J., Fontijn F., Anteonis M.: Bull. Soc. Chim. Belg. 66, 452 (1957).
- De Keukelaire D.: Pharm. Pharmacol. Lett. 7, 83 (1997).
- Piendl A., Biendl M.: Brauwelt Int. 4, 310 (2000).
- Čepička J., Karabín M.: Chem. Listy 96, 90 (2002).
- Hofta P.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha, Praha 2002.
- Stevens J. F.: Phytochem. 53, 759 (2000).
- Rice-Evans C.: Free Radical Biol. Med. 20, 933 (1996).
- Rice-Evans C. A., Miller N.J., Paganga G.: Trends Plant Sci. 2, 152 (1997).
- Stevens J. F.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 56, 136 (1998).
- Stevens J. F.: J. Agric. Food Chem. 47, 2421 (1999).
- Biendl M.: Cerveza Malta 38, 25 (2001).
- Hansel R., Schulz J.: Deutsche Apoth. Ztg. 126, 2033 (1986).
- Forster A., Beck B.: Monatsschr. Brauwiss., 5/6, 98 (2002).
- Forster A., Gahr A.: Monatsschr. Brauwiss. 9/10, 184 (2002).
- Krofta K.: Kvas. Prum. 49, 62 (2003).
- Rausch H.: Xanthohumol Certificate of Analysis, Phytochem, Ichenhausen 2001.
- Yilmazer M., Stevens J. F., Buhler D. R.: FEBS Lett. 491, 252 (2001).
- Yilmazer M.: Drug Met. And Disp. 29, 223 (2001).
- Stettner G., Methner F.-J., Biendl M.: *29th International Congress of the European Brewery Convention, Dublin, 17. - 22.5. 2003*, Poster č. 4. Dublin 2003.
- Tobe H.: Biosci. Biotech. Biochem. 59, 740 (1997).
- US Patent and Trademark Office, US 5 679 716, (1997).
- Miranda C. L.: J. Agric. Food Chem. 48, 3876 (2000).
- Mosinger B.: Cor Vasa 36, 171 (1994).
- Biendl M.: Brauwelt I, 39 (2002).
- Tabata N.: Phytochem. 46, 683 (1997).
- Vinson J. A.: J. Agric. Food Chem. 47, 2502 (1999).
- Henderson M.: Xenobiotica 30, 235 (2000).
- Miranda C. L.: Food Chem. Toxicol. 37, 271 (1999).
- De Keukelaire D.: *EBC Proceedings of the 26th Congress*, 29, str. 239, Maastricht 1997.
- De Keukelaire D.: *EBC Proceedings of the 28th Congress*, 7, str. 82, Budapest 2001.
- Stevens J. F., Taylor A. W., Deinzer M. L.: J. Chromatogr., A 832, 97 (1999).
- Forster A., Beck B., Schmidt R.: Hopfenrdsch. Int. 69 (1999).
- Herath W. H. M. W.: Phytochem. 62, 673 (2003).

P. Hofta, P. Dostálek, and G. Basařová (Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague): **Xanthohumol - a Hop Resin or Hop Polyphenol ?**

The existing and new findings on xanthohumol and other prenylated hop flavonoids are reviewed. First, synthesis of flavonoids and prenylated flavonoids in plants is described. The contents of major prenylflavonoids in hops in general and the xanthohumol contents in Czech cultivars in the last year are listed. Formulae of all the known hop prenylflavonoids and their chemical, physical and biochemical properties are given. Their effect on human health and their current and potential future utilization are discussed. Biotransformations of xanthohumol in microorganisms, mammals and humans are also mentioned. The balance of xanthohumol and isoxanthohumol in the production of beer is given.

POLAROGRAFIE A MEDICÍNA (očima internetového vyhledávače MEDLINE v údobí od roku 1997)

ROBERT KALVODA

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, AV ČR, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
Kalvoda@jh-inst. cas. cz

Došlo 1.7.03, přijato 10.12.03.

Klíčová slova : polarografie, voltametrie, medicína

Polarografie nalezla záhy po svém zavedení do praxe značného uplatnění i v lékařských vědách, včetně farmacie – o tom svědčí ostatně i obsáhlá monografie M. Březiny a P. Zumana *Polarografie v lékařství, biochemii a farmacii* (vydalo SZN Praha, 1952), přeložená posléze do angličtiny, němčiny a ruštiny. Toto obsáhlé dílo zůstává bezpochyby stále vynikajícím zdrojem informací pro použití polarografie ve jmenovaných oborech, případně může být inspirací pro modifikaci starých, či výzkum nových analytických metod pro soudobý výzkum a praxi, realizovaný současným přístrojovým parkem.

Současný stav využití polarografie v různých oblastech medicíny (i farmacie) byl proveden studiem stavu publikací za posledních 5 let pomocí vyhledávače MEDLINE zadáním hesla POLAROGRAPHY a hesla charakterizujícího příslušnou oblast medicíny.

Tímto způsobem bylo zaznamenáno přes 500 prací (z toho zhruba třetina přísluší léčivům). Nutno ovšem respektovat několik překryvů a naopak též určité časové prodlení při zařazování publikovaných prací do MEDLINu, jakož i fakt, že hesla POLAROGRAPHY v těchto pracích nerespektují důsledně názvosloví IUPAC definující termín polarografie a termín voltametrie. Jestliže bylo nastaveno heslo POLAROGRAHY OR VOLTAMMETRY, tak bylo zaznamenáno za posledních pět let téměř 2000 prací – největší rozdíl mezi počtem prací pod heslem POLAROGRAPHY a druhým sdruženým heslem bylo ve skupinách DRUGS, DNA, PHARMACY, PHYSIOLOGY a hlavně IN VIVO MEASUREMENTS, kde byl nárůst osminásobný.

Pozoruhodným poznatkem je fakt, že využití polarografie/voltametrie v lékařských vědách se rozšiřuje z pole pouhého analytického stanovení léčiv a fyziologicky významných sloučenin na metody sloužící v různých *ex vivo* a *in vivo* aplikacích, jako např. při chorobách kardiovaskulárních a onkologických. Nelze ovšem podcenit ani rozsáhlé aplikace *in vivo* v oblasti neurologické či neurochemické (viz např.^{1,2}, případně pro základní informace³) a metody diagnostické, z nichž nutno uvést snahy vytvořit specificky citlivé elektrochemické DNA-senzory (např.⁴)

založené na využití hybridizačních postupů. Při zatím předběžných laboratorních pokusech se jedná o diagnostiku některých chorob způsobených bakteriemi (např. TBC) nebo viry (např. HIV, hepatitis B). Mnoho prací je též věnováno studiu a indikaci poškození DNA toxickými látkami za účelem environmentálního monitoringu.

V oblasti kardiovaskulárních chorob se často jedná o polarografické sledování průběhu uvolňování oxidu dusnatého z léčiv např. nitroglycerinu⁵, který se zúčastňuje enzymatických reakcí vedoucích k tvorbě guanosinmonofosfátu působícího vasodilatačně. Ke stanovení „molekuly století“, jak je NO často nazýván, se nejčastěji používá uhlíkové vláknové mikroelektrody modifikované porfyrinem a Nafionem. Oxid dusnatý se na této elektrodě oxiduje při +550 mV (Ag/AgCl), zatím co při druhém píku při +700 mV se oxiduje dusitanový anion⁶. (Standard se připravuje z nasyceného roztoku 2mM-NO ve vodě). Vzhledem k tomu, že se NO snadno oxiduje vzduchem (a pík NO ale i NO₂⁻ se rychle s časem snižuje), je při některých měřeních *ex vivo* dávana přednost amperometrickému měření při +550 mV. Toto amperometrické měření bylo autory aplikováno na měření NO vznikajícího enzymatickou reakcí z L-argininu v endotelových buňkách řezů krysí aorty a sledování jeho inhibice adrenalinem doprovázené stahem tkáně a zpětné relaxace oxidem dusnatým. Stanovení NO se také provádí⁷ ve speciální plynotěsné komůrce pomocí jeho reakce s O₂ na nitrit, jehož množství se určí polarograficky poklesem koncentrace kyslíku. Metodu citování autoři používají pro stanovení v zásobních roztocích NO, v suspenzích endotelových buněk apod. Obdobné aplikace polarografie na stanovení NO v souvislosti s nitrovasodiláčními léčivy jsou značně hojné. Dále se sluší uvést studium enzymů⁴⁻⁸ konvertujících angiotenzin I na angiotenzin II, způsobující zúžení cév, studium mitochondriální respirační funkce při ischemické chorobě, zjišťování vlivu vybraných látek (např. i koenzymu Q 10) na protektivní účinek při ischemických chorobách^{5,9}, atd.

V onkologii se často jedná o tzv. polarografické měření *in vivo* parciálního tlaku kyslíku v tumorech: snížená dodávka kyslíku tkáním – hypoxie totiž znamená sníženou citlivost či vůbec necitlivost na léčbu ozařováním či chemoterapeutiky, (a tudíž volbu jiného způsobu léčby). Parciálním tlakem kyslíku je také ovlivněna volba dávky radiačního záření. K měření parciálního tlaku se mimo jiné používá také polarografické metody, nazývané eppendorfovou histografií (Kimoc 6650, Sigma pO₂ – Histogram, fy Eppendorf, Hamburk-Eppendorf, Německo) (viz např.^{10,11}). Při této metodě se používá tzv. eppendorfské jehly, což je do jisté míry obdoba Clarkova čidla na kyslík ovšem v úpravě, aby se celé čidlo vměstnalo do trubičky průměru kolem 5 až 50 mikrometrů. Tato jehla se vpichuje buď přímo do podkožních tumorů, nebo zavádí pomocí trokaru. Hloubka vpichů a jejich poloha se kontroluje

počítačem, který ovládá mikromanipulátor posunující jehlu všemi směry (za sonografické kontroly) tak, aby se získalo co nejvíce měrných bodů (v centrální části tumoru byla naměřena nižší tenze kyslíku než v periferních oblastech). Naměřené hodnoty pO_2 v tumorech se pohybují v rozmezí od 5 torr a méně (u hypoxidických karcinomů) až do hodnot kolem 25 až 50 torr. Normální tkáň jeví pO_2 kolem 60 torr, jak před, tak i po ozáření¹¹. Práce¹² se zabývá mechanismy, které vedou k shora zmíněné resistenci na léčbu hypoxidických tumorů ozářováním či chemoterapeutiky a uvažuje o postupech, které by mohly tuto nežádoucí odolnost eliminovat. Tak např. lepší vyhlídky na radioterapii a chemoterapii přineslo okysličení tumorů elektrostimulací¹³. Předběžné studie nasvědčují, že v některých případech po ozáření hypoxidického tumoru došlo k reoxidaci, např. z hodnoty pO_2 3,2 torr na 6,5 torr¹⁴. V některých případech byly tyto změny i podstatně větší, viz např.¹⁵. Je usuzováno, že tato reoxidace by v některých případech rakovinných onemocnění mohla mít určitý prognostický význam pro její terapii, některé práce ale uvádějí, že histografická metoda není vždy dostatečně selektivním testem pro volbu léčby¹⁶.

V souvislosti se zmíněným měřením parciálního tlaku kyslíku lze upozornit na konstrukci Clarkova mikročidla o povrchu pracovní elektrody menším než 0,01 mm² (cit.¹⁷), používaného k měření spotřeby kyslíku kuřecího embrya pro toxikologické účely. Aby se získalo více měrných bodů, bylo čidlo rozděleno na sedm symetricky umístěných měrných elektrodových polí na ploše o průměru 0,05 mm. Toto čidlo by bylo jistě vhodné i pro zmíněné onkologické aplikace. Z dalších onkologických aplikací polarografie či voltametrie lze ještě zmínit zjišťování protirakovinové aktivity měřením ribonukleotidové reduktasy, studium karcinogenní aktivity chemických látek, studium zhášení hydroxylových radikálů, narušení řetězce DNA, interakce DNA chemickými sloučeninami případně kancerostatiky a jejich metabolity, atd.

Lékařskými aplikacemi často prolíná problematika metabolismu kyslíku – ať již jde o mitochondriální respirační řetězec¹⁸, enzymy dýchacího řetězce a jeho poruchy, inhibitory oxidasy, v neurochemii, efekt různých látek na respiraci a aktivitu enzymů při přenosu elektronu. Dále se jedná o sledování rychlosti oxidativní fosforylace – o poměr ADP/O_2 , detekci respiračních efektů v buněčných kulturách¹⁹, měření různých interferencí a inhibicí léčiv. Zde budiž znovu poukázáno na rozsáhlé využití polarografie při stanovení léčiv v různých matricích (např. v tělních tekutinách).

V rámci sledování významu polarografie v lékařských vědách by ovšem také neměl být opomenut význam polarografie v environmentální analýze.

Popsanými aplikacemi zdaleka nekončí využití elektrochemických metod v lékařských vědách, jak se lze přesvědčit např. nastavením vhodných hesel na internetových vyhledávacích.

LITERATURA

1. Boulton A. A., Baker G. B., Adams R. N.: *Voltammetric Methods in Brain Systems*. Hermana Press, USA 1999.
2. Troyer K. P., Heien M. L. A. V., Venton B. J., Wightman R. M.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 696 (2002).
3. Wightman R. M., v knize: *Electrochemistry in Research and Development* (Kalvoda R. a Parsons R., eds), str.189. Plenum Press, New York 1985.
4. Jelen F., Yosypchuk B., Kouřilová A., Novotný L., Paleček E.: *Anal. Chem.* 74, 4788 (2002).
5. Pataritza J., Penke B., Balogh G. E., Papp J. G.: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 39, 91 (1998).
6. Crespi F., Campagnola M., Neudeck A., McMillan K., Rossetti Z., Pastorino A., Garbin U., Fratta-Pasini A., Reggiani A., Gaviraghi G., Cominacini L.: *J. Neurosci. Methods* 109, 59 (2001).
7. Jensen B. O., Skeidsvoll J., Holmsen H.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 35, 185 (1997).
8. Belai F., Al-Zaagi I.-A., Abounassif M. A.: *J. AOAC Int.* 84, 1 (2001).
9. Crestanello J. A., Doliba N. M., Babsky A. M., Niborri K., Osbakken M. D., Whitman G. Jr.: *J. Surg. Res.* 102, 221 (2002).
10. Seddon B. M., Honess D. J., Vojnovic B., Tozer G. M., Workman P.: *Radiat. Res.* 155, 837 (2001).
11. Doll C. M., Milosevic M., Pintilie M., Hill R. P., Fylesa A. W.: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 55, 1239 (2003).
12. Shannon A. M., Bouchier-Hayes D. J., Condron C. M., Toomey D.: *Cancer Treatment Rev.*, v tisku.
13. Lavo B., Robaina F., Morera J., Ruiz-Egea E., Pérez J. L., Macias D., Caramés M. A., Catalá L., Hernández M. A., Günderoth M.: *J. Neurosurg.* 96,94 (2002).
14. Dietz A., Vanselow B., Rudat V., Conradt Ch., Weindauer H., Kallinovski F., Dollner R.: *Head and Neck* 25, 50 (2003).
15. Cooper R. A., West C. M., Logue J. P., Davidson S. E., Miller A., Roberts S., Statford I. J., Honess D. J., Hunter R. D.: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 45 (1),119 (1999).
16. Rudat V., Stadler P., Becker A., Vanselow B., Dietz A., Wannemacher M., Molls M., Dunst J., Feldmann H. J.: *Strahlentherapie und Onkologie* 177, 462 (2001).
17. Šerák L., Jelínek R., Hauser V.: *J. Electroanal. Chem.* 226, 193 (1987).
18. Blanche S., Tardieu M., Rustin P., Slama A., Barret B.: *Lancet* 354 (9184), 1084 (1999).
19. Scott A. E., Cosma G. N., Frank A. A., Wells R. L., Gardner H. S.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 171, 149 (2001).

R. Kalvoda (*J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8*): **Polarography and Medicine (from the Viewpoint of the MEDLINE Internet Searcher)**

In studying publications mentioning the utilization of polarography/voltammetry in various branches of medicine or pharmacy in the last five years (ca. 2000), it was found that a certain focus of their applications is in cardiovascular and oncological disciplines. In the former field, it is particularly the release of nitrogen oxide in studies of the vasodilation effect of drugs. In oncology, the oxygen partial pressure in tumours is measured voltammetrically *in vivo*.

Bioinformatics
Methods Technology Software



Vážená paní, vážený pane,
dovolujeme si Vás pozvat na seminář

BIOINFORMATIKA II

Metody, Technologie a Software

Datum konání: 13. 10. 2004, 13.00–18.00 h

Místo: Pavilon E – Press Centrum – brněnské výstaviště

Jednací jazyk: angličtina

Plenární přednáška: Dr. Janusz Bujnicki, IIMB, Polsko

„*Předpověď struktury proteinů rozpoznáváním proteinových foldů a kompletací fragmentů*“

Okruhy témat: biologické, chemické a lékařské databáze – genomika – proteomika
– fylogenetická analýza – počítačové modelování – strukturní bioinformatika

Pro více informací a potvrzení účasti: Jiří Damborský, Loschmidt prof., Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 602 00 Brno, tel.: 541 129 377

<http://ncbr.chemi.muni.cz/bioinf>

ANALYTICKÉ METODY STUDIA CYTOKININŮ

PETR TARKOWSKI, KAREL DOLEŽAL
a MIROSLAV STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého
a Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 11,
783 71 Olomouc
tarkowsp@aix.upol.cz

Došlo 18.7.03, přepracováno 9.1.04, přijato 18.3.04.

Klíčová slova: cytokininy, imunochemické metody, kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, biotest

Obsah

1. Úvod
2. Extrakce a čištění
3. Biotesty
4. HPLC
5. HPLC/MS
6. GC/MS
7. Imunochemické metody
8. Ostatní metody
9. Závěr

1. Úvod

Cytokininy (CK) tvoří jednu z pěti hlavních skupin rostlinných hormonů (fytohormonů). Fytohormony regulují růstové a vývojové procesy rostlin. Cytokininy byly definovány jako látky, které v přítomnosti auxinu (rovněž fytohormon) stimulují buněčné dělení^{1,2}. Mezi hlavní fyziologické účinky CK patří potlačování apikální dominance, indukce regenerace orgánů, zpomalení stárnutí, udržování vysoké metabolické aktivity rostlinných pletiv a další³.

Podle chemické struktury je můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: *a*) deriváty adeninu, *b*) deriváty močoviny a thiomčoviny. Tento článek je věnován přirozeně se vyskytujícím cytokininům adeninového typu. Do této skupiny spadají dvě základní podskupiny, jež jsou podle charakteru postranního řetězce označovány jako isoprenoidní a aromatické. Uvnitř těchto podskupin pak můžeme nalézt různé deriváty (metabolity) volných bází, ribosidů a nukleotidů, až po *N*-glukosidy, případně *O*-glukosidy a konjugáty s aminokyselinami. Strukturální odlišnost těchto metabolitů má za následek jejich různou biologickou aktivitu. Konkrétně cytokininové nukleotidy jsou považovány za prekurzory transportních forem (ribosidů) a vlastních aktivních CK (volných bází). Naproti tomu cytokininové

glukosidy jsou produkty deaktivčních metabolických drah. Volné báze a ribosidy vykazují vysokou biologickou aktivitu. Ostatní deriváty jsou buď zcela neúčinné (*N*-glukosidy) nebo dočasně neúčinné (*O*-glukosidy). Strukturální vzorce nejdůležitějších derivátů cytokininů jsou shrnuty v tabulce I.

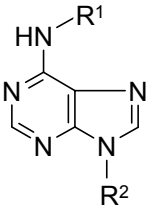
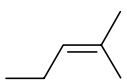
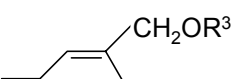
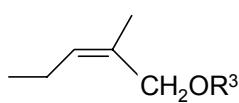
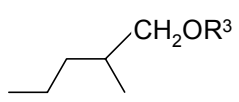
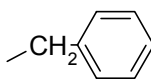
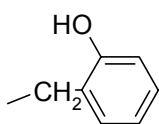
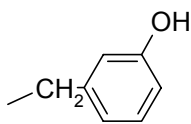
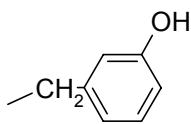
Rostlinné pletivo obsahuje vícesložkovou směs metabolitů, jež se vyskytují i v řádově odlišných hladinách. CK se v rostlinách, až na několik málo výjimek, vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (fmol–pmol.g⁻¹ čerstvé hmoty). Obtíže spojené s analýzou CK v rostlinném extraktu jsou tedy značné zejména vzhledem k tomu, že je nutné odlišit studovanou látku od neobvykle velkého počtu nečistot. Vhodná analytická metoda pro studium CK v rostlinách proto vyžaduje spojení efektivního čistícího postupu a citlivé a dostatečně selektivní analytické koncovky. Požadavky kladené na analytickou metodu se pochopitelně dále liší podle momentálních potřeb biologů, druhu použitého pletiva či orgánu, metody studia a podle problémových otázek, které je třeba zodpovědět. Např. bude-li zapotřebí provést screening obsahu široké škály CK u několika kultivarů modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* L., kde není k dispozici dostatečné množství výchozího rostlinného materiálu, měla by zvolená metoda být vysoce selektivní a výjimečně citlivá. Naopak půjde-li o pouhé sledování úbytku (spotřeby) jednoho syntetického cytokininu přidaného do kultivačního média, postačí metoda přiměřeně selektivní s průměrnou citlivostí. V druhém případě bude možno rovněž zjednodušit čistící postup, což v praxi znamená úsporu materiálu i času. S nástupem citlivých kombinovaných technik (HPLC/MS, GC/MS) narůstají možnosti studovat CK nejen na úrovni celé rostliny a jejích orgánů (listy, kořen, květ), ale i na úrovni nižších organizačních struktur (pletiva, buňky). Analytikovi je přitom kladena otázka, jaké nejmenší množství výchozího materiálu je ke spolehlivé identifikaci nebo stanovení postačující. Tam, kde bylo dříve při použití imunoanalytických nebo GC/MS technik zapotřebí jednotek až desítek gramů čerstvé hmoty, postačí při použití HPLC/MS několik set miligramů až gram.

V následujících odstavcích jsou shrnuty a porovnány všechny obecně používané analytické metody studia CK, a to podle jednotlivých analytických parametrů (citlivost, selektivita, časová a finanční náročnost, robustnost metody, možnost automatizace), pokud jsou v původních pracích tyto parametry uvedeny.

2. Extrakce a čištění

Úlohou extrakčních procesů je převedení látek, jež jsou předmětem našeho zájmu, do extrakčního činidla tak, aby v jejich průběhu nedošlo k degradaci látek (enzymatické, tepelné, světlem indukované, oxidativní)

Tabulka I
Strukturní vzorce, názvy a zkratky některých cytokininů

	R ¹	R ²	R ³	Název	Zkratka
		H	–	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin	iP
		R	–	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladeninribosid	iPR
		G	–	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin-9-glukosid	iP9G
		RP	–	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin-5'-monofosfát	iPMP
		H	H	<i>trans</i> -zeatin	<i>tZ</i>
		R	H	<i>trans</i> -zeatin ribosid	<i>tZR</i>
		H	G	<i>trans</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid	<i>tZOG</i>
		R	G	<i>trans</i> -zeatinribosid- <i>O</i> -glukosid	<i>tZROG</i>
		RP	H	<i>trans</i> -zeatinribosid-5'-monofosfát	<i>tZMP</i>
		H	H	<i>cis</i> -zeatin	<i>cZ</i>
		R	H	<i>cis</i> -zeatinribosid	<i>cZR</i>
		H	G	<i>cis</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid	<i>cZOG</i>
		R	G	<i>cis</i> -zeatinribosid- <i>O</i> -glukosid	<i>cZROG</i>
		RP	H	<i>cis</i> -zeatinribosid-5'-monofosfát	<i>cZMP</i>
		H	H	dihydrozeatin	DHZ
		R	H	dihydrozeatinribosid	DHZR
		RP	H	dihydrozeatinribosid-5'-monofosfát	DHZMP
		H	G	dihydrozeatin- <i>O</i> -glukosid	DHZOG
		R	G	dihydrozeatinribosid- <i>O</i> -glukosid	DHZROG
		H	–	<i>N</i> ⁶ -(benzylamino)purin	BAP
		R	–	<i>N</i> ⁶ -(benzylamino)purinribosid	BAPR
		G	–	<i>N</i> ⁶ -(benzylamino)purin-9-glukosid	BAP9G
		H	–	<i>o</i> -topolin	<i>oT</i>
		R	–	<i>o</i> -topolinribosid	<i>oTR</i>
		G	–	<i>o</i> -topolin-9-glukosid	<i>oT9G</i>
		H	–	<i>m</i> -topolin	<i>mT</i>
		R	–	<i>m</i> -topolin ribosid	<i>mTR</i>
		G	–	<i>m</i> -topolin-9-glukosid	<i>mT9G</i>

H – vodík; R – β-D-ribofuranosyl; G – β-D-glukopyranosyl; RP – β-D-ribofuranosyl-5'-monofosfát

a aby byl extrakční výtěžek přijatelně vysoký pro požadované spektrum metabolitů – cytokininové nukleotidy, volné báze, ribosidy, *N*-glukosidy a *O*-glukosidy. Z těchto důvodů jsou obvykle pro extrakci volena rozpouštědla jako methanol, ethanol a aceton či vícesložkové extrakční soustavy, mezi nimiž má výsadní postavení extrakční směs podle Bieleeského⁴. Jedná se o směs methanol-chloroform-kyselina mravenčí-voda (12:3:1:4, v/v). Její složení bylo optimalizováno s ohledem na extrakční účinnost a schopnost inaktivovat rostlinné fosfatasy⁵ (enzymy zodpovědné za vznik ribosidů odštěpením fosfátů z molekul cytokininových nukleotidů). Při použití HPLC/MS či GC/MS je možné působení fosfatas monitorovat za pomoci interních standardů, které jsou označeny různým počtem ²H a ¹⁵N atomů v molekule⁶. Preventivním opatřením proti degradaci CK je extrakce za snížené teploty, obvykle v rozmezí 4 °C až –20 °C (podle obsahu vodné složky v extrakčním činidle). Běžná doba účinné extrakce se podle druhu extrakce a rostlinného pletiva pohybuje mezi 4 až 24 hodinami.

Po extrakci a odstranění tuhých podílů centrifugací či filtrací následuje čistící proces. Podle typu analytické koncovky jsou na čištění kladeny různé nároky. Všechny tyto procesy však spojuje několik základních požadavků. Přechištění musí v první řadě rozdělit celé spektrum cytokininových metabolitů do podskupin – minimálně do 3 frakcí: nukleotidové, báze (volné báze, ribosidy, *N*-glukosidy) a *O*-glukosidové, pro něž (všechny společně) neexistuje univerzální analytická koncovka. Dále musí poskytnout dostatečný stupeň přechištění, přičemž by měla být zachována uspokojivá návratnost analytů. To znamená, že jednotlivé stupně by měly eliminovat z původního rostlinného extraktu všechny ostatní látky (sekundární metabolity, cukry, peptidy, aminokyseliny apod.). Přechištěný biologický materiál by pak obsahoval jen CK, případně látky, které následnou kvalitativní či kvantitativní analýzu neruší. Navíc by ideální metoda měla být natolik robustní, aby se odlišný metabolický profil rostlinného extraktu neodrážel v proměnlivé návratnosti. Toto je důležité např. při studiu CK v různých rostlinách či odběru stejného vzorku pletiva v jednotlivých vývojových stádiích rostliny. Běžné čistící postupy bývají sestaveny z několika stupňů, mezi nimiž je nutno provést zahuštění vzorku (na rotační vakuové odparce, odpařováním v proudu dusíku nebo lyofilizací) a převedení do roztoku jiného složení. Nejčastěji jde o kombinaci extrakce tuhou fází (SPE) s iontově výměnnou a imunoafinitní chromatografií (IEC, IAC, cit.⁴). Málkové metody koncové analýzy (RIA, ELISA, GC/MS, HPLC/MS) jsou schopny pracovat s intaktními nukleotidy a *O*-glukosidy. Proto je často nezbytné přeměnit nukleotidy na ribosidy alkalickou fosfatasou a *O*-glukosidy pak na odpovídající ribosidy či volné báze β-glukosidasou. Tak získáme nukleotidovou (NT) a *O*-glukosidovou frakci (OG), která obsahuje příslušné volné báze a ribosidy. Imunoafinitní chromatografie bývá často posledním čistícím stupněm. Protože imunoafinitní chromatografie je velmi významná čistící technika zejména pro svou vysokou selektivitu, je této problematice věnována zvláštní pozornost (viz kapitola 6).

Levnou, rychlou a účinnou alternativou je užití extrakce kapalina-kapalina⁷. Metoda je založena na rozdílné rozpustnosti CK ve vodě a butanolu při různém pH. Umožňuje oddělení balastních látek a současně frakcionaci bází a nukleotidů, přičemž návratnost je relativně vysoká a stupeň přechištění uspokojivý. Nejnovějším přístupem je však extrakce tuhou fází (SPE) využívající hybridní sorbenty, které mají vlastnosti reverzní fáze a iontoměničce současně⁸. Takto lze výrazně zjednodušit celý čistící postup, neboť jedinou náplňovou kolonkou lze odstranit interferující látky z rostlinného extraktu a současně frakcionovat jednotlivé skupiny cytokininových metabolitů, ale i jiných fytohormonů. Zanedbatelná není ani úspora spotřebního materiálu, rozpouštědel, chemikálií a především času. Kromě použití nových hybridních sorbentů se pro další zkrácení celkové doby analýzy nabízí automatizace zpracování rostlinných extraktů. Tak lze zvýšit množství vzorků zpracovatelných za 24 hodin z pěti až osmi na několik desítek⁹.

3. Biotesty

Jak již bylo řečeno v úvodu, cytokiny ovlivňují celou škálu fyziologických procesů. Biotesty se hodnotí aktivita studovaného chemického individua v konkrétním biologickém procesu. Např. kalusovým biotestem se zjišťuje schopnost cytokininu stimulovat buněčné dělení za přítomnosti stálé koncentrace auxinu; senescenčním biotestem se zjišťuje schopnost cytokininu zpomalit degradaci chlorofylu¹⁰. Takto získané hodnoty jsou poté porovnávány s hodnotami známých vysoce aktivních derivátů (6-(benzylamino)purin, zeatin). Jednotlivé CK vykazují různou aktivitu v různých biotestech. Tyto charakteristiky vypovídají o tom, že i v rámci jedné skupiny rostlinných hormonů mohou různé deriváty ovlivňovat jednotlivé fyziologické procesy odlišným způsobem.

Má-li být otestována biologická aktivita neznámé látky izolované z rostlinného pletiva, je nutné rostlinný extrakt důkladně zahustit a frakcionovat (TLC, HPLC, cit.^{11,12}). Pak je zajištěno, že výsledky získané v biotestu skutečně náleží jediné sloučenině a nikoliv směsi CK. Testování biologické aktivity se uplatňuje jak při vývoji nových látek (např. pro účely zemědělství¹³), tak i při hledání dosud nepopsaných přirozeně se vyskytujících hormonů^{14,15}.

4. HPLC

Stejně jako v jiných oborech (farmakologie, environmentální analýza) byly prvními chromatografickými metodami v analýze fytohormonů tenkovrstvá papírová chromatografie (TLC, PC, cit.¹¹). TLC se používá dodnes jako levná a rychlá alternativa sofistikovanějších instrumentálních metod (HPLC, GC) pro stanovení, která nevyžadují vysokou separační účinnost a vysokou citlivost¹². To platí zejména pro některé metabolické studie, kdy je rostlinám (příp. suspenzním kulturám rostlinných buněk) aplikován syntetický růstový regulátor buď v obrovském nadbytku,

anebo radioaktivně značený¹⁶. HPLC je dnes zřejmě nej-používanější separační technikou v oblasti kvalitativní i kvantitativní analýzy cytokininů. Vedle rychlosti a vysoké separační účinnosti je její velkou výhodou možnost snadného spojení s celou řadou technik finální analýzy: UV-spektrometrie, hmotnostní spektrometrie (MS), imunoanalýza (RIA, ELISA), biotest⁴. Díky tomu je možno kombinovat v jediném experimentu např. data z detektoru diodového pole s výsledky testu ELISA či je doplnit strukturní MS analýzou nebo biologickou aktivitou (biotest) jednotlivých HPLC frakcí. Systém normálních fází je využíván výhradně pro preparativní chromatografii cytokininů derivatizovaných pro GC. Většina autorů pak separuje CK v systému reverzních fází (RP), kde se cytokiny snadno dělí díky rozdílu v polaritě. Bez ohledu na analytickou koncovku jsou na účinnost separace kladeny vysoké nároky. V analyzované směsi mohou být přítomny *cis/trans* izomery zeatinových derivátů a polohové izomery topolinů či 3-, 7- a 9-glukosidy většiny CK. Nedokonalá separace může tedy způsobit nadhodnocení koncentrací při stanovení, nadhodnocení biologické aktivity v biotestu či znemožnit přesnou identifikaci.

5. HPLC/MS

Od počátku devadesátých let bylo spektrum metod používaných k analýze cytokininů rozšířeno o kombinaci kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). Dosud byly publikovány práce o použití různých typů ionizace, počínaje ionizací rychlými atomy (FAB), termosprejem (TSI) či chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) až po ionizaci elektrosprejem (ESI). První tři experimentální ionizační přístupy se zpočátku vyznačovaly nepřilíši vysokou citlivostí. Bylo nutno zpracovávat větší množství biologického materiálu nebo pracovat s transgenním materiálem, u něhož byly molekulárně-biologickými přístupy „indukovány“ vyšší hladiny CK. První práce v této oblasti popisuje užití HPLC/APCI-MS ke stanovení hladiny *tZR* v nádorech rostlin tabáku¹⁷. Hmotnostní spektra volných bází obsahovala jen kvazimolekulární ion a spektra ribosidů obsahovala navíc pouze protonovaný aglykon. Dosažený detekční limit (0,6 pmol pro *tZR*) dovoluje rutinní použití metody pro kvantitativní analýzu rostlinného materiálu s přirozeným obsahem cytokininů. Méně úspěšné bylo použití HPLC/TSI-MS/MS (cit.¹⁸). Hlavním omezením této metody je vysoká citlivost termospreje na změny ve složení mobilní fáze. Bez možnosti gradientové eluce musí být některé metabolity analyzovány odděleně (*ZR*, *DHZR*), což významně prodlužuje celkovou dobu analýzy a zvyšuje potřebné množství výchozího biologického materiálu. Dále byla ke studiu CK použita kapilární HPLC/frit-FAB-MS/MS (cit.¹⁹, frit-FAB, ionizace rychlými atomy na kovové fritě). Přestože obecně řadíme FAB mezi měkké ionizační techniky, hmotnostní spektra celé řady cytokininových metabolitů obsahovala značné množství fragmentů a byla srovnatelná s bohatostí spekter po klasické elektronové ionizaci (EI). Proti ESI-MS jsou FAB-MS/MS spektra, zejména u molekul obsa-

hujících cukerný zbytek, v průměru o jeden až dva fragmenty bohatší. Těto metody bylo s úspěchem použito k identifikaci a stanovení hladin isopentenyladenosinu v jehličí smrku. Detekční limity pro jednotlivé metabolity se pohybují od jednotek po desítky pmol¹⁹. Dále byla publikována metoda HPLC/ESI-MS/MS pro kvantifikaci 16 metabolitů cytokininů, s detekčními limity kolem 1 pmol (cit.²⁰). Její hlavní předností je vysoká propustnost vzorků. Vzhledem ke čtyřminutové době jedné analýzy je možno zpracovat až 150 vzorků za den.

Následující práce stejného kolektivu autorů nabízí přehledné srovnání detekčních limitů a lineárních dynamických rozsahů při použití konvenčních (4,6 mm i.d.), mikro (2 mm, 1 mm i.d.) a kapilárních (0,3 mm i.d.) chromatografických kolon pro HPLC/ESI-MS/MS (cit.²¹). Prezentuje i srovnání chromatografické prekoncentrace analytu na předkolonce nebo přímo na analytické koloně. Tyto přístupy nacházejí uplatnění zejména při práci s biologickými vzorky. Umožňují nástřik relativně velkého objemu vzorku i na kolony menších průměrů (mikrokolony a kapilární kolony) a zakoncentrování analytu na stacionární fázi. Po této prekoncentraci následuje zvýšení eluční síly mobilní fáze a vlastní chromatografická separace na analytické koloně. Autoři uvádějí, že při použití kapilární chromatografické kolony v kombinaci se zkoncentrováním vzorku na předkolonce je možno dosáhnout femtomolárních detekčních limitů. Podobný přístup ke kvantitativní analýze zeatinových, dihydrozeatinových a isopentenyladenosinových derivátů byl nedávno publikován jinou skupinou (mez stanovitelnosti LOD 50–100 fmol, cit.²²).

Všechny výše uvedené metody ESI byly založeny na částečné separaci vzorků na chromatografické koloně a hmotnostní detekci v selektivním modu – sledování produktu rozpadu iontu (multiple reaction monitoring, MRM). Takovýto způsob detekce umožňuje sledovat signál několika charakteristických fragmentací současně. Je tedy možné zjednodušit separaci a ušetřit čas. Komplikace nastávají v okamžiku, kdy je zapotřebí sledovat signál izomerů. Pokud u izomerů dochází ke shodné fragmentaci a vybraný přechod kvazimolekulární ion→fragment pro MRM je stejný (např. *tZR*: 352→220, *cZR*: 352→220), je chromatografická separace nezbytná. Jinak totiž není možno předejít smíšené odezvě izomerů. Další komplikací je přirozený výskyt derivátů dihydrozeatinu. Ty se liší od svých zeatinových analogů pouze o dvě hmotnostní jednotky. Při sledování signálu dihydrozeatinu je tudíž nutné počítat i s příspěvkem zeatinového izotopu M+2 apod. V oblasti analýzy HPLC/MS cytokininů je proto zapotřebí dokonalé chromatografické separace, a to nejen s ohledem na přirozený výskyt izomerů, ale rovněž s ohledem na možnost dokonalějšího odstranění nespecifického (chemického) šumu. Přestože je použito intenzivní předúpravy vzorků, důkladná chromatografická separace může výrazně napomoci získání lepšího signálu v hmotnostním detektoru. Poslední práce popisující použití ESI-MS nabízí možnost použít ke kvantitativní analýze CK hmotnostního detektoru s jedním kvadrupolovým analyzátozem²³.

Proti výše uvedeným technikám MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie) není možno u tohoto typu detektoru použít MRM. Selektivita hmotnostního detektoru je nahrazena úplnou chromatografickou separací. Skutečnost, že kombinací imunoafinitní chromatografie a HPLC/ESI-MS v SIM modu (sledování vybraného iontu, selected ion monitoring) bylo dosaženo dostatečné selektivity, byla prokázána současně provedeným testem HPLC/ELISA. Jde o první metodu analýzy cytokininů, která si všímá obou skupin CK – isoprenoidních i aromatických. Nabízí kvantifikaci devatenácti isoprenoidních CK a sledování přítomnosti dalších deseti aromatických CK.

Nový přístup představuje rovněž předkolumnová derivatizace CK pro metodu HPLC/frit-FAB-MS/MS (cit.⁶). Propionáty (estery) cytokininových nukleosidů a glukosidů a *N*-benzylderiváty volných bází poskytují vyšší signál kvazimolekulárních iontů. To je dáno zvýšením hydrofobního charakteru molekul, nárůstem jejich povrchové aktivity na fritě iontového zdroje a tím účinnější ionizaci. Důležité je rovněž zvýšení molekulové hmotnosti po derivatizaci, které posouvá signál jednotlivých iontů do oblasti o vyšším *m/z*, tedy do oblasti s nižším nespécifickým šumem. Spektra FAB jsou v porovnání se spektry nederivatizovaných molekul bohatší. Uvedená metoda již byla s úspěchem použita ke stanovení endogenních hladin deseti CK v *Arabidopsis thaliana* L. (cit.⁶) a identifikaci nových derivátů aromatických CK v rostlinách^{14,15}. Limity detekce se pohybují ve femtomolární oblasti. Všechny uvedené výhody jsou však vykoupeny vyšší časovou náročností derivatizace. V neposlední řadě umožnila tato metodika i měření rychlosti biosyntézy CK (značení deuteriem *in vivo*)²⁴. V takovém případě jsou rostliny pěstovány v kapalném kultivačním médiu, které obsahuje 30% podíl deuterované vody. Deuterium postupně nahrazuje vodík v nově syntetizovaných molekulách nejruznějšího metabolického původu, tedy i CK. Podle stupně inkorporace deuteria se mění izotopový profil molekul nově syntetizovaných. Metoda umožnila objev alternativní dráhy biosyntézy zeatinových derivátů²⁵.

6. GC/MS

Metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí hrála od počátku nezastupitelnou roli zejména v kvalitativní analýze. Před zavedením HPLC/MS byla jedinou dostupnou identifikační metodou a výrazně usnadnila určení chemické struktury celé řady cytokininových metabolitů (např.^{26,27}). CK nepatří mezi těkavé látky a pro analýzu plynovou chromatografií musí být derivatizovány. Nutnost derivatizovat tyto látky je hlavní nevýhodou GC/MS proti HPLC/MS. Samotná derivatizace je časově náročná a většinou ještě komplikovaná potřebou znovu přečistit vzorky po derivatizaci kapalinovou chromatografií. Trimethylsilylderiváty^{28,29} a trifluoracetylderiváty³⁰ podléhají hydrolyze a *terc*-butyldimethylsilylace³¹ jsou vhodné pouze k přípravě těkavých derivátů volných cytokininových bází (zeatinu, isopentenyladeninu apod.). Permethylace^{32,33} poskytují stabilní produkty, avšak neprobíhají

kvantitativně a vzniká několik vícenásobných derivátů. Acetylace je snadná, produkty nepodléhají hydrolyze, ale některé deriváty jsou nestabilní v GC/MS systému³⁴. Při pentafluorbenzylaci vzniká větší množství produktů³⁵. Přes všechny tyto nevýhody se však GC/MS dlouhodobě používá k identifikaci a stanovení. Odlišným přístupem je hmotnostní spektrometrie s desorpční chemickou ionizací (DCI-MS). Jde o techniku, která umožňuje přímé zavedení vzorku bez kombinace s GC. Pomalým nárůstem teploty za přítomnosti amoniaku jako reakčního plynu se vzorek současně zplyní a ionizuje³⁶. Je nesnadné přímo porovnat citlivost (příp. jiné obecné analytické parametry) GC/MS metod používaných ke stanovení CK. Autoři původních prací se zaměřili zejména na popis a výčet výhod té které derivatizace a ionizace (EI versus CI) ve vztahu k bohatosti MS spektra, či intenzitě molekulárních iontů. Obecně lze shrnout, že při stanovení různých metabolitů CK v rostlinách se při použití GC/MS detekční limity pohybují v jednotkách až stovkách pmol. Celkově nižší citlivost, nutnost derivatizace a složitější čištění vedly k potřebě většího množství výchozího biologického materiálu. Podle typu studovaného pletiva, počtu a typu sledovaných CK (báze, ribosidy, glukosidy) se výchozí množství materiálu pohybuje v jednotkách až desítkách gramů čerstvé hmoty.

7. Imunochemické metody

Imunochemické metody nalezy v oblasti analýzy CK široké uplatnění. Je to dáno zejména vysokou citlivostí těchto metod při nižších nárocích na přístrojové vybavení a nižších provozních nákladech v porovnání s HPLC/MS a GC/MS.

Základním principem imunoanalytických metod je vytvoření imunokomplexního páru antigen(analyt)-protilátka, který pak může být různým způsobem detegován a stanoven³⁷. Pro detekci vzniklého imunokomplexu je důležité označení jednoho z reaktantů radioaktivním prvkem, enzymem, fluorescenční nebo chemiluminiscenční látkou. Většina prvních imunoanalýz byla založena na použití radioaktivně značených indikátorů [¹²⁵I] a [³H], a to pro jednoduchost detekce³⁸. Později bylo v imunotestech aplikováno enzymatické³⁹ nebo fluorescenční⁴⁰ značení, popř. i další speciální neradioaktivní značky. Pro stanovení nízkomolekulárních látek (jako jsou CK³⁷) imunoanalytickými metodami se používá testů založených na kompetitivním uspořádání, tj. definované množství značeného indikátoru soutěží s různými koncentracemi neznačeného standardu o omezený počet volných vazebných míst protilátek. Jestliže je koncentrace protilátky a značeného antigenu konstantní, pak je poměr mezi značeným antigenem volným a vázaným funkcí koncentrace neznačeného antigenu (stanovovaného analytu) v roztoku. Porovnáním se standardní křivkou, získanou použitím známých koncentrací neznačeného antigenu, lze z poklesu vázané aktivity určit množství antigenu přítomného v neznámém vzorku.

CK jsou nízkomolekulární organické sloučeniny

a jako takové nevyvolávají v organismu imunitní odpověď. Vlastnosti antigenů nabývají až po navázání na vhodný makromolekulární nosič. Syntetické postupy používané při přípravě cytokininových konjugátů jsou založeny na reakci ribosidů oxidovaných jodistanem s aminoskupinami nosičové bílkoviny a následné redukci borohydridem (stabilizace vazby)⁴¹. Proto jsou po imunizaci tímto typem cytokininových konjugátů získávány protilátky, které se vyznačují vysokou citlivostí k purinové části molekuly, ale zároveň poskytují možnost společného stanovení cytokininových bází a cytokininů substituovaných v poloze N^9 (např. ^{41–43}).

Jednou z důležitých charakteristik připravených protilátek je jejich křížová reaktivita. Protilátky obvykle neváží jen antigen, proti němuž byly připraveny, ale i látky strukturně podobné. Míra křížové reaktivity se vyjadřuje jako podíl koncentrace křížově reagující látky a antigenu nezbytné pro 50% nasycení vazebných míst protilátky. Pro zjednodušení se vyjadřuje v procentech. V některých případech je žádoucí, aby např. protilátky připravené proti cytokininovému ribosidu vykazovaly křížovou reaktivitu i k příslušným volným bázím či N^9 glukosidům. Pak je totiž možné použít jedné protilátky ke stanovení hned tří metabolitů.

První polyklonální protilátky pro CK popsali Hacker a kolektiv⁴⁴. Imunoanalytické stanovení CK v rostlinných pletivech bylo poprvé popsáno Brandonem⁴⁵. Protilátky proti *tZR* však vykazovaly vysokou křížovou reaktivitu s *iPR*. Proti *iPR* byly připraveny první protilátky v rámci studia *tRNA*⁴⁶. Antiséra proti *iPR* vykazovala pouze slabou křížovou reakci s CK ze skupiny 6-(benzylamino)-purinu a kinetinu (6-furfurylaminopurin). Obecně je vazba CK k odpovídající protilátce závislá na substituci na N^6 a také na substituentu v pozici N^9 či N^3 . Z tohoto důvodu protilátky proti *iPR*, *tZR*, *diHZR*, *BAPR*, *oTR* a *mTR* nevykazují křížovou reaktivitu s adeninem nebo adenosinem, který není v N^6 poloze substituován. S protilátkami proti cytokininovým nukleosidům byla křížová reaktivita volných bází asi 50 %, N^9 glukosidů asi 30–100 %, nukleotidů v rozmezí 60–100 % a N^3 glukosidů 20–70 %. N^7 a *O*-glukosidy s těmito protilátkami obecně nereagují. Také první popsané monoklonální protilátky proti cytokininům vykazovaly různou křížovou reaktivitu. Například protilátky proti *tZR* charakterizované Trionem a kolektivem⁴⁷ vykazovaly křížovou reaktivitu s *iP*, která dosahovala až 20 %. Také Wang a kolektiv⁴⁸ zjistili značné rozdíly v křížové reaktivitě jejich *iPR* protilátek s různými CK. Vzhledem k významným křížovým reaktivitám protilátek připravených proti jednotlivým CK bylo nutné při použití imunoanalytických metod pro kvantitativní analýzu použít některé chromatografické metody pro frakcionaci vzorku, např. TLC nebo HPLC (cit. ^{41,49}). Frakcionace vzorku byla provedena pro oddělení jednotlivých křížově reagujících látek, které mohly být následně samostatně stanoveny.

Další technikou, která naopak vhodně využila vyšších křížových reaktivit připravených protilátek, byla imunoafinitní chromatografie (IAC). Imunoafinitní chromatografie je afinitní chromatografická metoda, ve které stacionární

fázi tvoří protilátka nebo protilátce příbuzné činidlo. Jejím principem je tedy interakce mezi protilátkou a antigenem. Tato technika se používá jako vysoce specifická čistící metoda ve spojení s dalšími analytickými technikami⁵⁰. Morris a spol.⁵¹ k tomuto účelu použili sloupec s navázanými protilátkami proti *tZR*. S tímto sorbentem bylo možno izolovat příslušné CK přímo ze surového extraktu, neboť protilátky imobilizované na sloupci celulosy zachytily pouze Z a jeho N^9 substituované metabolity. Po imobilizaci protilátek připravených proti zeatinribosidu a isopentenyladenosinu⁴⁸ byl připraven nosič, který specificky v jednom stupni umožnil izolaci celé skupiny isoprenoidních cytokininů s jejich následným stanovením kapalinovou chromatografií s UV detekcí. Použitím IAC bylo dosaženo takového stupně přečištění vzorků, kterého lze jen stěží dosáhnout konvenčními chromatografickými technikami⁵². Uvedené metody umožnily rychlé a přesné stanovení CK metodou HPLC s detektorem diodového pole⁵³ nebo HPLC/RIA(ELISA)/MS (cit. ^{23,51,54}). Výhodou IAC je i vysoká návratnost při čištění, pohybující se okolo 85 %. Výsledky analýz CK v různých rostlinných materiálech získaných uvedenými technikami se dobře shodovaly s výsledky GC/MS analýz⁴². V poslední době se tedy IAC stále více uplatňuje při stanovení cytokininů v rostlinném materiálu. Přečištění imunoafinitní chromatografií umožnilo zjednodušit analýzy vzorků a snížit detekční limity pro jednotlivé analyty vlivem výrazného snížení obsahu balastních látek.

8. Ostatní metody

Ostatní analytické přístupy nenalezly doposud širší uplatnění v kvalitativní ani kvantitativní analýze CK. Kapilární zónové elektroforézy (CZE) bylo použito ke studiu interakcí CK s cyklodextriny. Přidáním cyklodextrinu do základního elektrolytu bylo dosaženo uspokojivé separace⁵⁵. Dále byly touto metodou stanoveny přesné disociační konstanty vybraných zástupců aromatických i isoprenoidních cytokininů⁵⁶. Metoda je proti klasickým metodám stanovení disociačních konstant (UV-spektrometrie, diferenciální pulzní voltametrie) výhodnější hned z několika důvodů. Protože jde o separační techniku, je možné pracovat se vzorky nižší čistoty a stanovovat konstanty několika derivátů současně. Metoda je jednoduchá a snadno automatizovatelná⁵⁷. Dosud jedinou aplikaci představuje práce Pacákové a spol.⁷, která je věnována použití CZE ke stanovení derivátů zeatinu, isopentenyladeninu a 6-(benzylamino)purinu v extraktech pšenice, řepy a tabáku. Jde bohužel pouze o pilotní studii, na kterou nebylo doposud navázáno.

První elektrochemické studie byly zaměřeny na popis elektrochemického chování CK (cit. ^{58,59}). Podrobné studování oxidačních i redukčních procesů, kterým cytokinininy podléhají na uhlíkových a rtuťových elektrodách, umožnilo aplikaci těchto technik v oblasti kvantitativní analýzy^{60–62}. Jejich autoři uvádějí, že po odstranění interferujících balastních látek přečištěním mohou být elektrochemicky analyzovány i endogenní hladiny CK v rostlin-

ném materiálu. Nalezené hladiny Z, DHZ a DHZR jsou však neobvykle vysoké. Je pravděpodobné, že byly nadhodnoceny nedostatečnou předseparací stanovovaných CK na TLC. Voltametrický signál tudíž odpovídá při daném potenciálu píku signálu směsi více metabolitů. Nedávno publikovaná práce našeho týmu popisuje možnosti využití voltametrických technik ke sledování spotřeby BAP v kultivačních médiích⁶³.

9. Závěr

Metody kvalitativní a kvantitativní analýzy napomáhají objasnit úlohu CK v regulaci růstu a vývoje rostlin. Společně s klasickými fyziologickými, molekulárně-biologickými či genetickými postupy přispívají k odhalování molekulárních mechanismů účinku CK v rostlinách. Časově nejnáročnějším stupněm při analýze CK v biologickém materiálu byla a nadále zůstává extrakce a čištění. Nejlevnější, relativně rychlou a snadnou čistící metodou je extrakce kapalina-kapalina⁷. Nejvhodnější pro automatizaci se jeví extrakce tuhou fází při použití hybridních sorbentů⁸. S ohledem na pořizovací náklady zařízení potřebného k automatizaci a relativně vysoké provozní náklady, půjde však o metodu nejnákladnější. Zavedení kombinovaných technik GC/MS a zejména HPLC/MS umožňuje kvantifikovat cytokininy ve stále menším množství výchozího biologického materiálu (stovky miligramů čerstvé hmoty). Lineární dynamické rozsahy jsou srovnatelné. HPLC/MS je obecně citlivější, zvláště při použití kapilární HPLC v kombinaci s MS/MS. GC/MS je metodou časově náročnější (ve srovnání s HPLC/MS), vzhledem k nutnosti derivatizace analyzovaných CK. Mnohem levnější alternativou obou výše uvedených instrumentálních technik zůstávají imunochemické metody (RIA, ELISA). Jejich citlivost je postačující, pracuje-li se s gramovým množstvím biologického materiálu. Imunochemické metody nejsou náročné na přístrojové vybavení, pokud se nevyžaduje jejich úplná automatizace. Jejich nevýhodou je však časová náročnost. Biotesty (ve spojení s HPLC) jsou bezpochyby nejlevnějším přístupem k analýze cytokininů. Poskytují však jen orientační hodnoty přirozených hladin hormonů a jejich hlavní význam stále spočívá v ověřování biologické aktivity studovaných derivátů cytokininů.

Novým trendem v oblasti fytochemie je studium metabolického profilu (tzv. metabolic profiling⁶⁴). Jde o sledování výskytu a hladin velkého množství (i stovky) složek rostlinných extraktů v průběhu jediné GC/MS/MS analýzy. Využívá se přitom extrakce do univerzálního extrakčního činidla, jednoduché (univerzální) nebo vícenásobné derivatizace a dokonalé chromatografické separace na kapilárních GC kolonách. Takto mohou být analyzovány produkty desítek metabolických drah současně. Je zřejmé, že při studiu fytohormonů je právě takovýto přístup velmi vhodný, např. pro sledování interakcí mezi jednotlivými skupinami hormonů^{65,66}.

Tato práce vznikla za podpory GA ČR (522/01/0275) a GA AV ČR (IBS4055304).

LITERATURA

1. Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1392 (1955).
2. Skoog F., Strong F. M., Miller C. O.: *Science* 148, 532 (1965).
3. Macháčková I., v knize: *Fyziologie rostlin* (Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., ed.), kap. 8. Academia, Praha 1998.
4. Crozier A., Moritz T., v knize: *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones* (Hooykaas P. J. J., Hall M. A., Libbenga K. R., ed.) sv. 33, kap. 1. Elsevier, Amsterdam 1999.
5. Bielecki R. L.: *Anal. Biochem.* 9, 431 (1964).
6. Astot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: *J. Mass Spectrom.* 33, 892 (1998).
7. Pacáková V., Štulík K., Vlasáková V., Březinová A.: *J. Chromatogr., A* 764, 331 (1997).
8. Dobrev P. I., Kamínek M.: *J. Chromatogr., A* 950, 21 (2002).
9. Nordström A.: osobní sdělení.
10. Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M.: *Plant Growth Regul.* 26, 109 (1998).
11. Hewett E. W., Warening P. F.: *Planta* 114, 119 (1973).
12. Van Staden J., Upfold S. J., Drewes F. E.: *S. Afr. J. Bot.* 60, 293 (1994).
13. Hradecká D., Staszková L., Doležal K., Swaczyna P., Strnad M.: *International Symposium: Auxin and Cytokinin in Plant Development, Prague, 26–30 July 1999*, Book of Abstracts (Pospíšilová J., ed.), str. S84.
14. Doležal K., Astot C., Hanuš J., Holub J., Peters W., Beck E., Strnad M., Sandberg G.: *Plant Growth Regul.* 36, 181 (2002).
15. Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Astot C., Holub J., Fuksová K., Schmölling T., Sandberg G., Strnad M.: *Physiol. Plant.* 117, 579 (2003).
16. Taverner E., Letham D. S., Wang J., Cornish E., Willcocks D. A.: *Phytochemistry* 51, 341 (1999).
17. Yang Y. Y., Yamaguchi I., Kato Y., Weiler E. W., Murofushi N., Takahashi N.: *J. Plant Growth Regul.* 12, 21 (1993).
18. Prinsen E., Redig P., Strnad M., Galis I., Van Dongen W., Van Onckelen H. v knize: *Methods in Molecular Biology, Agrobacterium Protocols* (Gertland K. M. A., Davey M. R., ed.) sv. 44, kap. 23. Humana Press, New Jersey 1995.
19. Imbault N., Moritz T., Nilsson O., Chen H. J., Bollmark M., Sandberg G.: *Biol. Mass Spectrom.* 22, 201 (1993).
20. Prinsen E., Redig P., Van Dongen W., Esmans E. L., Van Onckelen H. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 948 (1995).
21. Prinsen E., Van Dongen W., Esmans E. L., Van Onckelen H. A.: *J. Chromatogr., A* 826, 25 (1998).
22. Van Rhijn J. A., Heskamp H. H., Davelaar E., Jordi W., Leloux M. S., Brinkman U. A. T.: *J. Chromatogr., A* 929, 31 (2001).

23. Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M.: *Anal. Chim. Acta* **480**, 207 (2003).
24. Astot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: *J. Mass Spectrom.* **35**, 13 (2000).
25. Astot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N. H., Sandberg G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 14778 (2000).
26. Morris R. O.: *Plant Physiol.* **59**, 1029 (1977).
27. Scott I. M., Horgan R., McGaw B. A.: *Planta* **149**, 472 (1980).
28. Most B. H., Williams J. C., Parker K. J.: *J. Chromatogr.* **38**, 136 (1968).
29. MacLeod J. K., Summons R. E., Letham D. S.: *J. Org. Chem.* **41**, 3959 (1976).
30. Ludewig M., Dörffling K., König W. A.: *J. Chromatogr.* **243**, 93 (1982).
31. Hocart C. H., Wong O. C., Letham D. S., Tay S. A. B., MacLeod J. K.: *Anal. Biochem.* **153**, 85 (1986).
32. Scott I. M., Horgan R.: *Planta* **161**, 345 (1984).
33. Horgan R., Scott I. M. v knize: *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis* (Rivier L., Crozier A., ed.) sv. 2, kap. 5. Academic Press, London 1987.
34. Björkman P. O., Tillberg E.: *Phytochem. Anal.* **7**, 57 (1996).
35. Hocart C. H., Wang J., Letham D. S.: *J. Chromatogr., A* **811**, 246 (1998).
36. Tay S. A. B., MacLeod J. K., Palni L. M. S.: *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **2**, 105 (1993).
37. Edwards R. (ed): *Immunoassay: An Introduction*. William Heinemann Medical Books, London 1985.
38. Weiler E. W.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 85 (1984).
39. Morris B. A., Clifford M. N., Jackman R. (ed.): *Immunoassays for Veterinary and Food Analysis*. Elsevier, London 1988.
40. Gosling J. P., Reen D. J. (ed.): *Immunotechnology*. Portland Press, London 1993.
41. Price C.P., Newmann D. J. (ed): *Principles and Practice of Immunoassay*. Stockton Press 1997.
42. Badenoch-Jones J., Letham D. S., Parker C. W., Rolfe B. G.: *Plant Physiol.* **75**, 1117 (1984).
43. Maldiney R., Leroux B., Sabbagh I., Sotta B., Sossountzov L., Miginiac E.: *J. Immunol. Methods* **90**, 151 (1986).
44. Hacker B., Van Vunakis H., Levine L.: *J. Immunol.* **6**, 1726 (1972).
45. Brandon D. L., Corse J., Higaki P. C., Zavala M. A.: *Plant Physiol.* **63**, 82 (1979).
46. Khan S. A., Humayn M. Z., Jacobs T. M.: *Anal. Biochem.* **83**, 632 (1977).
47. Trione E. J., Krygier B. B., Banowitz G. M., Katherin J. M.: *J. Plant Growth Regul.* **4**, 101 (1985).
48. Wang T. L., Cook S. K., Knox J. P.: *Phytochemistry* **26**, 2447 (1987).
49. MacDonald E. M. S., Akiyoshi D. E., Morris R. O.: *J. Chromatogr.* **214**, 101 (1981).
50. Hage D. S.: *Clin. Chem.* **45**, 593 (1999).
51. Morris R. O., Akiyoshi D. E., MacDonald E. M. S., Morris J. W., Zaerr J. B. v knize: *Plant Growth Substances 1982* (Wareing P. F., ed.) str. 175. Academic Press, London 1982.
52. Morris R. O., Jameson P. E., Laloue M., Morris J. W.: *Plant Physiol.* **95**, 1156 (1991).
53. Nicander B., Stahl U., Björkman P. O., Tillberg E.: *Planta* **189**, 312 (1993).
54. Ulvskov P., Nielsen T. H., Seiden P., Marcussen J.: *Planta* **188**, 70 (1992).
55. Barták P., Ševčík J., Adam T., Friedecký D., Lemr K., Stránský Z.: *J. Chromatogr., A* **818**, 231 (1998).
56. Barták P., Bednář P., Stránský Z., Boček P., Vespalec R.: *J. Chromatogr., A* **878**, 249 (2000).
57. Barták P., Pěchová D., Tarkowski P., Bednář P., Kotouček M., Stránský Z., Vespalec R.: *Anal. Chim. Acta* **421**, 221 (2000).
58. Janik B., Elving P. J.: *J. Electrochem. Soc.* **116**, 1087 (1969).
59. Smyth M. R., Kell D. B.: *J. Electroanal. Chem.* **122**, 363 (1981).
60. Hernández P., Paton F., Ballesteros Y., Hernández L.: *Electroanalysis* **9**, 235 (1997).
61. Blanco M. H., Quintana M. D., Hernández L.: *Electroanalysis* **12**, 147 (2000).
62. Blanco M. H., Quintana M. D., Hernández L.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **364**, 254 (1999).
63. Tarkowská D., Kotouček M., Doležal K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **68**, 1076 (2003).
64. Glassbrook N., Beecher C., Ryals J.: *Nat. Biotechnol.* **18**, 1142 (2000).
65. Müller A., Düchting P., Weiler E. W.: *Planta* **216**, 44 (2002).
66. Birkemeyer C., Kolasa A., Kopka J.: *J. Chromatogr., A* **993**, 89 (2003).

P. Tarkowski, K. Doležal, and M. Strnad
(Laboratory of Growth Regulators, Palacky University, Olomouc and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): Analytical Methods in Cytokinin Research

Cytokinins, a group of N^6 -substituted adenine derivatives, are phytohormones that play an important role in plant growth and development. Plant tissue extracts are complex mixtures containing cytokinins in minute quantities. Therefore, sensitive and sufficiently selective analytical tools are required for determination and/or identification of cytokinins in plants. Main techniques (GC/MS, HPLC/MS) currently employed for qualitative and quantitative analyses of cytokinins as well as widely utilised extraction and purification procedures are discussed.

BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI PROTEOLYTICKÝCH ENZÝMOV

MARTINA HRČKOVÁ^a, ERNEST ŠTURDÍK^b,
TIBOR MALIAR^c a JAROSLAV ZEMANOVIČ^a

^aKatedra potravinárskej technológie, ^bKatedra biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^cVýskumný ústav liečiv Modra, Horná 36, 900 01, Slovenská republika
mdienstl@gmx.at

Došlo 30.10.02, prepracované 15.3.04, prijaté 8.4.04.

Kľúčové slová: proteolytické enzýmy, názvoslovie, štruktúra, stabilita, katalýza, farmakologické vlastnosti, peptidázy, potravinárske aplikácie

Obsah

1. Úvod
2. Názvoslovie a rozdelenie proteolytických enzýmov
3. Stabilita, štruktúra a mechanizmus katalýzy proteázy
 - 3.1. Serínové peptidázy
 - 3.2. Cysteínové peptidázy
 - 3.3. Aspartátové peptidázy
 - 3.4. Metalopeptidázy
4. Záver

1. Úvod

Proteolytické enzýmy sú prítomné prakticky vo všetkých živých bunkách a navyše sú vylučované aj do vonkajšieho prostredia, resp. do tráviaceho systému vyšších organizmov. Všeobecne sú známe ich rôzne regulačné funkcie v intermediárnom metabolizme (limitovaná proteolýza, účasť pri zrážaní krvi, aktivácia tráviacich enzýmov, aktivity pri rôznych obranných mechanizmoch atď.). Okrem toho sú známe aj ich rozsiahle praktické aplikácie vo forme enzýmových preparátov v priemyselnej praxi (biodetergenty, produkcia syrov, spracovanie kože, produkcia hydrolyzátov bielkovín, stabilizácia piva a i.), medicíne a farmácii (preparáty zlepšujúce trávenie, čistenie kontaktných šošoviek, využívanie pre terapeutický zásah), kozmetike (keratolytické zmäkčujúce prípravky, pleťové peelingové masky), v bežnej laboratórnej praxi a v rámci experimentálnej vedeckovýskumnej činnosti. Proteolytické enzýmy (peptidázy) katalyzujú hydrolyzu peptidových väzieb v proteínoch významne ovplyvňujú nutričné, senzorycké, textúrové a iné vlastnosti potravinárskych surovín, medziproduktov i konečných výrobkov. Množstvo a typ peptidových väzieb, ktoré môže peptidáza štiepiť je závislé

na tom, z ktorých aminokyselín sa proteín skladá, a ktoré sú navzájom príľahlé¹. Viaceré peptidázy sú v súčasnosti perspektívnym objektom farmaceutického výskumu v spojitosti s terapiou početných závažných humánných ochorení (nádorové, artritické, infekčné a zápalové).

2. Názvoslovie a rozdelenie proteolytických enzýmov

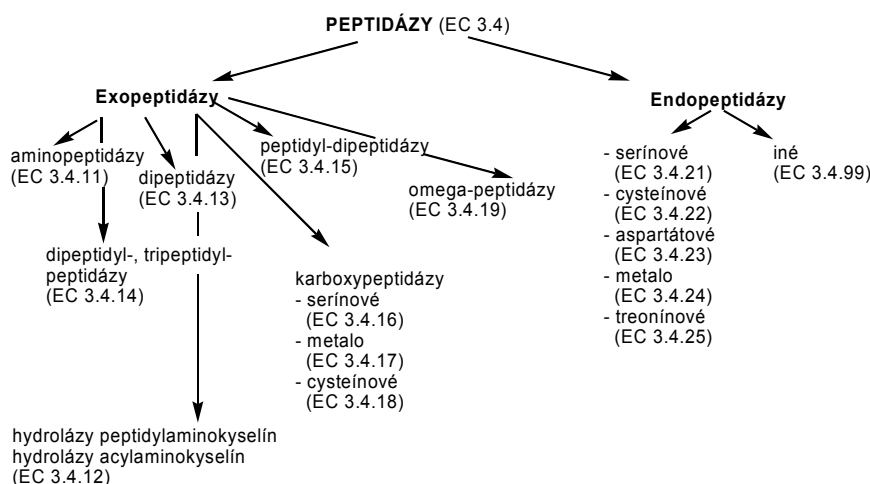
Podľa *Enzyme Nomenclature (1984)* sa výraz peptidázy používal striktné len pre enzýmy patriace do podtriedy EC 3.4.11–19, čiže pre exopeptidázy, a výraz proteinázy sa predtým používal pre enzýmy patriace do podtriedy EC 3.4.21–99, t.j. endopeptidázy. Názvoslovný výbor IUBMB (Medzinárodná únia pre biochémiu a molekulárnu biológiu) navrhol v r. 1992 používať pre proteolytické enzýmy jednotný všeobecný názov peptidázy. Je to synonymum výrazu proteáza, v minulosti používaného ako spoločný názov pre exopeptidázy aj endopeptidázy. Podľa tejto nomenklatury sa peptidázy delia na dve podtriedy, a to na exopeptidázy (EC 3.4.11–19) a endopeptidázy (EC 3.4.21–24 a EC 3.4.99). Tieto sa ďalej rozdeľujú tak, ako je to prezentované na obr. 1.

Exopeptidázy atakujú peptidové väzby na koncoch polypeptidových reťazcov, pričom aminopeptidázy (EC 3.4.11) odštiepujú voľné aminokyseliny z N-konca polypeptidového reťazca proteínu a dipeptidyl-peptidázy a tripeptidyl-peptidázy (EC 3.4.14) uvoľňujú príslušné dipeptidy a tripeptidy. Medzi exopeptidázy atakujúce voľný C-koniec polypeptidového reťazca proteínu sa zaraďujú karboxypeptidázy (EC 3.4.16–18) a peptidyl-dipeptidázy (EC 3.4.15). Karboxypeptidázy sa podľa štruktúry katalytického miesta ďalej rozdeľujú na karboxypeptidázy serínového typu (EC 3.4.16), metalokarboxypeptidázy (EC 3.4.17) a karboxypeptidázy cysteínového typu (EC 3.4.18). Iné exopeptidázy sú špecifické pre odštiepovanie dipeptidov, tzv. dipeptidázy (EC 3.4.13) alebo odštiepujú substituované, cyklizované alebo izopeptidovými väzbami spájané zvyšky, tzv. omega-peptidázy (EC 3.4.19).

Endopeptidázy sa podľa štruktúry katalytického miesta rozdeľujú na endopeptidázy serínové (EC 3.4.21), cysteínové (EC 3.4.22), aspartátové (EC 3.4.23), metaloendopeptidázy (EC 3.4.24), treonínové (EC 3.4.25) a iné endopeptidázy (EC 3.4.99) (cit.^{2–5}).

Špecifita peptidáz nezávisí na dĺžke reťazca, ale na povahe aminokyselín a na prítomnosti alebo neprítomnosti blízkych nabitých skupín⁶.

Peptidázy môžeme klasifikovať tiež na základe ďalších kritérií, a to podľa pôvodu (rastlinné, živočíšne, mikrobiálne), podľa ich lokalizácie (intracelulárne, extracelulárne), podľa optimálneho pH (kyslé, neutrálne, alkalické) atď.



Obr. 1. Rozdelenie peptidáz podľa Názvoslovného výboru IUBMB (Medzinárodná únia pre biochémiu a molekulárnu biológiu)

3. Stabilita, štruktúra a mechanizmus katalýzy proteolytických enzýmov

Pod pojmom stabilita enzýmu sa rozumie schopnosť zachovať si aktivitu pri rôznych podmienkach vonkajšieho prostredia. Medzi základné faktory, ktoré môžu najviac ovplyvniť stabilitu enzýmu patrí pH prostredia, teplota a čas pôsobenia⁷. K ďalším faktorom patrí napr. iónová sila, relatívna permitivita, redoxný potenciál (ak sa v aktívnom centre enzýmu nachádzajú skupiny –SH alebo –S–S–), ale aj koncentrácia bielkovín v samotnom roztoku⁸. Pri charakterizácii peptidáz sa často uvádza nielen teplotné a pH-rozmedzie, v ktorom je enzým stabilný, ale aj jeho optimálne hodnoty. Pri optimálnej teplote sa zaisťuje maximálna účinnosť enzýmu a jeho minimálna inaktivácia. Optimálne pH zase súvisí s priestorovým usporiadaním makromolekúl peptidáz, ktoré je pri rozličnej koncentrácii vodíkových iónov rozdielne.

Podľa mechanizmu katalýzy sa proteolytické enzýmy klasifikujú do 4 skupín, zahrňujúcich serínové, cysteínové, aspartátové a metalopeptidázy.

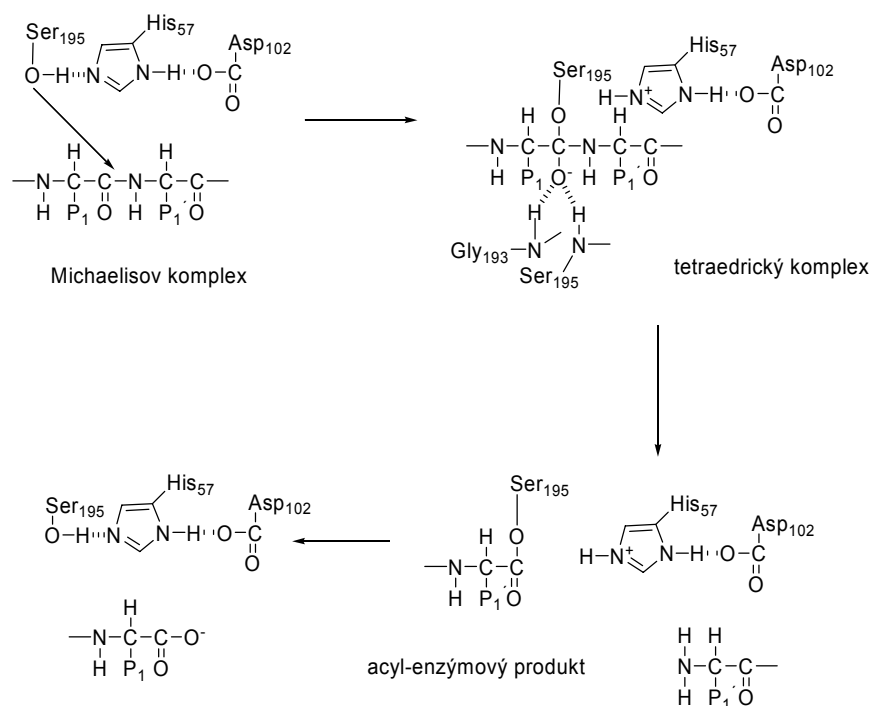
3.1. Serínové peptidázy

Najväčšiu skupinu proteolytických enzýmov mikrobiálneho a živočíšneho pôvodu tvoria serínové peptidázy. Súčasťou ich katalytického miesta je reaktívny serínový zvyšok. Mechanizmus ich účinku je zobrazený na obr. 2. Významnou črtou tohto mechanizmu je tvorba esteru medzi kyslíkom serínu a acylovým zvyškom substrátu za vzniku aminového zvyšku ako prvého produktu. Ďalším dôležitým prvkom katalýzy štiepenia peptidových väzieb serínových peptidáz je prítomnosť dvoch hlavných reťazcov so skupinami –NH–, ktoré sa podieľajú na tvorbe vodíkových väzieb s kyslíkovým atómom karbonylovej skupiny, ktorá je súčasťou štiepenej peptidovej väzby. Tento efekt je ťažké kvantitatívne zhodnotiť, pretože skupiny –NH– sú nevyhnutné pre štruktúrnu integritu

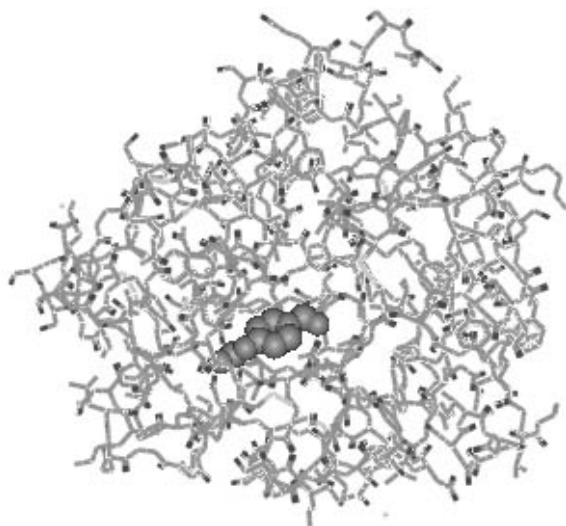
proteínu⁹. Tieto peptidázy sú inhibované DFP (diizopropylfluorofosfát) alebo PMSF (fenylnmetánsulfonylfluorid). Vo všeobecnosti sú serínové peptidázy aktívne pri neutrálnom a alkalickom pH s optimom medzi hodnotami 7–11. Majú širokú substrátovú špecifickosť so značnou esterolytickou aktivitou voči mnohým esterovým substrátom. Ich izoelektrické body sa pohybujú od pH 4,4 do 6,2 a molekulové hmotnosti sú väčšinou medzi 18,5–35 kDa.

Serínové peptidázy tvoria z farmakologického, potravinárskeho a iného praktického hľadiska významnú skupinu enzýmov pre reguláciu a využívanie, nakoľko je dostatočne popísaná a známa ich štruktúra, mechanizmus katalytického deja, spôsob inhibície rôznych skupín nízkomolekulovými inhibítormi i efektormi peptidového charakteru. Z najvýznamnejších enzýmov tejto skupiny možno spomenúť trypsin, trombin a ostatné hemokoagulačné faktory, urokinázu, faktory komplementu, z potravinárskeho hľadiska sú to predovšetkým alkalické subtilisiny z *Bacillus licheniformis*, ktoré sú dobre známe ako prípravky na úpravu textúry, nutričných a senzorických vlastností potravín, ale aj v oblasti detergentov ako súčasť pracích prostriedkov.

Z dôvodov štruktúrálnej i funkčnej príbuznosti je pre celú skupinu často zaužívaný názov trypsinové enzýmy alebo enzýmy trypsinovej rodiny. Trypsín [EC.3.4.21.4] je jedným z najpopisanejších enzýmov vďaka relatívne jednoduchšej štruktúre a ľahkej komerčnej dostupnosti. Základné typické štruktúralne prvky popisovaných peptidáz je možné demonštrovať na príklade tohto enzýmu. Pre celú skupinu je charakteristická protónová štafeta katalytickej triády Ser₁₉₅, His₅₆ a Asp₂₁₂. Štruktúru trypsinu možno demonštrovať v prevedení umožňujúcom 3D projekciu vhodne konvertovaných údajov X-ray alebo NMR súborov dostupných napríklad vo verejne prístupnej proteínovej databanke (www.rcsb.org/pdb). Databáza obsahuje niekoľko desiatok súborov hovädzieho β-trypsínu či už samotného alebo asociovaného s rôznymi nízkomolekulovými i peptidovými inhibítormi. Obr. 3 prezentuje sekun-



Obr. 2. Schématické znázornenie katalytického účinku serínovej peptidázy; reakcia prebieha za vzniku tetraedrického medziproduktu s následným odštiepením pravej polovice substrátu za vzniku acyl-enzýmového medziproduktu. Štiepenie tohto medziproduktu sa uskutočňuje enzýmovou katalýzou v prítomnosti vody za vzniku kyseliny; P₁, P₁' - zvyšky aminokyselín postranných reťazcov



Obr. 3. Terciárna štruktúra hovädzieho β -trypsínu v komplexe s 4-guanidínobenzoovou kyselinou ako inhibítorom¹⁰

dárnu štruktúru hovädzieho β -trypsínu a zároveň jeho komplex s 4-guanidínobenzoovou kyselinou (na obrázku vyznačená v strede molekuly tmavou farbou), kovalentne viazanou na katalytický serín Ser₁₉₅. Trypsín je relatívne malý enzým s molekulovou hmotnosťou 23,3 kDa vyskytujúci sa vo forme monomérskej bielkoviny. Tzv. „páskový model“ tohoto komplexu poukazuje na desať oblastí štruktúry skladaného listu označených 1 až 10 a dve typické α -helixové motívy označené A a B, prvý medzi doménami 6 a 7 a druhý na C-konci proteínu¹⁰.

Pankreatický trypsin Trypsin Novo (Novo Nordisk A/S) je potravinársky významný preparát izolovaný z pankreasu prasiat s optimálnou teplotou 45 až 50 °C a pH 7–8 (cit.¹¹). V kombinácii s chymotrypsínom sa trypsin používa na zníženie alergenicity bielkovín v potravinách¹². Samotným chymotrypsínom možno zlepšiť funkčné vlastnosti hydrolyzátov gliadínu¹³.

Trypsínu podobné peptidázy sú produkované aj mikroorganizmami *Streptomyces erythreus*, *S. fradiae* a *S. griseus*. Táto podskupina peptidáz je špecifická pre zásadité aminokyseliny. Najviac je aktívna pri pH 8, citlivá je na trypsinové inhibítory, DFP a sójové trypsinové inhibítory. Ich molekulové hmotnosti sa pohybujú okolo 20 kDa a izoelektrické body sú okolo pH 9 (cit.⁷). Aminopeptidáza produkovaná *Streptomyces rimnosus* vykazuje optimálnu aktivitu pri pH 7,1–7,8 a teplote 25–41 °C. Úplná inhibícia nastáva v prítomnosti 0,1 mM EDTA alebo 1mM 1,10-fenantrolínu. Obnovenie aktivity možno do-

siahnúť prídavkom 0,05 mM Co^{2+} , Zn^{2+} alebo Ni^{2+} . Enzým inhibujú látky ako amastatín, bestatín a puromycín¹⁴.

Trombín je dostatočne známym enzýmom, ktorý je primárnym cieľom pre antitrombotický účinok látok vo všeobecnosti. Ako pre celú skupinu týchto enzýmov i pre trombín je charakteristická protónová štafeta katalytickej triády Ser₁₉₅, His₅₆ a Asp₂₁₂. Jedná sa o monoméry enzým s molekulovou hmotnosťou 29,7 kDa pozostávajúci z 259 aminokyselinových zvyškov. Zrejma je prítomnosť troch výraznejších α -helixových sekvencií, označených A, B a C, a 14 sekvencií skladaného listu. Trombín sa vyznačuje značne členitou a vetvenou povrchovou katalytickou kavitou, ktorá odpovedá regiónu P₁. Ním sa determinuje špecificita trombínu (napríklad v porovnaní s nešpecifickým trypsínom)¹⁵.

Podskupina alkalických peptidáz je špecifická pre aromatické a hydrofóbne zvyšky aminokyselín ako sú tyrozín, fenylalanín alebo leucín. Sú produkované rôznymi druhmi baktérií, plesní alebo kvasiniek a inhibované DFP a zemiakovým inhibítorom, ale nie špecifickými trypsínovými inhibítormi TLCK (1-chlóro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanón) a TPCK (L-1-chlóro-3-[4-tosylamido]-4-phenyl-2-butanón). Najaktívnejšie sú pri pH 10. Molekulové hmotnosti sa pohybujú medzi 15 a 30 kDa a ich izoelektrické body sú normálne pri pH 9. Najlepšie prebádanými alkalickými serínovými peptidázami sú subtilizíny produkované *Bacillus licheniformis* (Subtilisin Carlsberg) a *B. amyloliquefaciens* (Subtilisin Novo, Bacterial Protease Nagase-BPN). Carlsberg a Novo Subtilisin sú veľmi podobné peptidázy. Ich molekulová hmotnosť sa pohybuje okolo 27,5 kDa, optimálna teplota je 60 °C a optimálne pH 10. Aktívne miesta oboch enzýmov tvoria zvyšky Ser₂₂₁, His₆₄ a Asp₃₂. Ich aktivita je inhibovaná činidlami DFP a PMSF. Sú širokošpecifické pre väčšinu peptidových väzieb a niektoré esterové väzby. Carlsberg-peptidáza je účinná aj pri transpeptidácii a transesterifikácii. Stabilita Novo Subtilisínu je, na rozdiel od Carlsberg-enzýmu, mierne závislá na prítomnosti Ca^{2+} . Obedve peptidázy sa rýchlo deštruuujú v prítomnosti oxidáčnych reagensí ako sú chlórnaný alebo peroxid vodíka⁸. Potravinársky významnou peptidázou serínového typu je alkalická peptidáza Alcalase produkovaná selektívne kmeňom *Bacillus licheniformis*. Vo všeobecnosti sa používa na úpravu funkčných vlastností hydrolyzovaného proteínu^{16,17}. Používa sa pri získavaní arómu a chuti do polievok a mäsových konzerv zo zvyškov mäsa, ktoré pri bežnom spracovaní ostávajú na hlave alebo na kostiach zvierat. Hlavnou zložkou enzýmu je subtilizín A (= Subtilisin Carlsberg) [E.C.3.4.21.62]. Jej molekulová hmotnosť je 27,3 kDa. Optimálna teplota peptidázy sa pohybuje medzi 55 a 70 °C a pH medzi 6,5–8,5 (cit.¹⁸). Inými producentmi sú *Arthrobacter species*, *Flavobacterium arborescens* a *Streptomyces* sp. Alkalické peptidázy sú produkované taktiež plesňami *Aspergillus species.*, *Neurospora crassa*, termofilmi (napr. *Malbranchea pulchella*) a kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Alkalická peptidáza produkovaná *Aspergillus oryzae* je serínová peptidáza s podobnými vlastnosťami ako serínová peptidáza z *Bacillus* spe-

cies. Enzým vykazuje optimálnu aktivitu pri pH 7,0–8,5 a je stabilný medzi pH 4,5 a 9,0. Citlivý je na teplotu, rýchlo sa inaktivuje pri 60 °C. Je stabilizovaný Ca^{2+} iónmi a inhibovaný serínovými činidlami a zemiakovým inhibítorom⁸. V potravinárskej praxi sa používa spomínaná serínová peptidáza z *Aspergillus oryzae*, známa ako preparát Flavourzyme® (Novo Nordisk), na produkciu mäsových arómov z rastlinných proteínov¹⁹ alebo na získavanie rybích hydrolyzátoov s dobrými funkčnými vlastnosťami^{20,21}.

Myxobacter- α -lytická peptidáza, produkovaná rodom *Sorangium*, vykazuje silnú lytickú aktivitu voči mnohým pôdnym baktériam. Podobne ako elastáza je špecifická na štiepenie väzieb obsahujúcich karboxylové skupiny neutrálnych alifatických aminokyselín. Uvedená serínová peptidáza je najaktívnejšia pri pH 9 a inhibuje ju DFP (cit.⁸).

3.2. Cysteínové peptidázy

Cysteínové peptidázy predstavujú v súčasnosti veľmi perspektívny objekt farmaceutického výskumu v spojitosti s terapiou mnohých závažných humánných ochorení (nádorové, artritické, infekčné a zápalové). Predmetom záujmu farmakológov sú zvlášť lyzozomálne katepsíny (katepsín B, H, L, S, O) a kalpainy (vápnik-dependentné cysteínové proteínázy²²). Tieto peptidázy sú významné tiež v potravinárstve, najmä v oblasti mäsového priemyslu pri tenderizácii mäsa²³. Mechanizmus účinku cysteínových peptidáz je veľmi podobný mechanizmu serínových peptidáz. Rovnako je založený na vzniku kovalentného medzi produktu s tým rozdielom, že v prípade cysteínových peptidáz je atakujúcim nukleofilom atóm sily postranného reťazca cysteínu. Aj tu je do mechanizmu zapojený postranný reťazec histidínu, ktorý funguje ako akceptor vodíkového atómu. Dôležitý je poznatok, že chemickou modifikáciou hyperaktívneho cysteínového zvyšku stráca enzým svoju aktivitu. Zistilo sa, že skupina –SH prítomného cysteínu musí byť v neviazanej forme a aktívne miesto enzýmu vždy obsahuje zvyšok histidínu⁹.

Štrukturálne typické prvky cysteínových proteínáz možno demonštrovať na príklade katepsínu B. Katepsín B [E.C.3.4.22.1] je jeden z najlepšie preskúmaných enzýmov skupiny cysteínových proteínáz. Pre celú skupinu je charakteristická protónová štafeta katalytickej triády Cys₂₉, His₁₉₉ a Gln₂₃, čo indikuje výraznú podobnosť so skupinou serínových proteínáz. Enzým pozostáva z reťazca obsahujúceho 253 aminokyselinových zvyškov, vzájomne prepojeného prostredníctvom siedmich disulfidických väzieb. Jeho inhibítorom je Ca-030 (epoxysukcinyl-Ile-Pro-OH etyl ester)¹². Katepsín B je relatívne malý enzým s molekulovou hmotnosťou 27,4 kDa vyskytujúci sa vo forme monomérovej bielkoviny. Vyznačuje sa typickou povrchovou, stereošpecifickou pretiahnutou kavitou, ktorá zabezpečuje interakciu s inhibítorom Ca-030 (epoxysukcinyl-Ile-Pro-OH etyl ester). Sekundárnu štruktúru tohoto komplexu tvorí dvanásť oblastí štruktúry skladaného listu a štyri výrazné typické α -helixové motívy. V detailoch sa autori v špecifikovaní sekundárnej štruktúry čiastočne rozchádzajú.

Cysteínové peptidázy sú citlivé na tiolové činidlá ako kyselina jódoctová, jódoacetamid, ťažké kovy a aktivujú ich redukujúce činidlá ako kyanid draselný, cysteín alebo kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA). Výskyt cysteínových peptidáz sa okrem živočíchov zaznamenal v len obmedzenom množstve u plesní. Producentami extracelulárnych peptidáz s vlastnosťami podobným serínovým peptidázam sú *Trichosporus* species, *Oidiodendron kalrai* a *Nannizzia fulva*. Ďalšie extracelulárne cysteínové peptidázy sú produkované najmä *Microsporium* species, *Aspergillus oryzae*, *Sporotrichum pulverulentum* a *Bacteroides gingivalis*. Väčšina týchto enzýmov je aktívna pri pH 5–8. Na niektoré priaznivo pôsobí prítomnosť redukujúcich činidiel. Mnoho plesní, ktoré produkujú sliz priamo v bunke alebo mimo nej, napr. *Dictyostelium discoideum*, syntetizujú cysteínové peptidázy, ktoré vykazujú optimálnu aktivitu okolo pH 5. Najväčšia produkcia cysteínových peptidáz sa zistila v jednobunkovcoch. Ide väčšinou o intracelulárne enzýmy aktívne pri nízkych (kyslých) hodnotách pH (cit.⁸).

Clostripainová peptidáza pochádza z filtrátu kultúry *Clostridium histolyticum*. Enzým je špecifický voči zvyškom zásaditých aminokyselín na karboxylovej strane štiepeného reťazca. Jeho molekulová hmotnosť je 50 kDa a izoelektrický bod má hodnotu 4,8. Je citlivý na TLCK ale nie na TPCK.

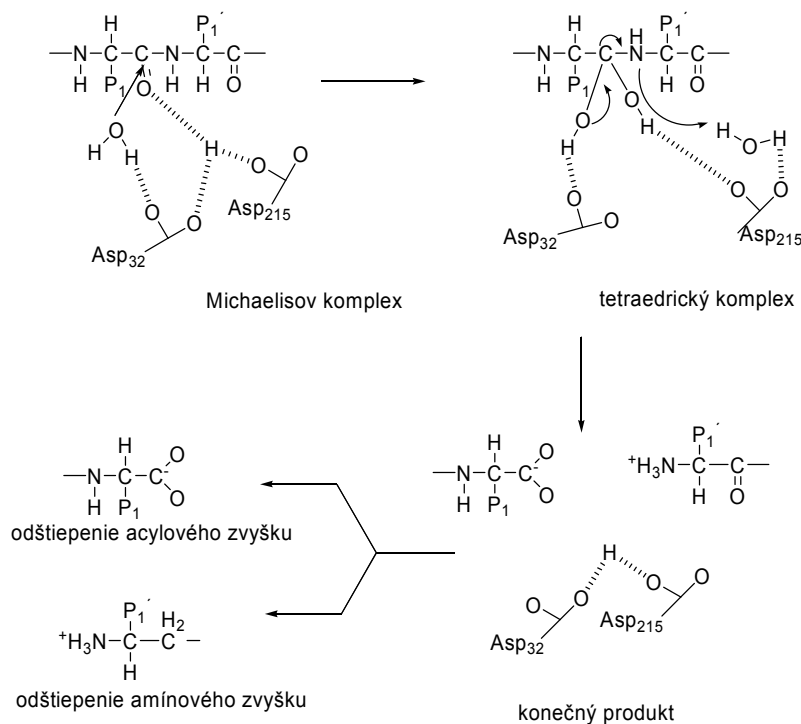
Streptokoková peptidáza je produkovaná ako zymogén baktériami *Streptococcus* species (skupina A). Tento sa autokatalýzou mení na aktívnu formu. Peptidáza má širokú aminokyselinovú špecificitu. Molekulová hmotnosť

enzýmu je 32 kDa a izoelektrický bod pri pH 8,4 (cit.⁸). V oblasti potravinárskeho priemyslu je známa aminopeptidáza zo *Streptococcus thermophilus*, ostraňujúca tzv. horké peptidy²⁴.

Medzi potravinársky významné cysteínové peptidázy patria aj peptidázy rastlinného pôvodu ako bromelaín, ficín a papaín^{25,26}. Bromelaín je známy svojou aplikáciou pri hydrolýze väčšiny rozpustných proteínov, napr. pri výrobe oblátiek a napolitániek²⁵. V procese výroby piva možno papaínom zvýšiť výtťažok mladiny a obsah dusíka v nej. Aplikuje sa aj pri čírení piva²⁸. Všetky tri peptidázy sa používajú aj v mäsovom priemysle pri tenderizácii mäsa²⁹.

3.3. Aspartátové peptidázy

Táto skupina peptidáz je charakteristická maximálnou aktivitou pri nízkom pH (3–4) a necitlivosťou na inhibítory zvyšných troch skupín peptidáz. Skôr ako bol známy charakter ich aktívneho miesta, označovali sa ako „kyslé“ vzhľadom k zníženému optimálnemu pH ich pôsobenia. Nachádzajú sa väčšinou u plesní, zriedkavo u baktérií alebo v jednobunkovcoch. Aspartátové peptidázy sú najcitlivejšie na epoxy- a diazoketónové zlúčeniny v prítomnosti kationov medi. Inhibuje ich pepstatín alebo pepsínový inhibítor izolovaný zo *Streptomyces* species. Avšak aspartátové peptidázy z *Aspergillus niger*, *Scytalidium lignicolum* a z mnohých bazidiomycét patriacich do čeľade *Tricholomataceae* nie sú na tieto špecifické inhibítory citlivé. Aspartátové peptidázy majú väčšinou molekulovú hmotnosť od 30–45 kDa a ich izoelektrické body sa pohybujú v rozsahu pH 3,4–4,6. Sú špecifické voči zvyškom aroma-

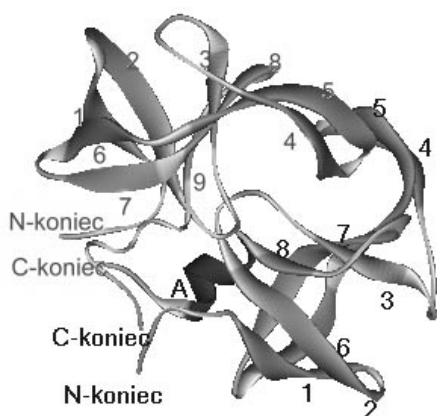


Obr. 4. Mechanizmus katalytického účinku aspartátových peptidáz

tických aminokyselín na oboch koncoch štiepeného reťazca. Táto skupina peptidáz katalyzuje hydrolýzu peptidových väzieb bez nukleofilného ataku funkčnej skupiny enzýmu. Z tohto dôvodu sa medzi enzýmom a substrátom nevytvára žiadny kovalentný medziprodukt. Katalytický aparát aspartátových peptidáz pozostáva z dvoch postranných reťazcov kyseliny asparágovej. Dôležitosť ich dvoch karboxylových skupín sa usúdila zo štúdií zahrňujúcich chemické modifikácie. Tento fakt prirodzene potvrdzuje aj nízke pH optimum tejto skupiny peptidáz. Umiestnenie týchto dvoch bočných reťazcov v mieste, v ktorom katalyzujú štiepenie peptidových väzieb, sa potvrdil aj kryštalografickou röntgenovou analýzou enzýmovej štruktúry. Tiež sa potvrdilo, že tieto dve karboxylové skupiny sú vedľa seba dosť blízko na to, aby sa podieľali na vodíkovej väzbe medzi ich atómami kyslíka. Okrem toho, enzým v natívnej forme má pomocou vodíkovej väzby pevne naviazanú molekulu vody na aktívne miesta oboch asparágových kyselín. Mechanizmus katalytického účinku aspartátových peptidáz je zobrazený na obr. 4 (cit.⁹).

Z farmakologicky najvýznamnejších enzýmov tejto skupiny možno spomenúť virálnu HIV-proteázu I, HIV-proteázu II a renín. Pre celú skupinu enzýmov tejto kategórie je možné charakterizovať určité spoločné prvky. Katalytický mechanizmus zabezpečuje katalytická diáda dvoch reziduí kyseliny asparágovej, pričom jeden karboxyl sa vyskytuje v ionizovanej a druhý v protonizovanej forme. HIV-proteáza I [EC.3.4.23.16] je relatívne malý enzým s molekulovou hmotnosťou 21,7 kDa (198 reziduí) vo forme dvoch symetrických monomérických jednotiek. Jej klinicky úspešným inhibítom je Ro31-8959. „Páskový model“ tohto komplexu (obr. 5) odkrývajúci sekundárnu štruktúru HIV-proteázy I poukazuje na 17 oblastí typu skladaného listu označených 1 až 8 na reťazci α a 1 až 9 na reťazci β a jednu výraznejšiu helikálnu sekvenciu³⁰.

Veľa aspartátových peptidáz produkovaných plesňami, napr. *Mucor miehei* alebo *Mucor pusillus*, sú potravi-



Obr. 5. „Páskový model“ sekundárnej štruktúry HIV-proteázy I (cit.³⁰)

nársky významné. Používajú sa pre zrážanie proteínov mlieka pri výrobe tvarohu a syrov²⁹. Väčšina z nich je nestabilných pri pH > 7 a nevyskytujú sa v mikrobiálnych kultúrach, ktoré rastú v neutrálnom alebo alkalickom prostredí. Rozlišujú sa viaceré typy aspartátových peptidáz. Pepsínu podobné peptidázy sú produkované najmä plesňami rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trametes* a *Neurospora*. Ide o extracelulárne enzýmy, ktoré sa často používajú pri výrobe proteínových hydrolyzátoch zo sóje, najmä pri výrobe sójových omáčiek. Mikrobiálne pepsínu podobné peptidázy majú veľa podobných fyzikálnych a chemických vlastností ako pepsín živočíšneho pôvodu, vrátane nízkej esterolytickej aktivity.

Renínu podobné peptidázy majú veľa spoločných vlastností s predchádzajúcimi peptidázami. Avšak, na rozdiel od pepsínu podobných peptidáz, sú schopné zrážať mlieko podobným spôsobom ako renín živočíšneho pôvodu. Renínu podobné peptidázy boli izolované z mnohých mikroorganizmov ako napr. *Endothia parasitica*, *Mucor species* a *Aspergillus candidus*. Enzýmy produkované rodmi *Endothia* a *Mucor* sa komerčne používajú pri výrobe syrov. Enzým produkovaný druhom *Mucor pusillus* je monomér o molekulovej hmotnosti 30 kDa. Jeho molekula obsahuje dva cysteinové zvyšky, ktoré však zjavne netvoria disulfidické väzby. Peptidáza z *Mucor miehei* je takisto monomér s molekulovou hmotnosťou 38 kDa. Obsahuje asi 6 % glycidov. Obidva enzýmy prednostne katalyzujú hydrolýzu peptidových väzieb s aromatickými a hydrofóbnymi bočnými reťazcami s optimálnou aktivitou pri pH 4,0–4,5. Sú stabilné v rozmedzí pH 3–6. Peptidáza z *M. miehei* (Fromase, Gist-brocades) je viac tepelne odolná ako peptidáza *M. pusillus*. Schopnosť zrážať mlieko, najmä v prípade *M. pusillus*, mierne závisí od prítomnosti vápnika⁸. Fromase je stabilná pri pH v rozsahu 3,0–6,5. Je to termolabilný enzým, ktorý je počas výroby syra inaktivovaný už pri bežných ohrevoch srvátky, takže nedochádza ku koagulácii pri zmiešaní srvátky s odstredeným mliekom³².

Chymozínový preparát, Maxiren[®] (Gist-brocades), získavaný z mliekárenskej kvasinky *Kluyveromyces lactis* je citlivý na teplotu. Optimum aktivity je v surovom mlieku s pH 6,6 dosahované pri teplote 42,5 °C a pri pasterizovanom mlieku s pH 6,5 pri teplote 45 °C. K jeho inaktivácii dochádza pri pasterizácii počas 15–16 s pri 72 °C (cit.³³).

3.4. Metalopeptidázy

Podobne ako aspartátové peptidázy ani metalopeptidázy počas štiepenia peptidových väzieb nevytvárajú kovalentné medziprodukty. Ich katalytický účinok je viacmenej spojený s koordináciou prítomného kovového iónu v enzýme. Týmto kovom je obvyčajne zinok. V niektorých prípadoch môže byť nahradený iným prechodným kovom. Kovový ión napomáha pri štiepení peptidovej väzby za prítomnosti molekuly vody najmä svojím silným elektrofilným charakterom. V natívnom enzýme je molekula vody koordinovaná k štvrtému tetraedrickému miestu (ďalšími ligandmi sú dva histidíny v karboxypeptidáze A,

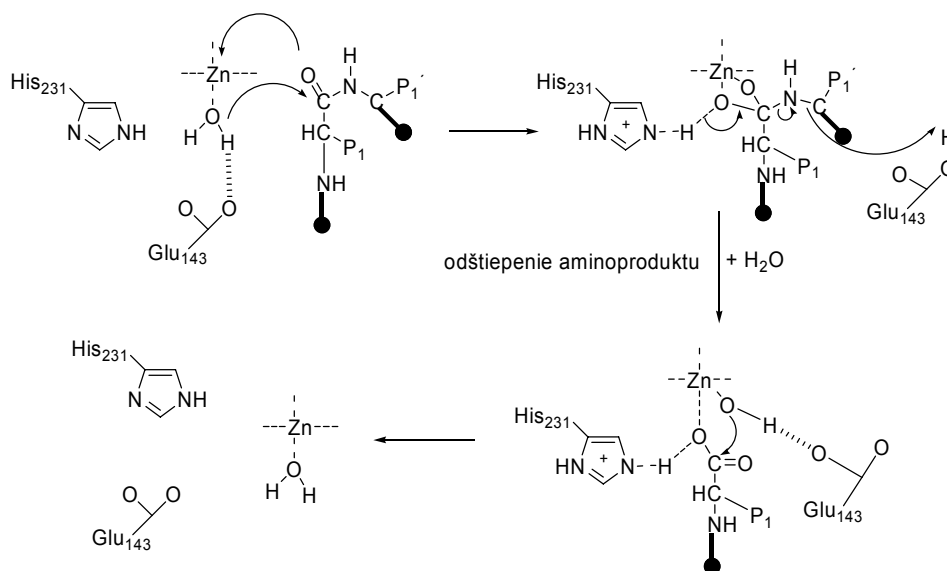
v termolyzine je to kyselina glutámová). Molekula vody je naviazaná vodíkovou väzbou na kyselinu glutámovú. Karboxylová skupina kyseliny glutámovej odoberá protón a zúčastňuje sa pri ataku tej istej molekuly vody na peptidovom karbonyle. Protón pochádzajúci z kyseliny glutámovej sa opäť presúva k východiskovému atómu dusíka, ktorý môže pochádzať z kyseliny glutámovej (obr.6, cit.⁹).

Metaloproteinázy tvoria zaujímavú skupinu enzýmov zodpovedných za progresiu chorôb asociovaných s degradáciou extracelulárneho matrixu. Z farmakologicky najvýznamnejších enzýmov tejto skupiny možno spomenúť matrilysin, kolagenázy a želatinázy rôzneho typu. Pre celú skupinu enzýmov tejto kategórie je spoločný katalytický mechanizmus využívajúci ión zinku koordinovaný tromi reziduami histidínu. Matrilysin [EC.3.4.24.23] je jeden z najmenších enzýmov tejto kategórie, ktorého aktivitu inhibuje inhibitor hydroxamátového typu³⁴. Ide o relatívne malý monomérny enzým s molekulovou hmotnosťou 18,7 kDa (170 reziduí). „Páskový model“ poukazuje na 7 oblastí štruktúry skladaného listu označených 1 až 7 a tri výrazné štruktúry α -hélixu. Optimálne pH tejto skupiny enzýmov sa pohybuje v rozmedzí hodnôt pH 5–9. Citlivé sú na chelatačné činidlá (EDTA). Serínové peptidázové inhibitory alebo tiolové činidlá neovplyvňujú ich aktivitu. Mnoho metalopeptidáz inhibovaných EDTA môže byť aktivovaných iónmi ako sú zinok, vápnik, kobalt. Z potravinárskeho hľadiska sú najznámejšie metalopeptidázy produkované baktériami a plesňami (Neutrase^{35–39}, termolyzín³¹) obsahujúce vo svojej molekule zinok, ktorý je nevyhnutný pre ich aktivitu. Vápnik je potrebný najmä na stabilizáciu ich proteínovej štruktúry. Množstvo vápnika v metalopeptidázach sa pohybuje od štyroch atómov na 1 molekulu termolyzínu z *Bacillus thermoproteolyticus* až po menej ako 0,2 atómu na molekulu enzýmu z *Aeromonas proteolytica*. Peptidáza mikroorganizmu *Bacillus ther-*

moproteolyticus termolyzín je stabilná v rozmedzí pH 5 až 10 pri teplote 80 °C. K inaktivácii nedochádza ani v 20% etanole a metanole. Pri teplote 4 °C ju môžeme uchovávať až niekoľko mesiacov⁶. Kyslé metalopeptidázy sa vyznačujú nižšími optimami pH (5–6) a molekulovými hmotnosťami (19–20 kDa). Vykazujú špecifickosť voči syntetickým peptidom a oxidovanému B-reťazcu inzulínu. Zaraďujú sa sem najmä peptidázy *Penicillium caseicola*, *P. roqueforti*, *Aspergillus sojae* a *A. oryzae*. Peptidázy *Penicillium* nie sú citlivé na fosforamidon, špecifický metalopeptidázový inhibitor.

Komerčné preparáty z *A. oryzae* používané v potravinárskom priemysle pri úprave vlastností múky⁴⁰, mäsa³¹, hydrolýze potravín¹⁹ obsahujú kyslé, neutrálne a alkalické peptidázy, ktoré sú aktívne v oblasti pH 4,0–4,5 a stabilné medzi pH 2,5 a 6,0. Štruktúra aktívneho centra je podobná aktívnemu centru pepsínu. *A. oryzae* produkuje dve neutrálne metalopeptidázy, ktoré sú inhibované sekvestračnými činidlami. Jeden z enzýmov vykazuje optimálnu aktivitu pri pH 7 a je stabilný v rozmedzí pH 5,5–12,0, ale ľahko sa inaktivuje pri teplote nad 50 °C. Druhá neutrálna metalopeptidáza má optimálnu aktivitu pri pH 5,5–6,0 a je pomerne termostabilná. Záhrevom pri 90 °C po 10 min stráca len 30 % svojej aktivity⁴¹. Potravinársky zaujímavou peptidázou produkovanou spomínaným mikroorganizmom je Flavorzyme[®] (Novo Nordisk), používanou pri hydrolýze sójovej odtučnenej múky⁴². Metalopeptidázy vo všeobecnosti prednostne katalyzujú hydrolýzu peptidov s hydrofóbnymi postrannými reťazcami, obsahujúcimi napr. fenylalanín a leucín. Vykazujú veľmi slabú esterázovú aktivitu.

Neutrálne metalopeptidázy sú špecifické voči hydrofóbnym a objemným aminokyselinovým zvyškom. Ich optimálne pH je 7 a ich veľkosť je medzi 30–40 kDa. Ich



Obr. 6. Schématické zobrazenie katalytického štiepenia peptidovej väzby v prítomnosti metalopeptidázy; P₁, P'₁ – zvyšky aminokyselín postranných reťazcov

najväčšími producentami sú bacily a *Aspergillus* species. Neutrálne proteázy typu *Aspergillus* species sa v potravinárstve používajú na odstraňovanie horkej chuti hydrolyzáto^{41,43}. Najznámejšou neutrálnou metalopeptidázou je termolyzín produkovaný *Bacillus thermoproteolyticus*. Je stabilný do 80 °C. Jeho molekula obsahuje zinok, ktorý je viazaný dvoma zvyškami histidínu a jedným glutamátovým zvyškom. Aktívne miesto tvorí 6 aminokyselín, ktoré obklopujú atóm zinku. V jeho štruktúre sa nachádzajú aj 4 atómy vápnika zodpovedné za termostabilitu enzýmu. Termolyzín obsahuje 316 aminokyselín a jeho molekulová hmotnosť je 34,4 kDa.

Alkalické peptidázy sú produkované baktériami *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens*. Sú širokospecifické s pH optimom 7 a o málo väčšie ako ostatné metalopeptidázy (48–60 kDa).

Myxobacter peptidáza I má molekulovú hmotnosť 14 kDa a optimálne pH 9. Je špecifická voči malým aminokyselinovým zvyškom na obidvoch koncoch štiepeného polypeptidového reťazca. Táto peptidáza je schopná lyzovať bunkové steny *Arthrobacter crystallopoites* a iných grampozitívnych baktérií. β -lytická peptidáza pochádzajúca zo *Sorangium* species obsahujúca zinok je špecifická voči oxidovanej forme B-reťazca inzulínu.

Myxobacter-peptidáza II s molekulovou hmotnosťou 17 kDa a optimálnym pH 8,5–9 je špecifická pre lyzínové zvyšky na N-konci štiepeného reťazca, ale nemá schopnosť lyzovať bakteriálne bunky. Je stabilná pri pH 3–9 a teplote 50 °C počas 18 h (cit.⁸).

4. Záver

Proteolytické enzýmy majú dôležité praktické uplatnenie v rôznych oblastiach potravinárskeho aj iného priemyslu. Sú významné tiež z medicínskeho hľadiska.

Podľa Názvoslovného výboru IUBMB (Medzinárodná únia pre biochémiu a molekulárnu biológiu) sa proteolytické enzýmy od roku 1992 označujú ako peptidázy.

Článok pojednáva o nomenklatúre, rozdelení týchto enzýmov, ich štruktúrach, stabilite, mechanizme katalýzy a ďalších biochemických parametroch významných pre farmakologické, potravinárske a iné aplikácie.

LITERATÚRA

- Adler-Nissen J.: *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, Londýn 1986.
- Grassmann W., Dykerhoff H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 179, 41 (1928).
- Rawlings N. D., Barret A. J.: *Methods Enzymol.* 224, 461 (1994).
- Rawlings N. D., Barret A. J.: *Methods Enzymol.* 248, 105 (1995).
- Rawlings N. D., Barret A. J.: *Nucl. Acids Res.* 27, 325 (1999).
- Lowe C. R., Dean P. D.: *Afininí chromatografie*. STNL, Praha 1979.
- Shroomburg D., Salzman M.: *Enzyme Handbook 5. Class 3: Hydrolases*. Springer-Verlag, Berlín 1991.
- Kalitz H. M.: *Microbial Proteinases*. Springer-Verlag, Berlín 1988.
- Beyon R., Bond J. S.: *Proteolytic Enzymes*. Oxford University Press, New York 2001.
- Mangel W. F., Singer P. T., Cyr D. M., Umland T. C., Toledo D. L., Stroud R. M., Pflugrath J. W., Sweet R. M.: *Biochemistry* 29, 8351 (1990).
- Novo Nordisk A/S: *Product Sheet B 562b-GB 500* 1997.
- Bonomi F., Iametti S., Rasmussen P., Restani P., Rovere P.: *High Press. Res.* 19, 175 (2000).
- Popineau Y., Pineau F., Evon P., Bérot S.: *Nahrung* 43, 361 (1999).
- Vitale L., Škrtić I., Abramić, M.: *Arch. Microbiol.* 165, 409 (1996).
- Qiu X., Padmanabhan K. P., Carperos V. E., Tulinsky A., Kline T., Maraganore J. M., Fenton J. W.: *Biochemistry* 31, 11689 (1992).
- Mietsch F., Fehér J., Halasz A.: *Nahrung.* 33, 9 (1989).
- Kristinsson H. G., Rasco B. A.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40, 43 (2000).
- Novo Nordisk A/S: *Product Sheet B 318d-GB 500* 1998.
- Wu Y. F., Baek H. H., Gerard P. D., Cadwallader K. R.: *J. Food Sci.* 65, 1220 (2000).
- Karam J., Nicell, J. A.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69, 141 (1997).
- Hayakawa K., Ueno Y., Nakanishi S.: *J. Soc. Ferment. Bioeng.* 71, 245 (1993).
- Turk D., Podobnik M., Popovic T., Katunuma N., Bode W., Huber R., Turk V.: *Biochemistry* 34, 4791 (1995).
- Prates J. A., Ribeiro A. M., Correia A. A.: *Meat Sci.* 57, 283 (2001).
- Fernandez-Espia M. D., Rul F.: *Eur. J. Biochem.* 263, 502 (1999).
- Ortiz S. E. M., Añón M. C.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 77, 1293 (2000).
- Lieske B., Konrad G.: *Int. Dairy J.* 6, 359 (1996).
- Lukáčová V., Zemanovič, J.: *Bull. Food Res.* 1, 19 (1998).
- James J., Simpson B. K.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 437 (1996).
- Fernández M., Ordóñez J. A., Bruna J. M., Herranz B., Hoz L.: *Trends Food Technol.* 11, 201 (2000).
- Krohn A., Redshaw S., Ritchie J. C., Graves B. J., Hatada M. H.: *J. Med. Chem.* 34, 3340 (1991).
- Olsen H. S.: *Enzymes in Food Processing*. Verlag Chemie, Weinheim 1995.
- Gist-brocades, Delft Holland: *Fromase*, 1994.
- Gist-brocades, Delft Holland: *Maxiren*[®], 1994.
- Browner M. F., Smith W. W., Castelhana A. L.: Bio-

- chemistry 34, 6602 (1995).
35. Zapelana M. J., Zalacain I., Paz de Peña M., Astiasarán I., Bello J.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 472 (1997).
 36. Picón A., Medina M.: *Food Chem.* 52, 411 (1995).
 37. Hwang J. Y., Shueb Y. S., Chang H. M.: *Food Res. Int.* 34, 639 (2001).
 38. Parka S. Y., Gibbs B. F., Leea B. H.: *Food Res. Int.* 28, 43 (1995).
 39. Gomes A. M., Malcata F. X., Klaver F. A.: *J. Dairy Sci.* 81, 2817 (1998).
 40. Drago S. R., Gonzalez R. J.: *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1, 269 (2001).
 41. Kanekanian A., Gallagher J., Evans E. P.: *Int. J. Dairy Technol.* 53, 1 (2000).
 42. Lee J. Y., Lee H. D., Lee Ch. H.: *Food Res. Int.* 34, 217 (2001).
 43. Saha B. C., Hayashi K.: *Biotechnol. Adv.* 19, 355 (2001).

M. Hřčková^a, E. Šturdík^b, T. Maliar^c, and J. Zemanovič^a (^a*Department of Food Technology*, ^b*Department of Biochemical Technology*, Faculty of Food and Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic, ^c*VUML, Drug Research Institute, Inc., Modra, Slovak Republic*): **Biochemical Properties of Proteolytic Enzymes**

Classification and nomenclature of proteolytic enzymes (peptidases) and their biochemical properties are described. Peptidases catalyze hydrolysis of peptide bonds in proteins and thus significantly affect nutritional, sensoric and textural properties of food proteins in raw materials, intermediates and end products. They found application in pharmacological research as well as in washing powders, textile and leather industry, cosmetics, etc. Good knowledge of their properties, as well as their optimal processing parameters and enzyme specificity are essential for their successful applications both in research and industry.

Dovolte mi, abych Vás upozornil na nově vycházející knihu, kterou vydává Katedra organické chemie PřF UP v Olomouci ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AVČR a vydavatelstvím UP v Olomouci

Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik

autora pana **doc. RNDr. Antonína Holého, Dr.Sc., Dr.h.c.**

Blíže informace o této knize najdete na adrese www.orgchem.upol.cz

doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.
Katedra organické chemie PřF UP Olomouc

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

METODIKA ŘEŠENÍ SYSTÉMU NÁSLEDNÝCH REAKCÍ PRVNÍHO A PSEUDOPRVNÍHO ŘÁDU Z ČASOVÉHO ZÁZNAMU UV-VIS SPEKTER

JIŘÍ HANUSEK^a a JAN SVOBODA^b

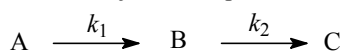
^a Katedra organické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. legií 565, ^b Společná laboratoř chemie pevných látek ÚMCH AV ČR a Univerzity Pardubice, Studentská 84, 532 10 Pardubice
jiri.hanusek@upce.cz, jan.svoboda@upce.cz

Došlo 20.10.03, přijato 25.3.04.

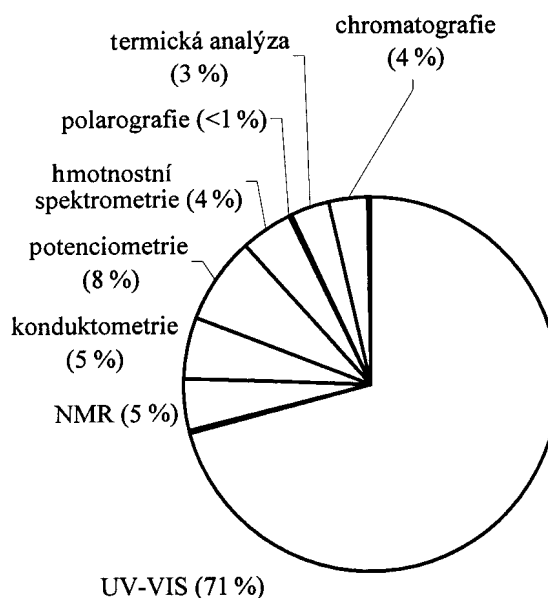
Klíčová slova: kinetika, následné reakce, nelineární regrese, citlivostní analýza

Úvod

Jako následné se označují takové reakce, které probíhají ve více na sebe přímo navazujících stupních, přičemž meziprodukt vzniklý v prvním stupni je výchozí látkou pro stupeň druhý atd. Pro tyto systémy platí, že v jejich průběhu postupně narůstá a potom klesá koncentrace meziproduktu; přitom koncentrace meziproduktu není zanedbatelná ve srovnání s koncentracemi výchozích reaktantů a produktů¹. Tento časový průběh koncentrací reagujících složek však není charakteristický pouze pro reakce následné – vykazuje jej i systém dvou paralelních reakcí s jedním vratným stupněm. Nejjednodušším případem následné reakce je dvoustupňová nevratná reakce,



u níž každý stupeň probíhá jako reakce prvního resp. pseudoprvního řádu. Je-li hodnota rychlostní konstanty druhého stupně k_2 o více než 2 řády nižší než prvního stupně k_1 anebo naopak, lze obě reakce studovat odděleně². V případě, že oba stupně mají srovnatelné nebo dokonce stejné rychlostní konstanty, což je jev v chemii velice častý, komplikuje se optimalizace syntézy požadovaného meziproduktu, který není za daných podmínek zcela stabilní a podléhá následnému rozkladu³, nebo se studium reakčních mechanismů kinetickými metodami znesnadňuje^{4,5}. Na druhé straně kinetické systémy zahrnující dva po sobě jdoucí stupně nabývají velkého významu při studiu farmakokinetiky, pro kterou je často simulován model postihující absorpci a eliminační procesy léčiva v organismu. Ke sledování těchto modelových procesů se



Obr. 1. Experimentální techniky používané pro získávání kinetických dat v pracích publikovaných v roce 2002 (uvedeny pouze práce uvádějící použitou techniku v souhrnu)

často využívá kinetické analýzy, která je charakteristická vysokou citlivostí, selektivitou a adaptabilitou.

Z přístrojového hlediska se pro sledování kinetik reakcí v kapalných soustavách používá nejčastěji UV-VIS spektrofotometrie. Odhaduje se¹, že je použita v cca 80–90 % publikovaných pracích – zbylých 10–20 % pak připadá na IČ a NMR spektroskopii, chromatografii, konduktometrii a potenciometrii a v tuhé fázi pak na metody termické analýzy.

Pro systémy sledované UV-VIS spektrofotometrií bylo v minulosti navrženo několik metod získání rychlostních konstant obou reakčních stupňů resp. molárního absorpčního koeficientu meziproduktu. Tyto metody lze principiálně rozdělit do dvou skupin, a to na metody využívající linearizaci dat a jejich vyhodnocení při jedné nebo více vlnových délkách lineární regrese a na metody vycházející z nijak neupravených dat vyhodnocovaných nelineární regrese opět při jedné resp. více vlnových délkách.

Společným prvkem všech početních metod⁶ pro výběr kinetické rovnice resp. určení rychlostních konstant je vhodné kritérium přiléhavosti vypočtených závislostí k experimentálním bodům. Nejčastěji se jako toto kritérium volí součet čtverců odchylek vypočtených (y_i') a naměřených (y_i) hodnot závisle proměnné přes všechny provedené pokusy (N). Pro zkoumanou kinetickou rovnici se hledají takové hodnoty konstant, aby tento součet byl minimální. Přesně vzato, toto kritérium poskytuje nejlepší

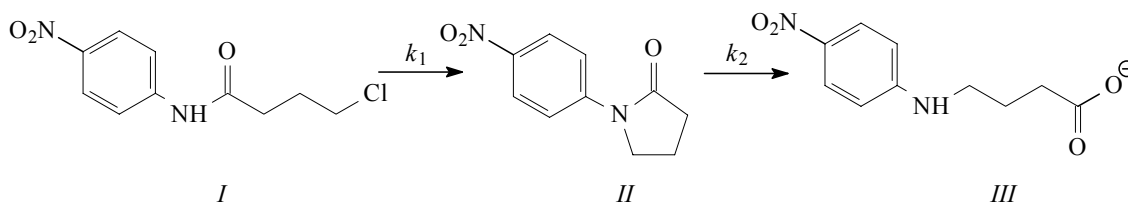
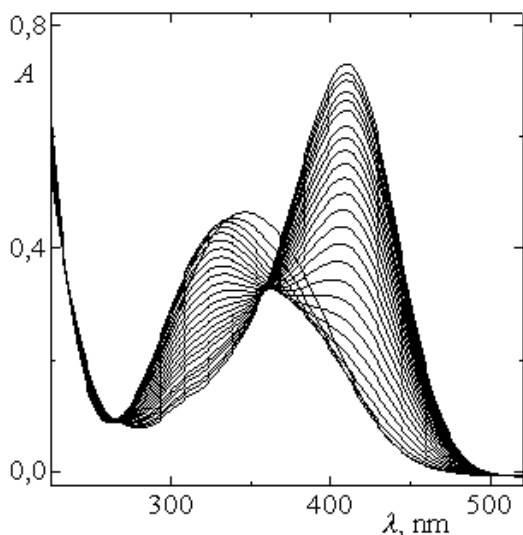
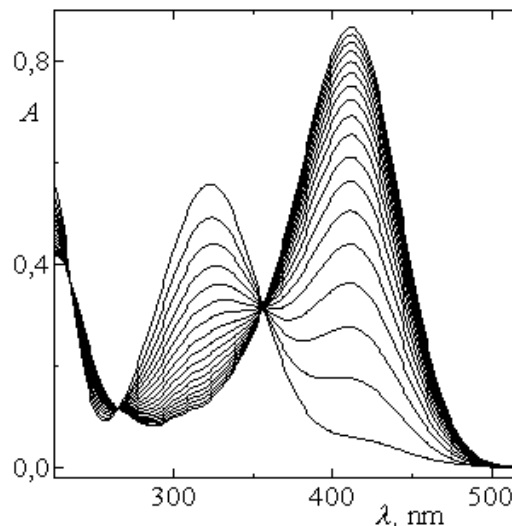


Schéma 1. Studovaná následná reakce

hodnoty konstant jen tehdy, když je veličina y v celém rozsahu zatížena stejnou chybou. Jsou-li však rozptyly měření navzájem závislé, což nastává v případě použití stejné analytické metody zjišťování koncentrací, je správnější⁶ použít minimalizaci hodnoty determinantu matice $\mathbf{M} = \{m_{i,j}\}$ kde $m_{i,j} = \Sigma (y'_{i,k} - y_{i,k}) \cdot (y'_{j,k} - y_{j,k})$ a $k \in \{1 \dots N\}$. y' resp. y odpovídá vypočtené resp. změřené hodnotě koncentrace i -té složky j -tého reakčního stupně v k -tém pokusu. V případě měření závislosti absorbance celé směsi na čase však nejsme schopni podobnou matici sestavit – existuje nekonečné množství lineárních kombinací součinů absorpčních koeficientů a koncentrací jednotlivých složek se stejnou celkovou absorbancí.

Experimentální část

V tomto článku budou všechny popisované metody demonstrovány na systému (Schéma 1) následné reakce⁵ 4-chlor-*N*-(4-nitrofenyl)butanamidu (*I*) který v alkalickém prostředí cyklizuje na 1-(4-nitrofenyl)pyrrolidin-2-on (*II*) rozkládající se za stejných podmínek na sůl 4-(4-nitroanilino)butanové kyseliny (*III*). Protože se v tomto případě podařilo za použití dvoufázového systému izolovat mezi-

Obr. 2. Spektrální záznam následné reakce $I \rightarrow II \rightarrow III$ v 1 M roztoku NaOHObr. 3. Spektrální záznam reakce $II \rightarrow III$ v 1 M roztoku NaOH

produkt *II*, bylo možné porovnat změřenou a optimalizovanou pozorovanou rychlostní konstantu k_2 .

Jako analytické metody pro studium následné reakce $I \rightarrow II \rightarrow III$ resp. $II \rightarrow III$ (Schéma 1) bylo použito UV-VIS spektrofotometrie. Systém byl sledován za podmínek pseudoprvního řádu ($[I]_0 \approx 5.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) při teplotě 25 °C ve vodném roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1,0 mol.l⁻¹. Spektrální záznam byl snímán v osmisesekundových až desetisekundových intervalech na přístroji HP UV-VIS 8453 Diode Array (obr. 2 a 3).

Výsledky a diskuse

Matematický popis systému následných reakcí

Změny koncentrací jednotlivých složek jsou definovány diferenciálními kinetickými rovnicemi:

$$\frac{d[I]}{dt} = -k_1[I] \quad (1)$$

$$\frac{d[II]}{dt} = k_1[I] - k_2[II] \quad (2)$$

$$\frac{d[III]}{dt} = k_2[II] \quad (3)$$

$$\frac{d[I]}{dt} + \frac{d[II]}{dt} + \frac{d[III]}{dt} = 0 \quad (4)$$

Jejich integrací při počátečních podmínkách $[I]_0 = 0$ a $[III]_0 = 0$ a za předpokladu, že $k_1 \neq k_2$ nebo si nejsou blízké, získáme rovnice:

$$[I] = [I]_0 \cdot e^{-k_1 t} \quad (5)$$

$$[II] = [I]_0 \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot [e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}] \quad (6)$$

$$[III] = [I]_0 \left(1 + \frac{k_1 e^{-k_2 t} - k_2 e^{-k_1 t}}{k_2 - k_1} \right) \quad (7)$$

Z integrálních kinetických rovnic (5) až (7) získáme pro absorbanci A_t^λ reakčního roztoku při vlnové délce λ v libovolném čase t po dosazení do Lambertova-Beerova zákona (8) vztah (9):

$$A_t^\lambda = \varepsilon_I^\lambda [I] + \varepsilon_{II}^\lambda [II] + \varepsilon_{III}^\lambda [III] \quad (8)$$

$$A_t^\lambda = [I]_0 \left\{ (\varepsilon_I^\lambda - \varepsilon_{III}^\lambda) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\varepsilon_{II}^\lambda - \varepsilon_{III}^\lambda) e^{-k_1 t} - \left[\frac{k_1}{k_2 - k_1} (\varepsilon_{II}^\lambda - \varepsilon_{III}^\lambda) e^{-k_2 t} + \varepsilon_{III}^\lambda \right] \right\} \quad (9)$$

Hodnoty ε_I^λ , ε_{II}^λ , $\varepsilon_{III}^\lambda$ jsou molární absorpční koeficienty látek *I*, *II* a *III* při dané vlnové délce. Protože na konci reakce (v čase t_∞) je v reakční směsi přítomna pouze látka *III*, je absorbance $A_\infty^\lambda = \varepsilon_{III}^\lambda [I]_0$. Rovnici (9) lze pak napsat v obecně platném tvaru (10):

$$A_t^\lambda - A_\infty^\lambda = M \cdot e^{-k_1 t} + N \cdot e^{-k_2 t} \quad (10)$$

M a *N* jsou konstanty, které zahrnují rychlostní konstanty k_1 a k_2 a molární absorpční koeficienty reagujících komponent.

Jsou-li konstanty k_1 a k_2 stejné, neplatí rovnice (6) až (10), protože nejsou splněny podmínky nutné k integraci diferenciálních rovnic. Pokud jsou hodnoty k_1 a k_2 blízké, nastávají problémy numerického rázu, které lze překonat vhodnou strategií – náhradou $k_2 = k_1 + \Delta k$ a rozvinutím rovnic (6) a (7) v Taylorovu řadu, což pro $\Delta k \rightarrow 0$ poskytnou rovnice⁷:

$$[II] = [I]_0 k \cdot t \cdot e^{-k \cdot t} \quad (11)$$

$$[III] = [I]_0 (1 - (1 + k \cdot t) e^{-k \cdot t}) \quad (12)$$

Ke stejnému výsledku lze dospět rovněž aplikací l'Hôpitalova pravidla na řešení limit rovnic (6) a (7) pro $k_1 \rightarrow k_2$, resp. na základě citlivostní analýzy. Další výhodou citlivostní analýzy je možnost nalezení vhodného způsobu provádění experimentů, tj. měření ve vhodném rozsahu koncentrací a kombinací jejich velikostí, zejména pak u reakcí druhého řádu, kde jsou hodnoty rychlostních konstant závislé na koncentraci. Při sledování absorbance reakční směsi je však experiment limitován rozsahem měřitelných absorbancí (nejlépe v intervalu 0,2–0,8). Vzhledem k neznámým molárním absorpčním koeficientům jednotlivých složek a k sledování reakce za podmínek pseudoprvního řádu (rychlostní konstanty nezávisí na koncentraci výchozích látek), není potřeba provádět analýzu citlivostních funkcí vzhledem k parametrům *M* a *N* z rovnice (10). Nicméně je třeba na analýzu citlivostních funkcí pamatovat, a to zejména v případě řešení složitějších následných reakcí, kde by byly hodnoty pozorovaných rychlostních konstant blízké a bylo by možné určit alespoň některé hodnoty molárních absorpčních koeficientů.

V ý p o č e t r y c h l o s t n í c h k o n s t a n t z l i n e a r i z o v a n ý c h d a t

Nejjednodušší a nejstarší způsob určování^{8,9} obou rychlostních konstant k_1 a k_2 vychází z kinetické křivky při vlnové délce, při které je celková změna absorbance co největší a kde molární absorpční koeficienty zúčastněných látek jsou rozdílné – tj. mimo oblasti isosbestických bodů. Těto podmínce nejlépe vyhovuje vlnová délka 405 nm (obr. 2). Kinetickou křivku pak linearizujeme logaritmováním rozdílu $\ln(A_t^\lambda - A_\infty^\lambda)$ resp. $\ln(A_\infty^\lambda - A_t^\lambda)$ a vynesemím těchto logaritmu proti času *t*. Tím získáme pro danou vlnovou délku částečně linearizovanou závislost, z jejíž lineární části (v našem případě pro $t > 250$ s) určíme menší z obou rychlostních konstant. Větší rychlostní konstantu získáme z nelineární části závislosti (v našem případě pro $t < 100$ s) logaritmováním $\ln[A_t^\lambda - (A_\infty^\lambda - A_t^\lambda)]$, kde A_t^λ představuje absorbanci získanou lineární extrapolací nelineární části závislosti. Tato metoda je v současnosti vhodná spíše k orientačnímu zjištění rychlostních konstant obou stupňů a získané hodnoty lze použít jako výchozí pro nelineární regresi (tab. I). Pro srovnání je uvedena (tab. II) i rychlostní konstanta reakce *II* → *III* při 405 nm měřená z nezávisle získaného meziproductu.

Tabulka I

Hodnoty rychlostních konstant získané linearizací při $\lambda = 405$ nm

Regresní charakteristika	Pomalejší reakce (II → III)	Rychlejší reakce (I → II)
<i>k</i> , s ⁻¹	5,51 · 10 ⁻³	1,75 · 10 ⁻²
<i>s(k)</i> , s ⁻¹	6,89 · 10 ⁻⁶	8,43 · 10 ⁻⁵
Relativní chyba, %	0,125	0,482
Poločas, s	125,8	39,6

Tabulka II
Regresní charakteristiky pro kinetickou křivku reakce $I \rightarrow III$ při 405 nm

Parametr	Hodnota
k, s^{-1}	$6,17 \cdot 10^{-3}$
$s(k), s^{-1}$	$5,56 \cdot 10^{-5}$
Relativní chyba, %	0,90
Poločas, s	112,3
Reziduální směrodatná odchylka, s^{-1}	$5,46 \cdot 10^{-4}$

Tabulka III
Regresní charakteristiky pro kinetickou křivku reakce $I \rightarrow II \rightarrow III$, měřenou v intervalu $\lambda = 319\text{--}349$ nm a $399\text{--}500$ nm

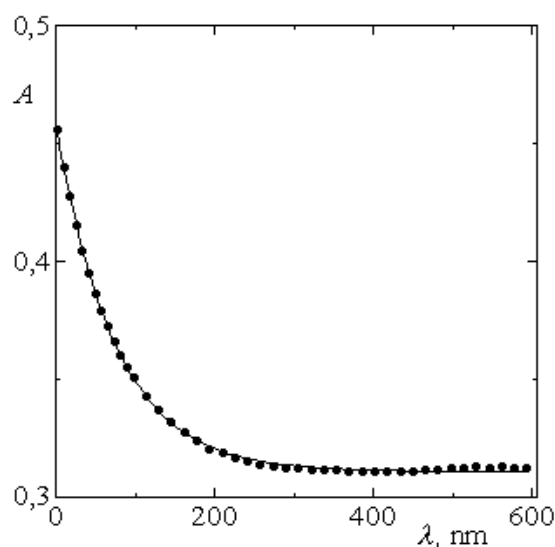
Regresní charakteristika	Pomalejší reakce ($II \rightarrow III$)	Rychlejší reakce ($I \rightarrow II$)
k, s^{-1}	$5,63 \cdot 10^{-3}$	$1,68 \cdot 10^{-2}$
$s(k), s^{-1}$	$4,47 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-3}$
Relativní chyba, %	7,94	6,55
Poločas, s	123,1	41,3

V předchozím odstavci byla vybrána pouze jedna vlnová délka, při níž byly vypočteny rychlostní konstanty. Je však vhodné odstranit subjektivní výběr vlnové délky a zabývat se výpočtem z celých časových záznamů spekter. I v tomto případě je však třeba zohlednit oblasti isobestických bodů, ve kterých metoda výpočtu selhává a poskytuje naprosto chybné hodnoty rychlostních konstant. Pro ilustraci jsou uvedeny rychlostní konstanty získané z oblastí vlnových délek 319–349 a 399–500 nm. Tento výběr byl proveden na základě hodnot modelovací síly, jak bude blíže vysvětleno v kapitole Nelineární metody. Výsledky jsou shrnuty v tabulce III.

Z hodnot v tabulce III vyplývá, že oproti výsledkům pro jednu vlnovou délku (tab. I) se vypočtené hodnoty mírně zlepšily. Hodnoty směrodatných odchylek jsou zde relativně horší, protože ty v tomto případě znamenají směrodatné odchylky od aritmetického průměru rychlostních konstant pro všechny vlnové délky na rozdíl od hodnot v tab. I představujících odchylky pro daný parametr jediné lineární regrese.

Metoda měření v isobestickém bodě

Jak je patrné ze spektrálního záznamu reakce $II \rightarrow III$ (obr. 3), odpovídá isobestický bod reakce (tj. bod, při kterém jsou molární absorpční koeficienty výchozí látky II a produktu III stejné) vlnové délce 356 nm. Měřením následné reakce $I \rightarrow II \rightarrow III$ při této vlnové délce získáme



Obr. 4. Kinetická křivka reakce $I \rightarrow II$ měřená v isobestickém bodě při $\lambda = 356$ nm

Tabulka IV
Regresní charakteristiky pro kinetickou křivku reakce $I \rightarrow II$ měřenou v isobestickém bodě ($\lambda = 356$ nm)

Parametr	Hodnota
k_1, s^{-1}	$1,36 \cdot 10^{-2}$
$s(k_1), s^{-1}$	$9,40 \cdot 10^{-5}$
Relativní chyba, %	0,692
Poločas, s	51,1
Reziduální směrodatná odchylka, s^{-1}	$9,36 \cdot 10^{-4}$

kinetickou křivku (obr. 4) odpovídající pouze reakci $I \rightarrow II$, a z ní hodnotu rychlostní konstanty k_1 (tab. IV).

Tato hodnota představuje nejlepší odhad rychlostní konstanty prvního reakčního stupně a jak je patrné z tabulky II uvedené u linearizace, je cca o 29 % nižší než rychlostní konstanta k_{\max} .

Nelineární metody

Vyhodnocením kinetických dat bez jejich linearizace se zabývá velké množství prací, přičemž jako kritéria přiléhavosti se opět používá nejmenší součet čtverců odchylek změřené a vypočtené veličiny. Metody hledání tohoto součtu jsou např. derivační Gaussova-Newtonova metoda¹⁰, jejíž nevýhodou je nutnost počátečního relativně přesného odhadu parametrů¹¹ nebo metoda¹² na bázi Hartleyova algoritmu¹³. S výhodou lze rovněž použít kombinace různých metod, jako je tomu např. u komerčního software¹⁴ OPgm (kombinace nederivační simplexové^{15,16} a derivační Le-

venbergovy-Marquardtovy metody¹⁷), použitého ke zpracování kinetických dat v tomto článku. Další metody jsou popsány v literatuře^{18,19}. Všechny tyto práce mají společné, že optimalizují hodnoty těchto rychlostních konstant z kinetické křivky příslušející pouze jedné vlnové délce zpravidla odpovídající celkové maximální změně absorbance resp. jiné lineárně závislé veličiny reagujícího systému (jednoduchá nelineární regrese). Tento subjektivní výběr je v některých případech očividný, avšak z obecného hlediska je mnohem spolehlivějším přístupem výpočet rychlostních parametrů z celých záznamů spekter na čase. Tento postup byl v literatuře²⁰ rovněž popsán a na jeho základě byl vytvořen i komerčně dostupný software²¹ Pro-K dodávaný spolu s produkty firmy Applied Photophysics.

Náš přístup spočívá v optimalizaci (program OPgm, cit.¹⁴) obou rychlostních konstant při subjektivně zvolených hodnotách vlnových délek 405 nm a 235 nm a jejich porovnání se správnými hodnotami konstant, získanými měřeními v isosbestickém bodě ($k_{\max} = k_1$) v reakci $I \rightarrow III$ ($k_{\min} = k_2$). Výsledky spolu s regresními charakteristikami jsou shrnuty v tabulce V.

Z uvedených hodnot je zřejmé, že se pozorované rychlostní konstanty získané optimalizačním postupem více blíží „správným“ hodnotám pozorovaných rychlostních konstant, získaných z měření odděleného druhého stupně a měření reakce v isosbestickém bodě. Přes poměrně dobré proložení experimentálních hodnot absorbance v čase modelovou rovnicí pro obě vlnové délky je vidět, že se hodnoty pozorovaných rychlostních konstant při jednotlivých vlnových délkách liší. Proto se nabízí otázka, jak zjistit, které vlnové délky je nejlepší použít k určení hodnot pozorovaných rychlostních konstant. Jedním z možných postupů je použít metodu hlavních komponent²², používanou k redukci počtu sloupců datové matice. V našem pří-

Tabulka V

Regresní charakteristiky jednoduché nelineární regrese pro kinetickou křivku následné reakce $I \rightarrow II \rightarrow III$ při $\lambda = 325$ a 405 nm

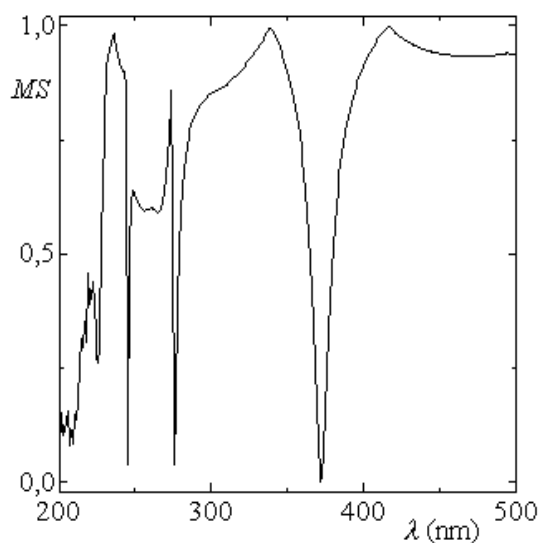
Regresní charakteristika	$\lambda = 405$ nm	$\lambda = 325$ nm
k_1, s^{-1}	$5,74 \cdot 10^{-3}$	$5,84 \cdot 10^{-3}$
$s(k_1), s^{-1}$	$3,64 \cdot 10^{-5}$	$1,94 \cdot 10^{-4}$
Relativní chyba, %	0,63	3,32
Poločas, s	120,8	118,7
Reziduální směrodatná odchylka, s^{-1}	$6,34 \cdot 10^{-4}$	$1,60 \cdot 10^{-3}$
k_2, s^{-1}	$1,50 \cdot 10^{-2}$	$1,43 \cdot 10^{-2}$
$s(k_2), s^{-1}$	$1,58 \cdot 10^{-4}$	$7,34 \cdot 10^{-5}$
Relativní chyba, %	1,06	5,12
Poločas, s	46,2	48,5
Reziduální směrodatná odchylka, s^{-1}	$6,34 \cdot 10^{-4}$	$1,68 \cdot 10^{-3}$

padě je matice tvořena z hodnot změřených absorbancí. Řádky matice tvoří jednotlivé časy měření spekter a sloupce pak přísluší jednotlivým vlnovým délkám. Cílem metody hlavních komponent je určit, kolika na sobě lineárně nezávislými sloupci vypočítané matice \mathbf{T} lze popsat celkovou variabilitu všech sloupců zdrojové matice \mathbf{X} . Toho lze docílit rozkladem matice \mathbf{X} podle schématu $\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}$, kde \mathbf{X} je zdrojová matice dat o N řádcích a M sloupcích, \mathbf{T} je matice latentních proměnných („score“ matice) o N řádcích a obsahuje P sloupcových vektorů \mathbf{t} označovaných jako hlavní komponenty. Matice \mathbf{P} se nazývá matice zátěží nebo také „loadings“. Obsahuje M řádků a P sloupcových vektorů \mathbf{p} . Jednotlivé sloupcové vektory matice \mathbf{P} představují míru příspěvku příslušné latentní proměnné k popisu variability sloupců zdrojové matice. Matice \mathbf{E} je rozměrem shodná se zdrojovou maticí a obsahuje nevysvětlenou variabilitu. Rozkladem zdrojové matice dat na matici latentních proměnných a na matici zátěží získáme matici \mathbf{T} o podstatně nižším počtu sloupců P . Statistickou analýzou lze pak určit, jaká je míra lineární závislosti vypočtených vektorů \mathbf{t} na jednotlivých sloupcích zdrojové datové matice. V našem případě se určí, kolika různými způsoby závisí absorbance na čase. První vektor \mathbf{t}_1 reprezentuje v našem případě jakousi průměrnou změnu absorbance v čase, vypočtenou ze všech vlnových délek zdrojové matice. Jde však o změnu absorbance se shodným trendem. Pro neshodný trend, například oblasti kolem isosbestických bodů, mají jednotlivé příspěvky do výsledného vypočítaného vektoru podstatně nižší váhu. Tyto oblasti pak popisuje další vektor latentní proměnné \mathbf{t}_2 . Rozkladů zdrojové matice podle shora uvedeného postupu lze provést nekonečně mnoho, tyto rozklady jsou však navzájem lineárně transformovatelné. Důležitou vlastností rozkladu je, že se vždy na příslušné latentní proměnné izoluje shodné množství variability původní zdrojové matice. Z této skutečnosti vyplývá, že vypočtený vektor latentní proměnné \mathbf{t}_1 je lineárně závislý na vektorech zdrojové matice (změna absorbance v čase při jednotlivých vlnových délkách). I když je vypočtený a neodpovídá tudíž skutečným hodnotám absorbance, má však smysl změny absorbance v čase (výše zmíněná lineární závislost). Rychlostní konstanty jsou v naší optimalizační rovnici nelineárními parametry, a proto se jejich hodnoty lineární transformací ve smyslu metody hlavních komponent nezmění. Pro vyšší přesnost matematického zpracování je výhodné provést výpočet dvakrát. Poprvé s použitím kompletního spektrálního záznamu (všech vlnových délek 200–500 nm) a podruhé s vyloučením těch vlnových délek, jejichž modelovací síla je nižší než 90 %. Modelovací síla (MS) je užitečnou charakteristikou, která vychází z matice latentních proměnných a z matice zátěží ($I3$).

$$M = 1 - \frac{1}{N - P - 1} \sum_{k=1}^N e_{ik}^2 \quad (13)$$

$$s_{i0}$$

kde s_{i0} znamená směrodatnou odchylku i -tého sloupce zdrojové matice \mathbf{X} a e_{ik} je klasické reziduum z matice \mathbf{E} .

Obr. 5. Závislost modelovací síly MS na vlnové délce λ .

Změna modelovací síly s vlnovou délkou je zřejmá z obrázku (obr. 5). Modelovací síla má význam míry společné variability vektoru latentních proměnných a i -tého sloupce zdrojové matice. Lze ji tedy použít jako kritérium pro vyloučení oblastí vlnových délek nevhodných pro optimalizaci rychlostních konstant následných reakcí. Jak je vidět ze záznamu prvního výpočtu metodou hlavních komponent (PCA), modelovací síla je nízká právě v oblasti isobestických bodů, jejichž vlnové délky byly určeny již na první pohled jako nevhodné pro optimalizaci. Naopak vlnové délky, při nichž je modelovací síla maximální a jsou tedy pro výpočet nejvhodnější, jsou $\lambda = 339$ nm ($MS = 0,996$) a $\lambda = 416$ nm ($MS = 0,999$).

Výsledky pozorovaných rychlostních konstant určených optimalizací časových závislostí vypočtených vektorů \mathbf{t}_1 získaných rozkladem matic sestavených z vlnových délek jsou: A pro data 319–349 nm a 399–500 nm, B pro data 319–349 nm a C pro data 399–500 nm.

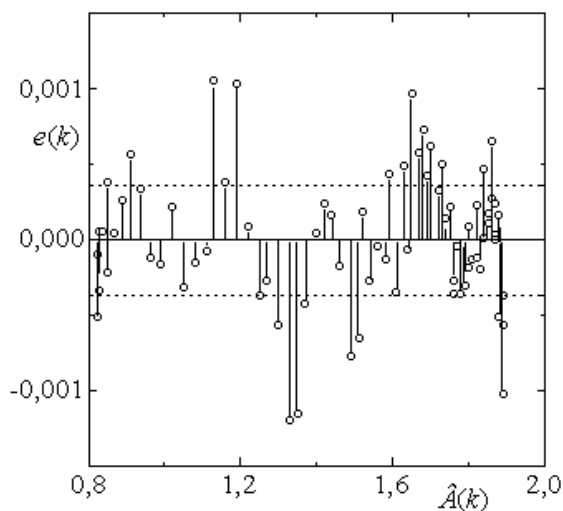
Jak je vidět, jsou vypočtené hodnoty rychlostních konstant velmi blízké hodnotám získaným při subjektivně zvolených vlnových délkách. Na rozdíl od těchto hodnot se však vyznačují mnohem lepšími výsledky regresní diagnostiky nelineární regrese. Kvalitu nelineární regrese můžeme posoudit na základě hodnot směrodatných odchylek (tab. VI) odhadovaných parametrů, reziduálních sum čtverců a reziduálních standardních odchylek celé regrese.

O kvalitě proložení experimentálních bodů svědčí nejlépe hodnoty reziduálních směrodatných odchylek. Někdy se však podaří pro různé modely docílit podobných hodnot statistických charakteristik, např. u směrodatných odchylek. Důležitým předpokladem pro vhodnost regresního modelu je konstantní a konečný rozptyl chyb v datech, která se za těchto podmínek nazývají homoskedastická. O homoskedasticitě se lze přesvědčit nejlépe grafickým

Tabulka VI

Regresní charakteristiky vícenásobné nelineární regrese spektrálních dat následné reakce $I \rightarrow II \rightarrow III$ v oblastech $\lambda = 319\text{--}349$ nm a $\lambda = 399\text{--}500$ nm a jejich spojení

Regresní charakteristiky	319–349 nm 399–500 nm	319–349 nm	399–500 nm
k_1, s^{-1}	$5,81 \cdot 10^{-3}$	$5,83 \cdot 10^{-3}$	$5,79 \cdot 10^{-3}$
$s(k_1), \text{s}^{-1}$	$1,17 \cdot 10^{-5}$	$5,45 \cdot 10^{-5}$	$3,01 \cdot 10^{-5}$
Relativní chyba, %	0,20	0,93	0,52
Poločas, s	119,3	118,9	119,7
k_2, s^{-1}	$1,49 \cdot 10^{-2}$	$1,43 \cdot 10^{-2}$	$1,51 \cdot 10^{-2}$
$s(k_2), \text{s}^{-1}$	$5,18 \cdot 10^{-5}$	$2,06 \cdot 10^{-4}$	$1,38 \cdot 10^{-4}$
Relativní chyba, %	0,35	1,44	0,92
Poločas, s	46,5	48,5	45,9
Reziduální suma čtverců	$8,06 \cdot 10^{-6}$	$1,71 \cdot 10^{-4}$	$5,52 \cdot 10^{-5}$
Reziduální směrodatná odchylka	$3,39 \cdot 10^{-4}$	$1,56 \cdot 10^{-3}$	$8,88 \cdot 10^{-4}$

Obr. 6. Závislost predikovaného rezidua $e(k)$ na predikované hodnotě absorbance $\hat{A}(k)$

znázorněním, např. na obr. 6. Grafické znázornění na obr. 6 by mělo v optimálním případě vykazovat nahodilé rozložení odchylek, a to v uspořádání jednou nad a podruhé pod dělicí úsečkou a dále se srovnatelnou výškou. Takové zobrazení znamená, že jde o konstantní a konečný rozptyl chyb. Je-li v zobrazovaných bodech viditelný nějaký trend, pak tato skutečnost indikuje pravděpodobnou

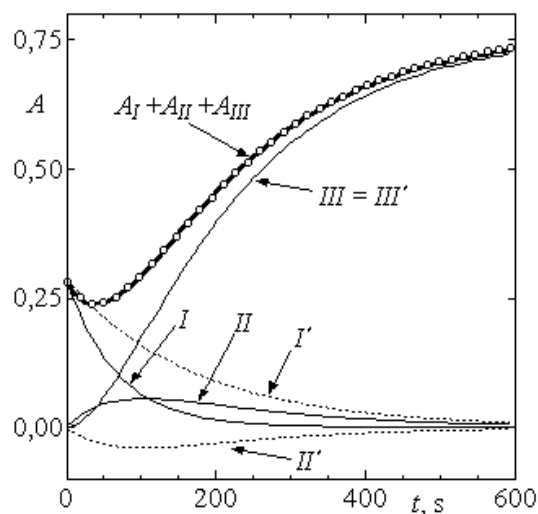
chybu v regresním modelu nebo chybu v datech. Nevykazují-li zobrazená rezidua trend, ale zvyšující se resp. snižující se velikost, znamená to, že není dosaženo konstantního rozptylu chyb.

Nevykazují-li data heteroskedasticitu a jsou-li vhodným způsobem proložena, můžeme považovat optimalizační funkci za správnou. Jestliže byla rovnice, podle které optimalizujeme, odvozena na základě teorie pro daný fyzikálně-chemický problém, mají jednotlivé parametry přesně daný význam. Nejsou-li optimalizací získané hodnoty jednotlivých parametrů v rozporu s teoretickými hodnotami (záporné hodnoty rychlostních konstant nebo molárních absorpčních koeficientů), je-li splněna homoskedasticita a jsou-li uspokojivé statistické charakteristiky, můžeme o modelu prohlásit, že není v rozporu s uvedenou teorií, avšak to neznamená, že jiná teorie by nepopsala tentýž problém lépe.

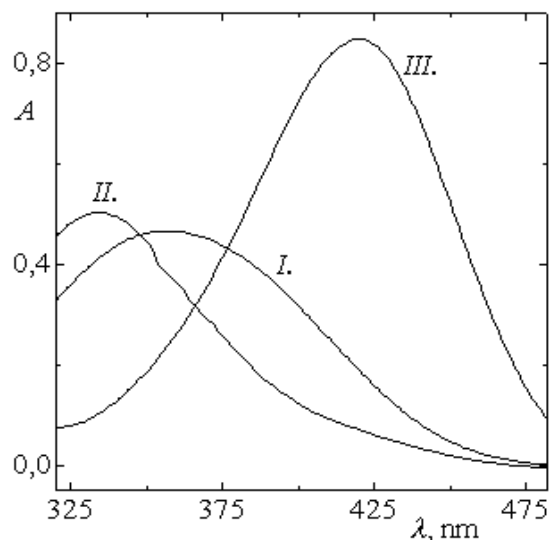
Problém přiřazení rychlostních konstant jednotlivým stupňům

Podstatný problém představuje přiřazení jednotlivých získaných rychlostních konstant správné reakci, $A \rightarrow B$ resp. $B \rightarrow C$. Z podstaty matematického zpracování experimentálních dat plyne, že není možné určit, která rychlostní konstanta náleží které reakci. Neplatí tedy, že rychlá změna absorbance následovaná změnou pomalou znamená rychlý první stupeň následovaný stupněm pomalým¹⁰. Aby bylo možno určit, která z rychlostních konstant k_1 a k_2 odpovídá reakci $I \rightarrow II$ resp. $II \rightarrow III$, je např. třeba připravit látku II a samostatně změřit rychlostní konstantu její přeměny na látku III , čímž určíme rychlostní konstantu k_2 , nebo nalézt ve spektrálním záznamu reakce isosbestický bod přeměny $II \rightarrow III$ a sledovat spektrofotometricky reakci při této vlnové délce. Přeměna $II \rightarrow III$ se v tomto isosbestickém bodě spektrálně neprojeví, to znamená, že získáme kinetickou křivku pouze pro první reakci a z ní hodnotu k_1 . Poslední možností, která se však dá použít jen málokdy, je samostatné spektrální sledování meziproductu. V oblasti klasických UV-VIS spekter však téměř neexistují případy, kdy při dané vlnové délce absorbuje pouze intermediát – pásy se často překrývají. Spektrální sledování intermediátu je však možné, pokud vykazuje na rozdíl od výchozí látky a produktu fluorescenci²³.

Námi navržený postup spočívá v myšlence, že dvě matematicky nerozlišitelná řešení součtu dvou exponenciál se musí lišit ve znaménku molárních absorpčních koeficientů. Kladná znaménka odpovídají reálné situaci, zatímco kterýkoliv záporný koeficient postačuje k vyloučení dané eventualit. Abychom toto mohli určit, je třeba provést zpětný výpočet absorbance z rovnice (8) při dané vlnové délce pro jednotlivé složky reakční směsi v čase. Na základě srovnání těchto závislostí s teoretickým předpokladem průběhu pak provedeme správné přiřazení. Toto ilustruje obr. 7, kde je při špatném přiřazení jednotlivých konstant vidět, že absorbance meziproductu II po začátku reakce klesá a pak opět roste (křivka označená II'). Takový průběh by byl možný pouze v případě, že by meziproduct vyzařoval záření příslušné vlnové délky (snižoval absorbanci směsi –



Obr. 7. Vypočtené a skutečné časové průběhy absorbancí jednotlivých složek reakce při vlnové délce $\lambda = 405 \text{ nm}$; I – představuje časovou změnu absorbance výchozí látky při správném přiřazení pozorovaných rychlostních konstant a I' při chybném přiřazení, II' – úbytek meziproductu v čase při špatném přiřazení rychlostních konstant, II – změna absorbance meziproductu v čase při správném přiřazení rychlostních konstant, III a III' – změna absorbance produktu v čase vychází pro obě varianty stejně.



Obr. 8. Vypočtená spektra jednotlivých složek I , II a III

tj. měl záporný molární absorpční koeficient), neboť koncentrace meziproductu musí nutně nejprve růst a pak klesat. Při správném přiřazení pozorovaných rychlostních konstant jednotlivým reakčním stupňům získáme osově symetrický průběh absorbance meziproductu v čase (II). Takový průběh je již z hlediska teorie správný, neboť kon-

centrace meziprojektu v čase se nejprve zvyšuje, poté dosáhne maxima a opět klesá k nule.

Obr. 7 ukazuje časové průběhy jednotlivých složek reakce při vlnové délce 405 nm. Body na obrázku představují experimentální měření absorbance směsi a proložená křivka součet optimalizovaných absorbancí $A_I + A_{II} + A_{III}$. Je zde vidět nepatrná změna v průběhu vypočteném, protože pro výpočet bylo použito rychlostních konstant získaných výše uvedenou analýzou latentních proměnných s nejlepšími hodnotami statistických charakteristik.

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že k vyhodnocení systému následných reakcí je nejvhodnější metoda nelineární regrese kombinovaná s metodou hlavních komponent. Hodnoty rychlostních konstant se nejvíce blíží hodnotám získaným nezávislým měřením, event. za speciálních podmínek (měření v isosbestickém bodě). Naproti tomu starší metody linearizační se dají spíše použít jako odhad rychlostních konstant. Jejich použití sebou nese riziko nevhodného výběru vlnové délky, resp. ne zcela optimálního odhadu A_∞ . Výhodou počítačového zpracování je navíc možnost modelování spekter jednotlivých složek (viz obr. 8) (zejména meziprojektu, pokud není dostupný nezávislou cestou) a možnost správného přiřazení rychlostních konstant jednotlivým stupňům.

LITERATURA

- Štěrbá V., Panchartek J.: *Kinetické metody při studiu reakcí organických sloučenin*. SNTL, Praha 1985.
- Kaválek J., Macháček V., Sedlák M., Štěrbá V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 58, 1122 (1983).
- Prinz T., Keim W., Driessen-Holscher B.: Angew. Chem. Int. Ed. 35, 1708 (1996).
- Sedlák M., Hanusek J., Holčapek M., Štěrbá V.: J. Phys. Org. Chem. 14, 187 (2001).
- Sedlák M., Hejtmánková L., Kašparová P., Kaválek J.: J. Phys. Org. Chem. 15, 165 (2002).
- Kraus M., Schneider P., Beránek L.: *Chemická kinetika pro inženýry*. SNTL, Praha 1978.
- Deranleau D. A.: Experientia 38, 661 (1982).
- Swain C. G.: J. Am. Chem. Soc. 66, 1696 (1944).
- Jackson W. G., Harrowfield J. B., Vowles P. D.: Int. J. Chem. Kinet. 9, 535 (1977).
- Alcock N. W., Benton D. J., Moore P.: Trans. Faraday Soc. 66, 2210 (1970).
- Salvador F., González J. L.: React. Kinet. Catal. Lett. 25, 125 (1984).
- Casado J., González J. L., Moreno M. N.: React. Kinet. Catal. Lett. 33, 357 (1987).
- Wolfe M. A.: *Numerical Methods for Unconstrained Optimizations*. Van Nostrand Reinhold Co., London 1978.
- Pytela O.: *OPgm program package version 3.07*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1992–2003.
- Spendley W., Hext G. R., Himworth F. R.: Technometrics 4, 441 (1962).
- Nelder J. A., Mead R.: Comput. J. 7, 308 (1965).
- More J. J., v knize: *The Levenberg-Marquart algorithm: Implementation and theory*. In G. E. Watson, (ed.), Lect. Notes Math. 630, 105 (1978).
- Wu X. Z., Zhang W. Z., Cai S. M., Han D. G.: React. Kinet. Catal. Lett. 47, 51 (1992).
- Kahley M. J., Novak M.: J. Chem. Educ. 73, 359 (1996).
- Maeder M., Zuberbühler A. D.: Anal. Chem. 62, 2220 (1990).
- !Pro-K global analysis and simulation software version 4.21*. Applied Photophysics Ltd., Leatherhead 2000.
- Afifi A. A., Azen S. P.: *Statistical Analysis. A Computer Oriented Approach*. Academic Press, New York 1979.
- Cai R. X., Wu X.G., Liu Z.H., Ma W.H.: Analyst 124, 751 (1999).

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za finanční podporu (projekt CI MSM 253 100 001).

J. Hanusek^a and J. Svoboda^b (^aDepartment of Organic Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, ^bJoint Laboratory of Solid State Chemistry of Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, and University of Pardubice): **Methods of Solution of a System of First-order and Pseudofirst-order Consecutive Reactions Based on Time Dependence of UV-VIS Spectra**

The article deals with the methods of obtaining rate constants of first-order and pseudofirst-order consecutive reactions from time dependences of UV-VIS spectra, either whole or at selected wavelengths, and gives a method of unambiguous assignment of the constants to individual reaction steps. Common linearization methods of evaluation of the constants at a single wavelength were compared with the methods based on simple nonlinear regression combined with the principal component methods in a model system of 4-chloro-*N*-(4-nitrophenyl)butanamide. The precision of the methods was further compared with independent experimental second-order rate constants.

VLIV PERIODICKY MODULOVANÉHO NÁSTRÍKU NA ZÁDRŽ KAPALINY A TLAKOVOU ZTRÁTU ZKRÁPĚNÉHO REAKTORU

VRATISLAV TUKAČ a JIŘÍ HANIKA

Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
vratislav.tukac@vscht.cz, jiri.hanika@vscht.cz

Došlo 5.2.04, přijato 29.4.04.

Klíčová slova: zkrápěný reaktor, periodická modulace nástříku, rozdělení dob prodlení, zádrž kapaliny, podélné promíchávání, tlaková ztráta

Úvod

Výkon zkrápěného reaktoru může být nepříznivě ovlivněn nerovnoměrným tokem kapalné fáze a neúplným smočením lože katalyzátoru. Informace o toku a množství kapalné fáze v katalytickém loži zkrápěného reaktoru lze získat metodou měření rozdělení dob prodlení stopovací látky v systému nebo stanovením volně vyteklé dynamické zádrže kapaliny¹. Cílem této práce bylo studium vlivu parametrů periodicky modulovaného nástříku kapaliny na hydrodynamické vlastnosti zkrápěného reaktoru pilotního měřítka, zejména na dynamickou zádrž kapaliny, míru podélného promíchávání a tlakovou ztrátu.

Zkrápěný reaktor je třífázový vertikálně orientovaný trubkový reaktor naplněný tvarovaným heterogenním katalyzátorem. Kapalná fáze stéká po katalytické náplni reaktoru obvykle souprůdně s reagujícím plynem. Tyto reaktory jsou využívány při velkokapacitních hydrogenacích, zejména hydrodesulfurizaci ropných frakcí, nebo také pro oxidační reakce, např. oxidace polutantů v odpadních vodách. Výkon, energetické nároky, životnost katalyzátoru i stabilitu a bezpečnost provozu významně ovlivňuje hydrodynamika² toku fází reaktorem. Režim toku, tlaková ztráta, zádrž a distribuce kapaliny, podélné a radiální promíchávání a míra smočení povrchu katalyzátoru ovlivňuje transport reaktantů a tepla. Při nižších průtocích fází kapalina teče ve formě filmu a pramének tzv. zkrápěným tokem, při vysokých průtocích dochází k periodickému zahlcování částí lože kapalinou při přirozeném pulzním režimu. Hranice mezi zkrápěným a pulzním tokem se nachází přibližně u hodnot mimovrstvových hmotnostních průtoků $20 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pro kapalnou a $0,2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pro plynnou fázi. Při pulzním režimu dochází k intenzivní interakci mezi fázemi, která vede k periodickému obnovování smočeného povrchu katalyzátoru a intenzivnější výměně hmo-

ty a tepla. Alternativou přirozeného pulzního toku je umělý pulzní tok vyvolaný periodickou modulací toku, např. přerušovaným nástříkem fází (většinou kapaliny) do reaktoru^{3–5}.

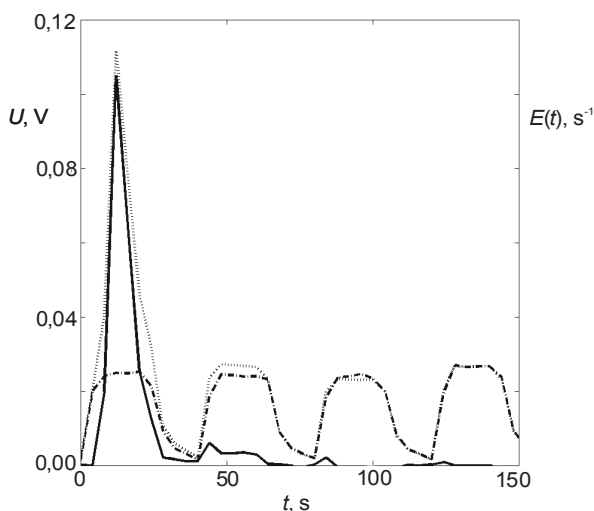
Pro popis toku v reaktoru se nejčastěji používají dva hydrodynamické modely⁶ – pseudohomogenní s pístovým tokem fází a pseudohomogenní s axiálním promícháváním. Parametry těchto modelů lze získat z měření distribuce dob prodlení stopovací látky v systému⁶.

Experimentální část

Experimenty byly vedeny jak s kontinuálním, tak i periodicky modulovaným nástříkem kapaliny za konstantního průtoku plynu. Byl použit systém voda-vzduch za atmosférického tlaku a laboratorní teploty (20 °C). Zkrápěný reaktor byl tvořen 500 mm vysokým skleněným válcem o vnitřním průměru 108 mm opatřeným bočními tubusy pro připojení elektrod (stavebnice Kavalier Sáza-va). 33 cm vysoká vrstva náplně byla tvořena extrudáty aktivního uhlí (Chemviron Carbon) o ekvivalentním průměru 4,6 mm nebo skleněnými kuličkami o průměru 5 mm. Kapalina byla čerpána ze zásobní nádrže skleněným čerpadlem s teflonovým vlnovcem do přepadové nádrže umístěné 3,5 m nad základnou. Z nádrže zajišťující konstantní přetlak stékala kapalina samospádem a přes rotometr, regulační a solenoidový ventil natékala do sprchové hlavice, kterou byla rozstříkována nad náplň. Tlakový vzduch z kompresorového rozvodu byl po redukci tlaku veden přes rotometr a regulační ventil na hlavu kolony, kde byla snímána tlaková ztráta jako přetlak vůči atmosféře U-manometrem a můstkovým elektrickým čidlem. Po průchodu vrstvou náplně a separátorem fází byl odplyn veden do atmosféry a kapalina se vracela do zásobní nádrže. Řízení nástříku kapaliny, tj. ovládání solenoidu, a měření vodivosti a tlakové ztráty bylo realizováno prostřednictvím modulů Adam 4000 (Advantech) propojených s počítačem přes seriové rozhraní RS 485. Řídící, monitorovací a vyhodnocovací programy byly vytvořeny v programovém prostředí Matlab (MathWorks). Byla také měřena volně vyteklá dynamická zádrž kapaliny jako objem kapaliny vyteklý z náplně po zastavení nástříku.

Metoda rozdělení dob prodlení stopovací látky využívala měření odezvy vodivosti ve vrstvě katalyzátoru na nástřík nasyceného roztoku chloridu draselného. Vodivostní elektrodu tvořila nerezová síť nesoucí náplň reaktoru a měděný drát zasunutý bočním tubusem do náplně ve vzdálenosti 5 cm na síti. Vyhodnocení bylo provedeno momentovou metodou a identifikací parametrů modelu kaskády míchaných buněk⁶, který je ekvivalentní modelu pístového toku s podélným promícháváním.

Hodnoty signálu naměřené vodivostní elektrodou při periodickém nástříku kapaliny byly ovlivněny také proměnlivou rychlostí průtoku kapaliny. Na obrázku 1 je uveden příklad srovnání měřené signálové odezvy po nástříknutí stopovací látky a periodicky se měnící hodnoty pozadí signálu způsobené proměnlivým průtokem kapaliny. Aby



Obr. 1. Odezva na impulzní nástřik stopovací látky a periodické pozadí vodivostního signálu při modulaném nástřiku kapaliny. Normalizovaná výsledná odezva frekvenční funkce na impulzní nástřik stopovací látky po odečtení pozadí vodivostního signálu při periodickém nástřiku kapaliny, perioda 40 s, split 0,5, střední doba prodlení $t_m = 16,6$ s. — distribuční funkce $E(t)$, - - odezva na impuls U , - - - - pozadí signálu U

bylo možné vyhodnotit odezvy momentovou metodou, bylo třeba od odezvy vodivosti stopovací látky odečíst tyto hodnoty pozadí. Výsledná křivka po normalizaci na frekvenční funkci $E(t)$ je vykreslena plnou čarou. Střední doba prodlení stanovena jako první moment normalizované křivky pak činila 16,6 s. Alternativní metodou by byla integrace obou křivek zvlášť a následně odečtení integrálu, který představuje pozadí. Výsledek by ale byl zatížen větší chybou díky chvostování a nastavení nulové linie.

Vyhodnocení bylo provedeno standardním postupem – momentovou metodou⁶.

Hodnoty normalizované distribuční funkce E lze získat z časové řady naměřeného signálu napětí U podle vztahu:

$$E(t) = \frac{U(t)}{\int_0^{\infty} U(t) dt} \quad (1)$$

a obecný r -tý moment M_r křivky je definován následujícím integrálem:

$$M_r = \int_0^{\infty} t^r E(t) dt \quad (2)$$

Nulový moment charakterizuje celistvost, první moment střední dobu prodlení a druhý moment lze využít pro výpočet rozptylu a následně Pecletova kritéria charakterizujícího podélné promíchávání.

Pomocí střední doby prodlení t_m , ekvivalentní první-

mu momentu M_1 a známého průtoku kapaliny Q_L lze vypočítat hodnotu efektivní dynamické zadržky kapaliny H_{ef} vztažená na objem výplně V_r podle následujícího vztahu:

$$H_{ef} = \frac{Q_L t_m}{V_r} \quad (3)$$

Doba prodlení τ vztažená na celý volný objem lože, nikoli jen na objem kapaliny, použitá pro stanovení relativní délky periody nástřiku kapaliny, se vypočte za pomoci mezerovitosti výplně ε :

$$\tau = \frac{\varepsilon V_r}{Q_L} \quad (4)$$

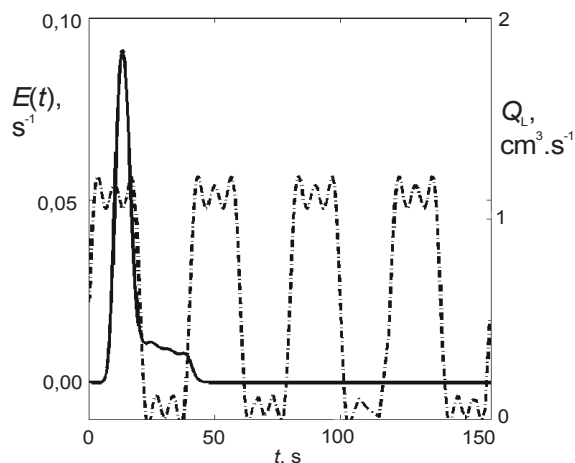
Druhý obecný moment křivky slouží k výpočtu relativního rozptylu σ podle vztahu:

$$\sigma^2 = \frac{M_2 - (M_1)^2}{(M_1)^2} \quad (5)$$

Vztahy mezi parametrem hydrodynamického modelu – Pecletovým kritériem (Pe), charakterizujícím axiální promíchávání, a číselnými charakteristikami (momenty) odezvovalých křivek jsou publikovány⁶ pro různé okrajové podmínky. Pro systém z obou stran uzavřený, tzn., že k podélnému promíchávání dochází pouze uvnitř systému, platí:

$$\sigma^2 = \frac{2Pe - 2 + 2e^{-Pe}}{Pe^2} \quad (6)$$

Pro srovnání bylo testováno i řešení pro systém otevřený na vstupu, ale odchylky výsledků ležely v mezích chyb experimentů. Pecletovo kritérium bylo z těchto vztahů



Obr. 2. Řešení odezvy modelu kaskády 20 míchaných buněk při periodickém nástřiku kapaliny a konstantní zadržce kapaliny; — distribuční funkce $E(t)$, - - - - modulaný nástřik kapaliny Q_L , perioda 40 s, split 0,5

vyhodnoceno nelineární regresi simplexovou metodou řešitelem programu Matlab.

Pro popis zkrápněné vrstvy byl formulován model dvacetičlenné kaskády ideálně míchaných buněk, využívající parametry stanovené metodou rozdělení dob prodlení. Periodický nástřik byl simulován Fourierovou funkcí. Výsledky řešení modelu ve formě vypočteného průběhu frekvenční funkce uvedené na obr. 2 byly v dobrém souladu s experimentálními daty a potvrdily jejich věrohodnost. Rozdíl mezi řešením a experimentálními daty, který byl dán předpokladem konstantní hodnoty zadržky kapaliny v čase, ukazuje, že tento předpoklad při modulovaném nástřiku není splněn a v závislosti na nástřiku dochází také k periodické změně zadržky.

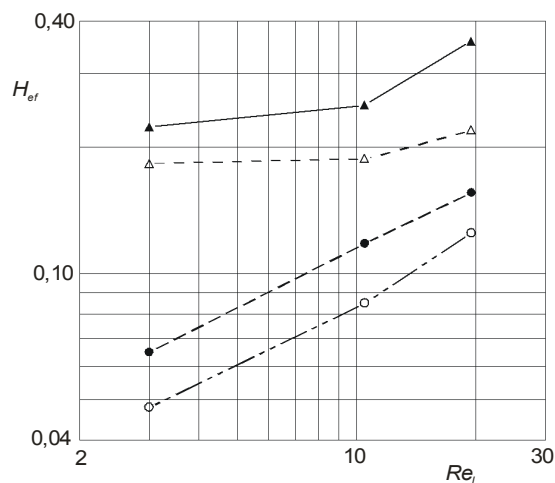
Kromě sledování vodivosti byla také tlakovým převodníkem měřena při experimentech tlaková ztráta vrstvy náplně. Byly pozorovány oscilace hodnot tlakové ztráty a signálu odpovídajícího vodivosti při periodicky přerušovaném nástřiku kapaliny do reaktoru. Oscilace tlakové ztráty lze vysvětlit periodickým zahlcováním lože kapalinou ve fázi nástřiku kapaliny a vypuzením kapaliny z lože proudícím plynem ve fázi zastavení jejího přívodu.

Výsledky a diskuse

Sledovanými veličinami byly velikost efektivní zadržky kapaliny stanovené metodou rozdělení dob prodlení a dynamické zadržky stanovené jako objem kapaliny vytekající z náplně po zastavení nástřiku. Vyhodnoceno bylo také Pecletovo kritérium podélného promíchávání kapaliny a byla měřena tlaková ztráta lože. Řídicími veličinami byly průtoky kapaliny a plynu a při periodické modulaci nástřiku kapaliny také parametry modulace: délka periody a její split (tj. podíl periody, po který byla do lože dávkována kapalina). Pro porovnání vlastností extrudovaného aktivního uhlí byla také prováděna měření na standardní náplni z 5 mm skleněných kuliček. Vliv toku kapalně fáze na sledované veličiny při periodicky modulovaném nástřiku byly porovnávány při délkách period odpovídajících středním dobám prodlení, tj. pro $Re_L = 3, 10$ a 19 činily délky period 200, 60 a 40 s. Za těchto podmínek se projevovaly nejvýraznější rozdíly v měřených veličinách.

Vliv rychlosti toku fází na hodnoty zadržky kapaliny

Vliv průtoku kapalně a plynné fáze na množství kapaliny zadržované ve zkrápněném loži byl studován na náplni tvořené skleněnými kuličkami nebo katalyzátorem. Byla provedena měření pro tři střední hodnoty průtoku kapaliny, jak při kontinuálním toku, tak pro periodickou modulaci nástřiku kapaliny. Výsledky jsou prezentovány na obrázku 3 jako závislost efektivní dynamické zadržky kapaliny v loži, stanovené pomocí metody rozdělení dob prodlení, na Reynoldsově kritériu proudění kapaliny. Efektivní dynamická zadržky kapaliny roste s rostoucím průtokem kapaliny při kontinuálním i modulovaném toku. Uvedené závěry platí jak pro náplň ze skleněných kuliček tak tvořenou

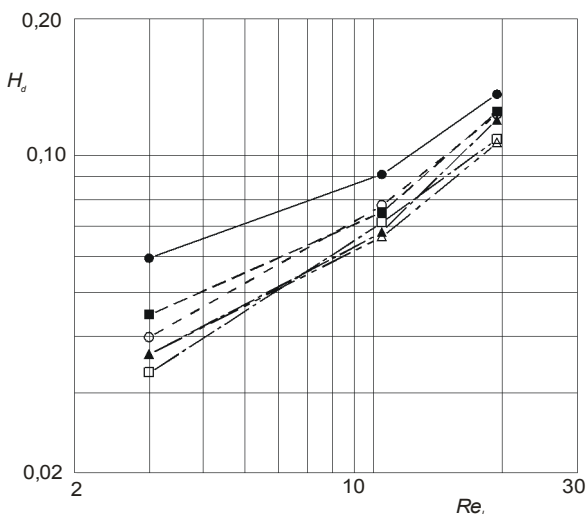


Obr. 3. Srovnání závislosti efektivní dynamické zadržky kapaliny na hodnotě Reynoldsova kritéria kapaliny pro katalyzátor (▲ kontinuální, △ pulzní tok) a skleněné kuličky (● kontinuální, ○ pulzní tok); výška vrstev 33 cm, perioda 40 s, split 0,5 periodického nástřiku kapaliny, $Re_G = 6,7$

výtlačky aktivního uhlí. U aktivního uhlí se projevuje jeho větší smáčivost a porozita, efektivní zadržky je mnohem vyšší než u skleněných kuliček a je méně citlivá na průtok kapaliny zejména pro nižší hodnoty Re kritéria. Příčinou bude existence stabilních menisků kapaliny mezi částicemi katalyzátoru. Dále bylo nalezeno, že efektivní dynamická zadržky dosahuje při periodickém nástřiku nižších hodnot, a to pro obě testované náplně. Při délce periody přibližně rovné vypočítané střední době prodlení a splitu blízkého hodnotě 0,5 dochází v režimu s periodickým nástřikem kapaliny k nejvýraznějšímu snížení efektivní dynamické zadržky kapaliny oproti toku kontinuálnímu.

Experimentálně byl sledován i vliv průtoku plynné fáze na zadržky kapaliny, hodnota zadržky klesala s rostoucím průtokem plynu. Ze závislosti efektivní zadržky kapaliny na Reynoldsově kritériu proudění vzduchu bylo také patrné, že k nejvýraznějšímu snížení efektivní dynamické zadržky kapaliny, tj. největší citlivosti k průtokem plynu, dochází při nižších hodnotách průtoku vzduchu, zatímco při vysokých hodnotách proudění efektivní dynamická zadržky kapaliny s průtokem vzduchu klesá jen málo, protože její hodnota je nízká díky vypuzení pseudostabilních menisků kapaliny z lože proudícím plynem.

Kromě efektivní dynamické zadržky byla pro srovnání stanovována také volně vyteká dynamická zadržky kapaliny. Předpokládá se, že je tvořena hlavně kapalinou proudící ložem a jen částečně pseudostabilními menisky kapaliny mezi částicemi náplně. Její hodnota by tedy proti efektivní zadržce měla být nižší. Na obr. 4 je uvedena závislost dynamické zadržky na Reynoldsově kritériu proudění kapaliny



Obr. 4. Závislost dynamické volně vyteklé zádrže kapaliny H_d na Reynoldsově kritériu kapaliny Re_L při periodickém nástřiku; $Re_G = 0$ (● kont., ○ pulzní), $Re_G = 8$ (■ kont., □ pulzní), $Re_G = 20$ (▲ kont., △ pulzní), výška vrstvy katalyzátoru 33 cm, perioda 40 s, split 0,5

stanovená na katalyzátoru při různém průtoku plynu. Potvrdil se předpoklad, že dynamická zádrž je přibližně poloviční proti efektivní zádrži kapaliny a podobně jako u efektivní zádrže hodnoty odpovídající pulznímu toku jsou nižší než pro tok kontinuální. Obdobné výsledky byly získány i pro lože skleněných kuliček, velikost dynamické zádrže byla podobně jako u efektivní zádrže v loži skleněných kuliček nižší než u porézního aktivního uhlí.

Vliv parametrů modulace nástřiku kapaliny

Umělý pulzní tok byl vytvářen periodickou modulací nástřiku kapaliny řízeným otevíráním a zavíráním solenoidového ventilu. Perioda představuje časový interval mezi dvěma následujícími počátky otevření ventilu a split podíl doby otevření z celkové délky periody. Délka periody a její split významně ovlivňují hydrodynamiku v loži, zejména je-li perioda souměřitelná s prodlením kapaliny v loži. Proto bylo dále použito kritérium relativní periody zahrnující délku periody i dobu prodlení.

Vliv délky relativní periody nástřiku

Relativní periodu představuje podíl skutečné doby periody nástřiku a střední doby prodlení kapaliny vypočtené ze známého objemového průtoku kapaliny a volného objemu lože.

Závislosti efektivní dynamické zádrže na relativní periodě vykazují minimum pro hodnoty relativní periody blízké jedné. Při režimu s periodickým nástřikem kapaliny je efektivní dynamická zádrž kapaliny nižší oproti hodnotám odpovídajícím kontinuálnímu toku. Obdobné výsledky

byly naměřeny i na skleněných kuličkách, ale pokles efektivní zádrže při periodickém režimu nebyl tak výrazný a minimum se nacházelo v okolí hodnoty relativní periody 0,7. Stejně závislosti byly pozorovány rovněž při studiu vlivu periodického nástřiku kapaliny na hodnotu volně vyteklé dynamické zádrže. Zjednodušeně lze předpokládat, že při režimu s periodickým nástřikem kapaliny se oproti kontinuálnímu režimu snižuje průměrná tloušťka filmu kapaliny, ve skutečnosti dochází k obnovování filmu na povrchu částic. Tohoto jevu může být využito v systémech, kde rychlost reakce je bržděna nedokonalým transportem plynných reakčních komponent k částicím katalyzátoru, neboť se snížením tloušťky filmu kapaliny nebo jeho obnovením se jejich transport urychluje.

Vliv délky relativní periody na podélné promíchávání při periodickém nástřiku a kontinuálním nástřiku kapaliny byl vyjádřen hodnotami Pecletových kritérií při průtoku plynu, jemuž odpovídá Reynoldsovo kritérium 6,7. Výška vrstvy aktivního uhlí byla 33 cm. Hodnoty Pecletova kritéria při periodickém nástřiku kapaliny vykazují maximum opět v okolí hodnoty relativní periody rovné jedné. Tato maxima přesahují hodnoty naměřené při kontinuálním toku a s rostoucím středním průtokem kapaliny se vzdalují hodnotám pro kontinuální tok.

Nejvýraznější zvýšení Pecletova kritéria a tedy snížení podélného promíchávání kapaliny a přibližování se pistovému toku se projevuje stejně i na náplni ze skleněných kuliček při režimu s periodickým nástřikem kapaliny.

Při relativních periodách blízkých jedné dochází k nejvýraznějšímu snížení hodnot efektivní i dynamické zádrže kapaliny a tedy ke snížení tloušťky filmu kapaliny a následně i zmenšení promíchávání kapaliny v axiálním směru, protože se snižuje hodnota kapacity zádrže kapaliny, což může mít pozitivní vliv na selektivitu případných následných reakcí provozovaných v tomto typu reaktoru.

Vliv splitu periody při jednotkových relativních periodách

Vliv splitu při jednotkové hodnotě relativní periody modulace nástřiku byl studován na vrstvě katalyzátoru (výška vrstvy = 33 cm). Byla zvolena taková délka periody, při které dochází k nejvýraznějšímu snížení efektivní dynamické zádrže kapaliny a současně dosažení maxima Pecletova kritéria, tj. stav, kdy je systém na modulaci nejcitlivější.

Měření byla provedena pro různé nástřiky kapaliny, při periodách délky 40 s, 60 s a 200 s a středním průtokem 20, 70 a 130 l.h⁻¹. Objemový průtok vzduchu činil 800 l_N.h⁻¹. Z výsledků vyplývá, že k nejvýraznějšímu snížení efektivní dynamické zádrže kapaliny dochází při hodnotách splitu blízkých 0,5, tj. první polovinu periody je kapalina dávkována do reaktoru a během druhé poloviny samovolně odtéká.

Vliv splitu periody na hodnotu kritéria podélného promíchávání byl testován při třech průtocích kapaliny a při toku plynu, kterému odpovídá hodnota Reynoldsova kritéria $Re_G = 6,73$, na aktivním uhlí. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí splitů 0,3, 0,5 a 0,6. K nejvýraznějšímu nárůstu hodnot Pecletova kritéria při periodickém nástřiku

kapaliny ve srovnání s kontinuálním tokem dochází při splitu 0,5 a při maximálním ($Re_L = 19,42$) použitím nástřiku kapaliny. Naopak při nejnižším použitím toku kapaliny ($Re_L = 3,0$) je zvýšení Pecletova kritéria v režimu s periodickým nástřikem proti kontinuálnímu toku kapaliny nevýrazné a při splitu 0,6 je dokonce jeho hodnota nižší než při kontinuálním toku.

Modulace nástřiku kapaliny má vliv i na tlakovou ztrátu vrstvy náplně kolony. Průměrný přetlak vzduchu proti atmosféře snímáný před vrstvou náplně odpovídá odporu vrstvy proudění plynu. Porovnán byl také periodický a kontinuální tok kapaliny. Experimenty byly provedeny při $Re_G = 6,7$. Vliv modulace nástřiku kapaliny na tlakovou ztrátu souvisí s dynamickou zádrží kapaliny, která představuje zúžení průtočného průřezu pro plyn. Také udržení konstantního průměrného nástřiku kapaliny při různém splitu periody vede ke zvýšení okamžitého nástřiku při malé hodnotě splitu a naopak ke snížení okamžitého nástřiku při splitu vyšším. Při splitu 0,5 je průměrná hodnota polovinou okamžitého nástřiku. Protože při nižším splitu je okamžitý průtok kapaliny vyšší než průměrný, je zřejmé, že dojde také ke zvýšení tlakové ztráty, přestože kapalina je nástřikována kratší dobu. Naopak při nejvyšším testovaném splitu tlaková ztráta dosahuje nejnižších hodnot. Při nejmenší hodnotě splitu 0,3 dochází při všech studovaných průtocích kapaliny ke zvýšení tlakové ztráty oproti toku kontinuálnímu a při splitu 0,6 naopak ke snížení tlakové ztráty.

Byl také testován vliv délky relativní periody na tlakovou ztrátu při konstantní hodnotě splitu 0,5. Bylo nalezeno, že při nejvyšším průtoku kapaliny dochází při periodickém nástřiku kapaliny ke zvýšení tlakové ztráty oproti toku kontinuálnímu, naopak při nižších průtocích kapaliny dochází ke snížení tlakové ztráty, protože po zastavení nástřiku kapaliny dojde k vypuzení zbývající zádrže kapaliny proudícím plynem.

Vyšší tlaková ztráta znamená vyšší náklady na provoz procesu. Z tohoto hlediska by bylo tedy nejvýhodnější pracovat při co nejvyšším splitu. V předcházejících kapitolách však bylo ukázáno, že efektivní dynamická zádrž kapaliny dosahuje nejnižších hodnot při splitu 0,5 a současně Pecletova kritéria vykazují maximální hodnotu. Proto byla většina experimentů realizována při splitu periody 0,5.

Závěr

Byla vypracována metodika vyhodnocení odezvového signálu na impulzní nástřik stopovací látky do náplňové kolony při periodické modulaci nástřiku kapaliny. Z měření rozdělení dob prodlení byly vyhodnoceny hodnoty efektivní dynamické zádrže kapaliny a Pecletova kritéria podélného promíchávání. Vypočtené hodnoty byly porovnány s měřením volně vyteklé dynamické zádrže kapaliny a byla měřena také tlaková ztráta vrstvy. Kontinuální a periodicky modulovaný nástřik kapaliny byl testován na náplni tvořené vytlačky aktivního uhlí nebo skleněnými

kuličkami.

Bylo nalezeno, že rostoucí průtok kapaliny snižuje hodnoty střední doby prodlení a zvyšuje jak efektivní, tak dynamickou zádrž kapaliny, Pecletovo kritérium a tlakovou ztrátu vrstvy v kontinuálním zkrápěném i periodickém pulzním režimu.

Rostoucí průtok plynu zvyšuje tlakovou ztrátu vrstvy, mírně snižuje hodnoty dynamické zádrže kapaliny a téměř neovlivňuje hodnotu Pecletova kritéria ve zkrápěném i periodickém pulzním režimu.

V režimu s periodicky modulovaným nástřikem kapaliny dochází ke snížení volně vyteklé i efektivní dynamické zádrže kapaliny, tj. ke snížení tloušťky filmu kapaliny na částicích výplně, což může zlepšit transport plyných reaktantů. Dochází také ke zvýšení hodnot Pecletova kritéria oproti zkrápěnému toku (nejvýrazněji pro hodnoty relativních pracovních period = 1 a split 0,5), tj. snížení axiálního disperzního koeficientu, přiblížení k pístovému toku a potenciální zlepšení selektivity při provozování následných reakcí. Nejvyšších hodnot Pecletova kritéria je dosaženo při stejných dobách period, při kterých dochází k maximální redukci dynamické zádrže kapaliny.

Při splitu menším než 0,5 dochází v důsledku vyššího maximálního průtoku kapaliny ke zvýšení tlakové ztráty a hydrodynamické parametry dosahují extrému při délce relativní periody menší než 1, naopak při splitu větším než 0,5 při délce relativní periody větší než 1.

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR, grant VZ MSM 223100001.

LITERATURA

1. Tukač V., Hanika J.: Chem. Eng. Sci. 47, 2227 (1992).
2. Holub R. A., Dudukovic M. P., Ramachandran P. A.: Chem. Eng. Sci. 47, 2343 (1992).
3. Turco F., Hudgins R. R., Silveston P. L., Sicardi S., Manna L. Banchemo M.: Chem. Eng. Sci. 56, 1429 (2001).
4. Lange R., Hanika J., Stradiotto D., Hudgins R. R., Silveston P. L.: Chem. Eng. Sci. 49, 5615 (1994).
5. Kouris Ch., Neophytides St., Vayenas C. G., Tsanopoulos J.: Chem. Eng. Sci. 53, 3129 (1998).
6. Westerterp K. R., Van Swaaij W. P. M., Beenackers A. A. C. M.: *Chemical Reactor Design and Operation*. John Wiley & Sons, New York 1984.

V. Tukač and J. Hanika (*Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **The Effect of Modulated Feed on Liquid Hold-up and Pressure Drop in Trickle Bed Reactor**

The performance of a trickle bed reactor can be considerably affected by the liquid amount and uniformity of its flow through the catalyst bed. The aim of the work was to determine the influence of periodic modulation of liquid

feed on hydrodynamic properties of the pilot-scale trickle bed reactor using the method of residence time distribution experiment. By evaluation of measurement, mean residence time, effective dynamic liquid hold-up and Peclet number of longitudinal mixing were determined. Simultaneously, freely drained-out dynamic hold-up of liquid and pressure drop in packed bed were estimated and the results were compared with continuous flow measurement. The experiments with the system water – air were made with both continuous and periodically modulated feed of liquid. A glass trickle bed reactor of length 500 mm and 106 mm in diameter was filled with 4.6-mm active carbon extrudates or glass beads 5 mm in diameter. Evaluation of liquid conductivity response in the catalyst layer to injection of a saturated KCl solution was per-

formed by the moment method and by identification of parameters of the continuous stirred tank cascade model. It was found that periodic liquid feed rate modulation leads to a decrease in the freely drained-out liquid and also in effective dynamic hold-up of liquid in the bed. In case of liquid feed rate modulation a minimum was observed on the dependence of liquid hold-up at a split of 0.5 and the time period corresponding to the theoretical mean hold-up time, calculated from the flow rate of liquid and void volume in the packed bed. In the periodic feed rate modulation regime under the same hydrodynamic conditions the values of the Peclet criterion increase compared with continuous flow. Suppression of axial dispersion in the periodic regime leads to approaching to the ideal plug flow.

PHARMtechexpo 2005, Střední & Východní Evropa, Farmaceutická výroba, Zpracování a Balení, Exhibice & Konference

*Veletržní Palác, Praha, Česká republika
9.-10. února 2005*

Druhá PHARMtechexpo exhibice a konference se uskuteční ve Veletržním paláci v Praze od 9. do 10. února 2005. Exhibice se zaměří na technologii a řešení farmaceutického výrobního sektoru společností v regionu.

První PHARMtechexpo 2004 se uskutečnila v Budapešti v únoru 2004 s více než 75 vystavovatelů, kteří představovali technologii pro farmaceutický průmysl – produkt a servis. Exhibice se zúčastnilo více než 24 zemí, které přestavily největší výrobce v regionu. Program výstavy a konference se vzájemně doplňoval.

Hlavní výzva je adresována vyššímu managementu farmaceutických společností ve Střední a Východní Evropě. Program je zaměřen na výzkum a vývoj, prodej a marketing farmaceutických společností ve Střední a Východní Evropě.

“ Významným prospěchem takové události je vytváření obchodních řetězců ve farmaceutickém průmyslu, a tím se vyvarovat nedostatku konstruktivní komunikace mezi obchodními společnostmi.”

Manager logistiky, Alkaloid AD Skopje (Delegát pro PHARMtechexpo 2004)

Informace o možnostech účasti: MarkR@marcusevanscy.com
Webová stránka události: www.pharmtechexpo.com

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF ACID DECONTAMINATION OF CARCASSES

PETR PIPEK^a, PETR FÍLA^a, JARMILA JELENÍKOVÁ^a, JOSEF BRYCHTA^b, and MITSUOSHI MIYAHARA^c

^a Department of Food Preservation and Meat Technology, Institute of Chemical Technology Praha, ^b State Veterinary Institute, Jihlava, Czech Republic, ^c Department of Animal Sciences and Resources, Nihon University, Fujisawa, Japan

Key words: lactic acid, decontamination, shelf-life, carcass, economy

Introduction

There were many experiments undertaken to prolong the shelf-life of meat and meat products. Many publications deal with this problem; among others we can mention¹⁻⁵. It is clear that the surface treatment of carcasses by spraying with lactic acid solution reduces the surface microbial counts and thus increases the shelf-life and provides food safety.

This method appears repeatedly in the context with the tendency to prolong the shelf-life of packaged meat in oxygen atmosphere. The meat for packaging must have actually extremely low microbial counts and these strict requirements include also very low microbial counts on the carcasses. Thus the need for long shelf-life of packaged meat means also the surface treatment of carcasses at the end of the slaughter line.

At the moment of slaughtering the meat is almost sterile so that the primary contamination concerns in particular the meat surface. Later the microorganisms penetrate into deeper layers of meat. When this primary contamination is reduced, the shelf-life of meat can be significantly prolonged. Thus it is advantageous to decontaminate the surface of carcasses to increase their shelf-life and to enable the safe distribution. A number of methods were suggested for the surface decontamination. The mostly used lactic acid acts by decreasing pH, and due to its bactericidal properties, stops growth of bacteria.

Lactic acid is often used for surface decontamination as it is a natural component of meat produced during post-mortem glycolysis and thus it is not a typical additive⁶. The application of organic acids cannot replace the rules of high hygiene and good manufacturing practice, but it may be used as an additional hurdle contributing to prolonging the shelf-life. In this respect, there is good experience with surface treatment of the chilled poultry using lactic acid which reduces the initial bacterial count and

causes a delay of the start of logarithmic phase of their growth².

The moment and the mode of acid application are very important and they are often underrated. Concentration of the acid in the range of 1–2 % is generally accepted. Less attention is given to the temperature of acid, which should be similar to the temperature of carcass surface. The acid treatment may be done at different places of the slaughterhouse. However, it should be done as soon as possible, i.e. when most of the microorganisms are present on the meat surface and they have not yet penetrated into deeper layers.

The influence of acid decontamination on the appearance (colour) of carcass surface is differently assessed in the literature. The information about colour changes affected by lactic acid to brighter or brownish are opposite to those that no changes occur. In our own experiments we found that lactic acid caused brighter colour of meat surface, while changes in hue were negligible. However, no significant influence of lactic acid on myoglobin oxidation was observed by direct reflectance spectrometry⁷.

Another possibility of carcass surface decontamination is a combination of lactic acid spray with hot steam. We continue our research on this topic, and the results will be published.

The use of the mentioned decontamination treatments, although well known and widely used, often and repeatedly invokes the discussions about their effectivity, economy and possible colour changes. The price of the treatment and its influence on weight losses are also discussed. These circumstances were the subject of our study.

In present experiments some aspects of surface acid decontamination of beef and pork carcasses were studied. The decontamination effect of different temperature of lactic acid spray-solution was evaluated. In addition, the effect of citric acid was compared with that of lactic acid. Besides the effect on shelf-life prolongation, the effect of lactic acid on the yield or on the weight losses during storage was evaluated. From these values the economy of treatment was assessed.

Materials and methods

Materials

Lactic acid Purac FCC 80 (80 % L(+) lactic acid, Purac Gorinchem, Netherlands)

Citric acid (crystalline ČSN 66 15 14; Variant s.r.o., Všetaty, CR)

Pork and beef carcasses were treated immediately at the end of slaughter line, before entry to the chilling tunnel.

Decontamination solution was prepared by dilution of 2 % of L(+) lactic acid (Purac FCC 80) in water. The temperature of solution at the moment of treatment was in most cases 45 °C; in some cases ("cold treatment"), this temperature was 15 °C. A manual sprayer was used for application of the solutions on the carcass surface. The

application of a 2% solution of citric acid was carried out in the same way. Warm tap water (40 °C) was always used as control.

All additives were applied immediately at the end of the slaughter line. Then the carcasses were chilled in an air tunnel and stored at about +3°C.

Methods

The total counts of mesophilic microorganisms were determined according to the ČSN ISO 4833 standard. Every 10 g of sample was homogenised with 100 g of physiological solution and diluted following the expected microbial counts. The amount of 1 ml of diluted sample was placed on Petri dishes and covered with 15 ml of PCA (temperature 40–45 °C). After mixing, the Petri dishes were stored at 37 °C. After 24 or 48 h of cultivation, the total counts were related to 1 g of the sample.

The total counts of psychrophilic microorganisms were determined in the same way, only cultivation was carried out on the PCA for 72 h at 15 °C (ČSN ISO 560100 standard).

Weight losses were determined using a hanging balance Mettler Toledo ID5 MultiRange and Mettler Toledo ID7. The carcasses were weighed immediately after decontamination (30 min post mortem), after rapid cooling (3 h post mortem) and after 24 h and 48 h of cold storage.

The economical evaluation consisted in the evaluation of mass balance during rapid cooling and subsequent cold storage and a comparison of the yield with material costs for lactic acid treatment.

Results and discussion

The results of experiments show that the application of lactic acid on the carcasse surface is effective on industrial scale. In all cases the application of organic acids inhibited the growth of microorganisms on the surface of carcasses and the shelf-life was prolonged.

It is generally recommended to prefer warm solutions of lactic acid for the carcass decontamination. We tested the temperature decrease during the application and we were able to find that the drops of lactic acid solution at the moment when they fall on the carcass surface are up to 10 °C cooler than the original solution. We ascribe this temperature decrease partly to the heat exchange between drops and surrounding air and partly to evaporation of water from drops, which have a relatively high surface. Thus the temperature of drops of about 35–40 °C on the meat surface corresponds to the temperature of 45 °C of the original solution.

A comparison of the two solution temperatures was carried out in order to find out whether the solution temperature has any effect on the microbial counts on the carcass surface. It was proved (see Fig. 1 and 2) that the effect of lactic acid is higher, if its solution is warm (45 °C) in comparison with the cold solution (15 °C). The effect was higher with pork carcasses (Fig.1) than with beef car-

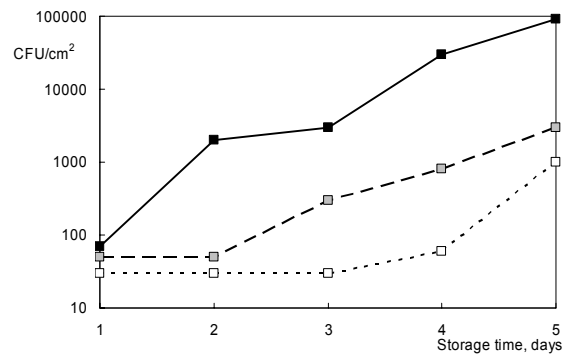


Fig. 1. Effect of decontamination using lactic acid spray on the total counts of psychrophilic microorganisms on pork carcass surface; ■ control, □ lactic acid 15 °C, □ lactic acid 45 °C

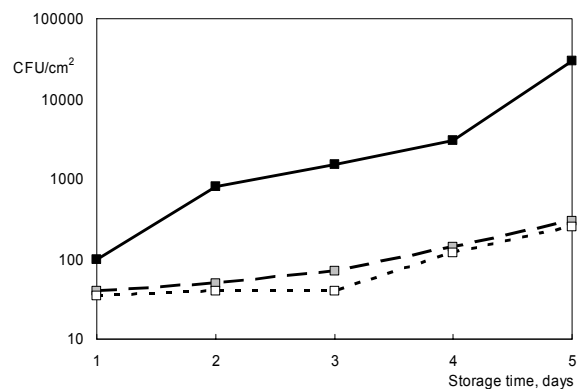


Fig. 2. Effect of decontamination using lactic acid spray on the total counts of psychrophilic microorganisms on beef carcass surface; ■ control, □ lactic acid 15 °C, □ lactic acid 45 °C

cases (Fig. 2). In the case of the carcasses that were decontaminated with warm lactic acid solutions, the lag phases were prolonged by one day; during following days of cold storage, the differences decreased.

Although the decontamination of carcass surface by lactic acid treatment shows in all cases a positive effect on the decrease in microbial counts and thus on the shelf life, this was not the main goal of the investigation. The aim of this investigation was to assess whether this beneficial decontamination process negatively affects the economy of production, in other words, whether it increases weight losses during cooling and subsequent cold storage of carcasses.

It was proved that the weight losses during cold storage were surprisingly lower in lactic acid-treated carcasses in comparison with control samples sprayed with water. The explanation of this effect can be found in changes of protein structure on the surface. The lactic acid treatment probably induces denaturation of the proteins on the sur-

Table I
Effect of temperature of lactic acid solution on the weight losses of pork carcasses

	Weight losses [%]			Total
	1 h	24 h	48 h	
Control	1.05	1.43	0.62	3.10
s.d.	0.10	0.09	0.08	0.13
Lactic acid 45 °C	0.88	1.07	0.47	2.43
s.d.	0.12	0.02	0.06	0.14
Lactic acid 15 °C	0.51	1.12	0.48	2.13
s.d.	0.13	0.03	0.05	0.14

Table II
Effect of temperature of lactic acid solution on the weight losses of beef carcasses

	Weight losses [%]			Total
	1 h	24 h	48 h	
Control	0.56	1.07	0.51	2.14
s.d.	0.04	0.05	0.06	0.11
Lactic acid 45 °C	0.22	0.72	0.59	1.52
s.d.	0.02	0.04	0.04	0.10
Lactic acid 15 °C	0.33	0.95	0.51	1.78
s.d.	0.02	0.04	0.04	0.02

face and leads to pore closure; evaporation of water from the meat surface is reduced. The differences in weight losses between lactic acid-treated carcasses and controls were 0.6–1.0 % in the case of pork (see Table I – last column) and 0.3–0.6 % in the case of beef carcasses (see Table II – last column). These differences are related to different tissues on the carcasse surface. Whereas in beef carcass the muscle tissue prevails, the surface of pork half-carcass is covered by skin. Differences in weight losses caused by lactic acid (different temperatures) during cooling, cold storage (first 24 and 48 h) and total counts are also evident from Figs. 3 and 4. The influence of lactic acid in comparison with citric acid is evident from Figs. 5 and 6 and from Tables III and IV.

Because of reduced weight losses after cooling and subsequent storage, the costs for decontamination treatment are compensated; moreover, the application of an organic acid resulted in economic profit (see Tables V and VI).

Economy of the use of decontamination treatment

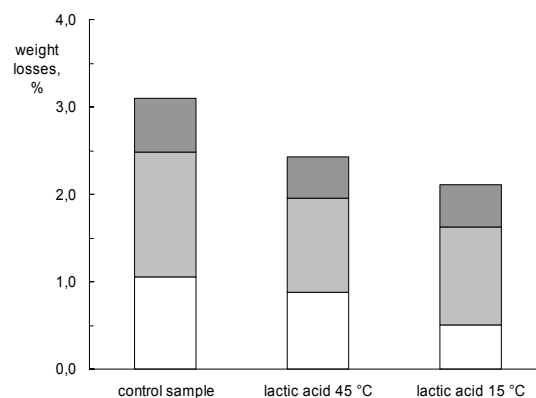


Fig. 3. Effect of temperature of the lactic acid solution on the weight losses (pork carcasses); ■ 48 h, □ 24 h, □ 1 h

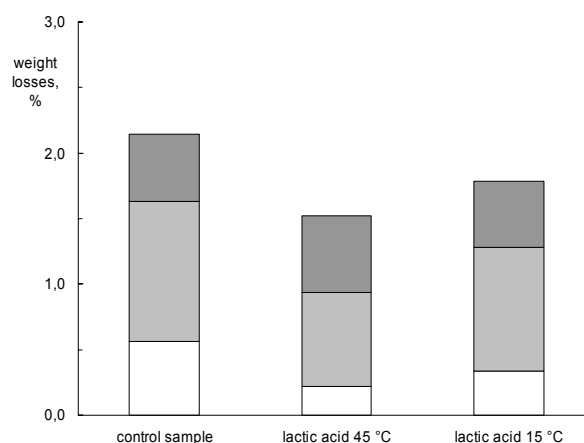


Fig. 4. Effect of temperature of the lactic acid solution on the weight losses (beef carcasses); ■ 48 h, □ 24 h, □ 1 h

Table III
Effect of acid solution on the weight losses of pork carcasses

	Weight losses [%]		Total
	1 h	24 h	
Control	0.64	1.35	1.98
s.d.	0.11	0.12	0.16
Lactic acid 45 °C	0.43	1.09	1.59
s.d.	0.08	0.12	0.14
Citric acid	0.52	1.21	1.73
s.d.	0.08	0.09	0.14

Table IV
Effect of acid solution on the weight losses of beef carcasses

	Weight losses [%]		Total
	1 h	24 h	
Control	0.49	0.95	1.45
s.d.	0.04	0.05	0.06
Lactic acid 45 °C	0.31	0.93	1.24
s.d.	0.04	0.04	0.04
Citric acid	0.31	1.00	1.32
s.d.	0.03	0.04	0.03

involves several aspects. Indirect effect (hardly identifiable) consists in the reduction of meat damage caused by spoilage. Enforcement is easy, because it leads to an increase in turnover. The occurrence of spoilage including health and subsequently legal consequences is limited.

To calculate the direct effect, it is necessary to take into account the costs for the used substance (lactic acid), depreciation of a sprinkling device and also the effect of spraying on the weight losses during cooling and cold storage. In this sense the particular data were missing.

It was shown that net costs are compensated by lowering weight losses during rapid chilling and cold storage of carcasses.

The lactic acid decreases weight losses during cooling and cold storage (see above). The differences in restriction of weight losses may be ascribed to the kind of acid and its temperature. Lactic acid decreased weight losses more than citric acid, even the same concentrations of the acids were used. Using a warm (45 °C) solution of lactic acid, lower weight losses are evident than if a cool (15 °C) solution was used. It is possible to assume that spraying by lactic acid invokes surface changes (protein denaturation, change of dissociation of functional groups), which lead to

Table V
Costs calculation for decontamination of pork carcasses

	Carcass weight [kg]	Carcass price [CZK]	Solution price [CZK]	Total price [CZK]	Weight loss [%]	Final price [CZK]		Savings [CZK]		
						per carcass	per kg	per carcass	per kg	per year
Control	80	4000	0,00	4000,00	1,98	4080,80	51,01	–	–	–
Lactic acid	80	4000	1,00	4001,00	1,59	4065,64	50,82	15,16	0,19	3 030 000
Citric acid	80	4000	0,36	4000,36	1,73	4070,78	50,88	10,02	0,13	2 000 000

preconditions: 1000 pigs/day, 200 workday/year, carcass weight 80 kg, carcass price 4000 CZK

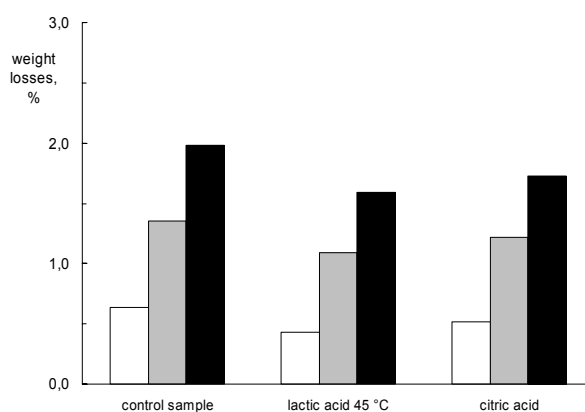


Fig. 5. Effect of decontamination by the organic acids on the weight losses (pork carcasses); □ 1 h, □ 24 h, ■ total

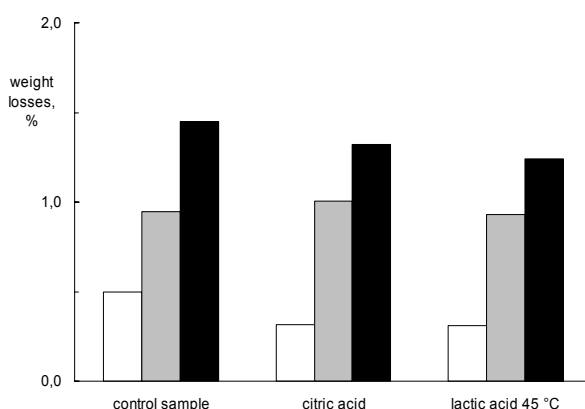


Fig. 6. Effect of decontamination by the organic acids on the weight losses (beef carcasses); □ 1 h, □ 24 h, ■ total

Table VI
Costs calculation for decontamination of beef carcasses

	Carcass weight [kg]	Carcass price [CZK]	Solution price [CZK]	Total price [CZK]	Weight loss [%]	Final price [CZK]		Savings [CZK]		
						per carcass	per kg	per carcass	per kg	per year
Control	300	21000	0,00	21000,00	1,45	21308,98	71,03	–	–	–
Lactic acid	300	21000	2,00	21002,00	1,24	21265,69	70,89	43,29	0,14	433 000
Citric acid	300	21000	0,70	21000,70	1,32	21281,62	70,94	27,36	0,09	274 000

preconditions: 50 cattles/day, 200 workday/year, carcass weight 300 kg, carcass price 21000 CZK
price of decontamination device: 250 000 CZK, returnability ca. 1 month, rate of exchange 1€ = 32 CZK

lower water evaporation and, in consequence, to a decrease in weight losses.

Economic evaluation is made in Tables V and VI. The calculation is based on the postulate that 1 litre of lactic acid Purac costs 80 CZK, thus 1 litre of 2.5% decontamination solution costs 2 CZK. The price of 1 kg of citric acid is 35 CZK and the price of 1 litre of 2% decontamination solution is 0.70 CZK. To decontaminate one pork carcass, 0.5 l of solution is required and to decontaminate beef carcass a solution volume of 1 litre is necessary. The profit resulting from one year use of this treatment is apparent from the data shown in tables. An approximate price of the decontamination device is about 250,000 CZK and this investment is returnable in a month.

Though the intention of the surface decontamination is not to increase the carcass weight, the calculations mentioned above evidence that there is no need of additional costs. On the contrary, the decontamination even brings secondary economical benefit.

Conclusions

The lactic acid treatment is effective in prolongation of shelf life of carcasses. The use of a warm (45 °C) solution of lactic acid is more effective for the purpose than that of a cold one (15 °C). The warm lactic acid solution is also more effective than that of citric acid. The secondary effect of surface decontamination is a decrease in weight losses during chilling and cold storage. The lower weight losses compensate the costs of decontamination.

REFERENCES

1. Siragusa G. R.: *J. Food Safety* 15, 229 (1995).
2. Pipek P., Kadaňová V., Bačo B., Březina P.: *Potravin. vědy* 15, 137 (1997).
3. Pipek P., Bačo B., Brychta J.: *Maso* 8, 65 (1997).
4. Pipek P., Brychta J., Březina P., Lamers P. P.: *Fleischerei-Tech.* 14 (7–8), 20 (1998).
5. Staruch L., Chalupka B., Sirotná Z., Heriban L.: *XXXII. Symposium on new trends in production and evaluation of food, Skalský Dvůr 2001.*
6. Shelef L. A.: *J. Food Protect.* 57, 445 (1994).
7. Pipek P., Izumimoto M., Houška M., Jeleníková J.: *Fleischwirtschaft Int.* 20 (2004 in print).

P. Pipek^a, P. Fila^a, J. Jeleníková^a, J. Brychta^b, and M. Miyahara^c (^a Department of Food Preservation and Meat Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b State Veterinary Institute, Jihlava, Czech Republic, ^c Department of Animal Sciences and Resources, Nihon University, Fujisawa, Japan): **Technological Aspects of Acid Decontamination of Carcasses**

Some aspects of surface acid decontamination of beef and pork carcasses with lactic acid or citric acid solutions were studied. A warm (45 °C) solution of lactic acid was more effective in shelf life prolongation than a cold one (15 °C). Citric acid was less effective than lactic acid. Treatment with lactic or citric acid reduces weight losses in carcass chilling and storage. Consequently, the costs of the decontamination treatment are compensated.

VÝUKA CHEMIE

STAČÍ KE ZLEPŠENÍ VYSOKOŠKOLSKÉ VÝUKY JEN VÍCE PENĚŽ?

JOSEF PACÁK

*Katedra učitelství a didaktiky chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 3, 128 42 Praha
pacak@natur.cuni.cz*

Došlo 4.5.04, přijato 1.6.04.

Žijeme v době, kdy je ústředním tématem shánění peněz, a kdy se odevšad ozývá volání po zvyšování státních finančních prostředků. A to se samozřejmě týká i rezortu školství. Mnozí mají dojem, že bez dalších finančních injekcí dojde tam či onde ke kolapsu a že je třeba proti tomu třeba protestovat, stávkovat.

Víc než čtyřicet let jsem působil jako pedagog na katedře organické chemie přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, po čtyři roky jako její prorektor pro studijní záležitosti, a tak mohu potvrdit, že peněz do školství je nutně třeba. Stav mnoha budov je špatný, ať už se to týká jejich zevnějšího či vnitřního vybavení, určená na výzkum nebo na výuku, jsou většinou zastaralá, a tak se posluchači seznamují často s technikou už dávno vysloužilou. Je nedostatek přednáškových místností, posluchačských studoven, míst v knihovnách. Podle prostorových omezení se tvoří rozvrhy, v nichž jsou často přednášky, semináře nebo cvičení nakumulovány do krátkých časových úseků a nutí tak studenty trávit v některých dnech mnoho hodin na fakultě, zatímco jindy mají třeba jen jednu dvouhodinovou přednášku za den. To všechno a mnohé jiné je pravda a lze to vyřešit finančními dotacemi.

Věřím, že dříve nebo později, ale raději dříve, se finanční situace na vysokých školách výraznělepší, že i pedagogové dostanou platy, jaké si opravdu zaslouží.

Ale je opravdu zvýšení úrovně našeho vysokého školství jen otázkou peněz? Jsem přesvědčen o tom, že pouhé zvýšení toku financí ve směru k fakultám k zásadnímu zkvalitnění úrovně výuky přispěje jen zčásti. K dosažení takového cíle je nutno zvýšit prestiž vysokoškolské pedagogické práce, na niž je často pohlíženo některými pracovníky jako na nutné zlo, zabírající čas vědecké práci. Obě hlavní složky práce vysokoškolských učitelů, vědecká i pedagogická, musí být v rovnovážném souladu, ani jedna nesmí být zanedbávána. Má-li profesor, docent, ale stejně i asistent vést své diplomanty i doktorandy k vědeckému bádání, musí sám rovněž vědecky pracovat a publikovat.

Ale nesmí přitom zapomínat, že jeho stejně důležitou povinností je předávání jeho teoretických znalostí posluchačům formou hodnotných přednášek a seminářů a jejich systematického doplňování o nové vědecké poznatky.

Zvlášť kvalitní by měla být teoretická i praktická příprava budoucích středoškolských učitelů. Učitel vysokoškolský musí mít neustále na mysli, že vzdělanost národa spočívá do značné míry v rukou středoškolských učitelů.

Vždyť právě jejich žáci jsou ve věku, kdy se nejintenzivněji vyvíjí jejich intelekt a kdy se rozhodují o svém budoucím profesním zaměření. A jejich učitelé musí být na tento úkol důkladně připravováni na vysoké škole, která je pro jejich příští povolání vzdělává i vychovává. Jejich odborné znalosti nemusí být nepřiměřeně rozsáhlé, ale zato důkladné a hluboké, aby je dokázali předávat v nedeformované a srozumitelné podobě svým žákům. Dobře a poutavě učit může jen ten, kdo sám vykládané látce dokonale rozumí.

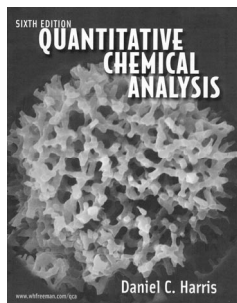
A pro středoškolské učitele středního věku je zapotřebí vytvořit moudrý způsob postgraduálního studia, třeba s pomocí distančního vzdělávání. V něm by byla nejen připomínána vysokoškolská látka, ale jeho účastníci by se v něm dozvídali nové poznatky ze svého oboru i způsoby, jak je vhodně do výuky zařazovat. Rovněž i moderní didaktické teorie a prostředky v něm musí zaujmout místo, které si zaslouží.

A závěrem si jako chemik nemohu odpustit a zdůraznit to, na což už upozornil Rudolf Zahradník ve svém úvodníku v tomto čísle, že chemii jako obor experimentální nelze vyučovat bez dostatečného množství demonstrací a praktických cvičení. To platí jak ve vysokoškolské, tak i ve středoškolské výuce. Snad by stálo za to pomoci zvýšit rozsah experimentů na gymnáziích přijetím kvalifikovaných laborantů, kteří by středoškolským učitelům s jejich technickou přípravou pomáhali. Právě pokusy lze studium chemie učinit přitažlivější a vyvracet mýtus o její suchopárnosti. Vždyť hezký pokus každého studenta potěší a stimuluje jeho zájem o chemii. Ale potěší jej i takový, který se panu učiteli nepovede ...

Josef Pacák (*Department of Teaching and Didactics of Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Is More Money Sufficient for Improvement of University Teaching ?**

Attention is drawn to possible ways of teaching improvement based on other means than increasing financial subsidies to universities. However, this should not disprove the pressing need for growth of financial flow into higher education and its reasonable utilization.

RECENZE



D. C. Harris
Quantitative Chemical Analysis
 6. vydání, W. H. Freeman and
 Company, New York 2003. Stran
 744, pevná vazba, cena 2145 Kč,
<http://www.whfreeman.com/qca>,
 ISBN: 0-7167-4464-3

Trendy v analytické chemii směřují především k jejímu využití v molekulárně biologických vědách, sledování kontaminací životního prostředí a lékařské diagnostice. Neustále jsou hledány nové postupy stanovení nejrůznějších biologicky významných látek a patrná je také snaha o miniaturizaci detekčních zařízení. Šestá vydání učebnice „Quantitative Chemical Analysis“ od Daniela C. Harris představuje moderní přehled nejpoužívanějších metod, které jsou analytickému chemikovi v současnosti k dispozici.

Kniha obsahuje třicet kapitol přičemž prvních deset je věnováno převážně teoretickému úvodu do analytické chemie. V těchto kapitolách jsou podrobně popsány základní pojmy analytické chemie jako SI jednotky, statistické vyhodnocení dat, nebo konstrukce kalibračních křivek a určení limitů detekce. Nejsou opomenuty základy související se srážecími reakcemi, určení pH nebo postupy a technikami titrace. Další čtyři kapitoly se věnují acidobazickým a komplexotvorným reakcím, isoelektrickému bodu nebo pufrovací kapacitě roztoků. Celkem je těmto teoretickým základům, potřebných k zvládnutí dalších kapitol, věnováno necelých 300 stránek.

V dalších kapitolách knihy jsou již popisovány instrumentální analytické metody. Problematice teorie elektrochemie a redoxních reakcí je věnována značná pozornost. Podrobně se autor zabývá výkladem principu elektrogravimetrie, coulometrie, amperometrie a voltmetrie. V dalších kapitolách se čtenář může dočíst o teoretických základech a aplikacích spektrofotometrie jako je spojení s průtokovou injekční analýzou, imunotesty nebo luminiscenčními senzory. Dále samostatná kapitola je věnována atomové spektroskopii, kde autor čtenáře seznamuje s problematikou atomizace vzorku. Část této kapitoly pojednává o metodě indukčně vázaného plazmatu ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Následující kapitola navazuje na předchozí a zabývá se hmotnostní spektrometrií a to od popisu teoretických principů až po popis typů hmotnostních spektrofotometrů. Konec kapitoly uvádí do problematiky využití hmotnostní spektrometrie v kombinaci s chromatografií. Vysvětlení základů a aplikací elektrochemických a spektrálních metod detekce autor věnoval něco kolem 250 stránek.

Od dvacáté třetí kapitoly knihy jsou vysvětlovány pojmy a principy související se separačními metodami. Kromě charakteristiky a využití extrakčních metod, lze v této části knihy nalézt kapitolu věnovanou plynové, vysoce účinné kapalinové, iontově výměnné nebo afinitní chromatografii. Autor učebnice také neopomenul popis základů kapilární elektrochromatografie a kapilární elektroforézy, která v současnosti nachází významné uplatnění při analýze proteinů a nukleových kyselin. Využití separačních postupů v kvantitativní chemické analýze se autor nevěnuje tak podrobně jako předchozím kapitolám. Celkem je separačním metodám věnováno přibližně 100 stran z celkového obsahu knihy.

Zbylá část textu se věnuje obecnějšímu tématu. Probrány jsou zde otázky vhodné přípravy vzorků, validace analytických metod a možné chyby, které mohou výrazně zasahovat do výsledků analýzy. Této problematice je věnováno necelých 100 stran textu.

Kromě výše uvedeného je učebnice doplněna o seznam literatury, který je členěn podle tématu jednotlivých kapitol. Kromě významných učebnic, kompendií a ročenek jsou zde převážně citovány původní vědecké práce, což bezesporu svědčí o přehledu autora knihy v dané problematice. Za výčet použité literatury je k nalezení, také terminologický slovník a příloha knihy. Tato příloha obsahuje přehled těch nejdůležitějších matematických výrazů, chemických rovnic, výčet disociačních konstant a rozpustností a mnoha dalších užitečných tabelovaných hodnot, které se v analytické chemii využívají. V knize také nechybí rejstřík a mnoho černobílých a dvojbarevných obrázků a schémat, které bezesporu obohacují a zpřehledňují tematiku jednotlivých kapitol.

Závěrem nutno podotknout, že předkládaná kniha je dobrým studijním materiálem problematiky kvantitativní chemické analýzy. Jak je patrné z předchozího textu některé analytické metody v knize chybí, naopak metody spektrální a elektrochemické jsou v publikaci dostatečně popsány a značná část textu je věnována obecným základům kvantitativní analýzy. Kniha je psána stylem, který ne vždy umožní pochopení výkladu širokému spektru čtenářů. Jako by byla kniha psána především pro čtenáře chemika, pro zájemce z jiných oblastí vědy jako je například biologie, medicína nebo farmakologie bude text v některých pasážích hůře stravitelný. I přes kritické předchozí věty jsme přesvědčeni, že kniha je cenným zdrojem informací pro každého analytického chemika, studenta nebo vědce.

Jan Vacek a René Kizek
 Ústav chemie a biochemie, MZLU v Brně

I. Malijevská, A. Malijevský,
J. Novák:

Záhady, klíče, zajímavosti očima fyzikální chemie,
vydalo Vydavatelství VŠCHT, Praha 2004.
Stran 264.

V recenzované knížce je toho tolik, co stojí za přemýšlení a diskusi, že by se vyplatilo o ní uspořádat polo (celo) denní mikrosymposium. Jde o originální a neotřelý pohled na vybrané oblasti fyzikální chemie, pohled zkušených učitelů, vybavených pozorovací schopností zdatných přírodovědců/inženýrů, které navíc zajímají radosti a svízele současné civilizace. Je dobře, že autoři mají srdečný vztah k humoru, o čemž svědčí nejen to, že pozvali svého kolegu – chemika (Ing. J. Budku, Ph.D.), aby doprovodil dílo rozvernými ilustracemi.

Které partie kniha zahrnuje? Po Úvodu následuje Seznam symbolů (dnes často opomíjený a přitom tak důležitý) a dále následuje 19 kapitol, nadepsaných takto: Co je teplota?; Aby se zachovávala (rozumí se energie); Co je entropie; Studium plynů; Jak si molekuly vybírají skupenství; Svatby a rozvody aneb chemické reakce; Neúprosný čas; Nic netrvá věčně (kapitola o korozi); Velká čísla; Voda, samá voda; Jezdím, jezdiš, jezdíme (chemie automobilismu); Bože, jaká je to kráska! (chemie a vojenství); Potěšte své nadledvinky (složky živé hmoty a potravinářství); Štíhlá jako laň (strava a energetika); Chemie v našem těle (chemie životních procesů); Kde vzít a nekrást (energie); Vánoční (o hoření nejen svíčky). Knihu uzavírá seznam použité literatury (uspořádaný abecedně podle autorů), obsahující přes padesát děl. Pro čtenáře by bylo užitečnější, kdyby literatura byla rozčleněna podle předcházejících kapitol a kdyby alespoň některá z děl byla kraťoune komentována. Je dobře, že autoři uvádějí mnoho ročníků časopisu *Journal of Chemical Education* jako zdroj inspirace; duch celé jejich knížky je však tak poznamenán jejich osobitostí, stylem a dikcí, že šlo zřejmě jen a jen o počáteční popud.

Ani ne dvacetirádková charakteristika díla na (nečíslované) str. 2 začíná větou „Současná fyzikální chemie je vědní obor, jenž tvoří teoretický základ inženýrských oborů“. Tato věta se mi nelíbí proto, že existují inženýrské obory, u nichž *fyzikální chemie* není základem, ale, a to je horší, existují obory, v nichž fyzikální chemie má roli stěžejní, a není na ně poukázáno. Mám na mysli především oblast molekulových věd, rozprostírajících se od části fyziky přes chemii, biodisciplíny až po část lékařství. Komu tedy tento svazek poslouží? Myslím, že je zna-

menitou doplňkovou četbou (tedy *není* učebnicí jak ostatně autoři sami zdůrazňují) pro ty, kteří na různých školách (chemických, přírodovědných, farmaceutických, lékařských) absolvovali větší či menší kurzy fyzikální a obecné chemie a touží po opravdovém, po hlubším porozumění.

Překlepů jsem našel málo a neuvádím je, protože autoři si jich už zajisté také všimli. Několik bodů, na něž mám jiný názor než autoři, uvádím. Jde vesměs o drobnosti. Přísluší-li jeden symbol více veličinám, je to uvedeno na více řádcích. V případě symbolu F (str. 14) tomu tak není a navíc F, jako symbol pro Helmholtzovu energii, se mi vůbec nelíbí. V poslední řádce na str. 33 místo slova *nebo* by byla vhodnější spojka *a* (odhlížím od zamrzlé rotace při 0 K). Prvá věta v rámečku na str. 36: místo *následující* raději *tento*. Pěkných je pár řádek na str. 51 v odstavci nadepsaném „Energetická nebo entropická krize?“ Zato vývody v rámečku pod nadpisem „Entropie a tržní cena“ mě plní rozpaky. Soudím, že údaje typu „6 krát méně“ jsou, ač rozšířené, nepřijatelné (str. 99, třetí řádka v rámečku). Vysvětlení, proč mizí zákal čerstvě natočené vody (str. 168), se mi nezdá dostatečné. V poslední řádce na str. 253 je vedle překlepu třeba dát do pořádku interpunkci. V kapitole „Vánoční“ (str. 257, 258) se používá promiskuitně pojmů vosk a parafin, ač nejde o totéž. Ve Faradayově době šlo o svíčky voskové, dnes jsou parafinové. Poznámka v rámečku „Sodík a voda“ (str. 259) je neobratně napsána. Navíc, vzpomínám-li si dobře, ke spontánnímu hoření vodíku dojde pouze v případě reaktivnějšího draslíku, ne však sodíku (alespoň v případě, že jej není veliký kus). To vše jsou drobnosti. Za jediný opravdový hřích pokládám to, že v knížce není rejstřík. Nejenže by tam být měl, měl by být podrobný, tedy kvalitní. V případě 2. vydání (nepochybují, že k němu dojde) je nevyhnutelně třeba zavést stať o teorii chemické vazby a o souvislostech struktury molekul a jejich vlastnostech. Kdyby k tomu nedošlo, šlo by o hřích přímo smrtelný. Soudím, že by autoři měli brzo připravit anglickou verzi díla.

Četná poučení v rámečcích jsou věru užitečná. Hodnotné jsou mnohé příklady. Čtenář, kterému je toho třeba, bude často povzbuzen tím, jak jednoduše lze řešit i poměrně složitá zadání.

Doporučení: Jděte a zakupte si svazek (i v případě, že jste Mistři; uvidíte, jak na věci pohlížejí jiní Mistři). Máte-li dobrého kolegu a přítele, zakupte svazky dva a budete mít pro něho pěkný dárek (recenzent *není* podílníkem Vydavatelství VŠCHT).

Rudolf Zahradník

CHEMICKÝ PRŮMYSL

Zahájení sanačních projektů k likvidaci starých ekologických zátěží ve SPOLANĚ

Jedním z problémů, který musí řešit podnik SPOLANA Neratovice je likvidace staré amalgamové elektrolyzy, kde se jedná převážně o znečištění sloučeninami rtuť, a likvidace nebo zajištění budov z bývalé výroby chlorfenolů, které jsou znečištěny sloučeninami souborně označovanými jako dioxiny (chlorderiváty dibenzodioxinů a dibenzofuranů), případně dalšími průvodními sloučeninami. Sanační práce jsou připravovány skupinou specialistů, v níž jsou zástupci sanačních firem vybraných Fondem národního majetku, zástupci Ministerstva životního prostředí ČR, České inspekce životního prostředí a dalších organizací. Během jednání se zástupci vybraných firem (firma SITA Bohemia pro likvidaci budov znečištěných dioxiny, firma TCHAS Ostrava pro likvidaci staré amalgamové elektrolyzy) seznámili s prostředím a požadavky na asanaci. V současné době probíhají přípravné práce na pilotní projekt asanace budov znečištěných dioxiny. Předpokladem pro obě sanace je získání rozhodnutí EIA (Environmental Impact Assessment), tj. Hodnocení vlivu akce na životní prostředí. Dále je nutné získat stavební povolení. Konečným termínem asanace objektů a půdy znečištěné rtuť je rok 2011, asanace budov znečištěných dioxiny rok 2008. Předpokládá se, že termíny budou nejen dodrženy, ale zkráceny.

Zdroj: Unipetrol magazin, ročník VI, č.2, (2003).

Staré ekologické zátěže v Litvínově – laguny jsou likvidovány a rekultivovány

V minulosti byly předpisy o nakládání s odpady mnohem méně přísné než nyní. Proto bylo možné v Růžodole za petrochemickým závodem Litvínov ukládat kapalné odpadní uhlíkaté frakce do tzv. lagun. Tento stav trval až do počátku 90. let. Nyní je vyvíjen postup likvidace a revitalizace těchto lagun. Je ověřován technologický postup likvidace. Z lagun bylo vytěženo 21 000 t kalů, které byly využity jako zdroj uhlíkatých surovin v plynárně Vřesová a v cementárnách. Dále bylo vytěženo 1600 t znečištěné zeminy, která je čištěna biodegradací.

Náklady na likvidaci prvních tří lagun okolo 280 mil Kč zajišťuje Fond národního majetku. Současně byly zahájeny práce na rekultivaci pozemků, které provádějí Vodní stavby. Do vytěžených lagun je navážen lomový kámen a zemina, asanace by měla být ukončena výsadbou keřů a zatravněním.

Problém využití ploch znečištěných chemickými látkami je aktuální v celém světě. Sledují se rizika s využitím spojená: při využití jako zemědělská plocha existuje mož-

nost pronikání stopových látek do zemědělských produktů, při využití k výstavbě obytných domů je rizikem uvolňování zbytkových chemických látek do ovzduší, podobně jako při využití jako rekreační prostor. Tyto aspekty budou sledovány i při rekultivaci lagun. Pokud vyhodnocení zkušeností s rekultivací prvních lagun bude postup aplikován i na laguny ostatní.

Zdroj: Kaučuk noviny, ročník 38, č. 16, prosinec (2003).

Jsou zdraví škodlivé ořechy z území DEZA Valašské Meziříčí?

V ochraně životního prostředí a ochraně zdraví je obtížné rozlišit, co je prokázáný fakt, co jen neopodstatněný předpoklad, co je neopodstatněná obava a co je představa pěstovaná reklamou. V areálu podniku DEZA roste vlašský ořešák. Někteří zaměstnanci sbírají ořechy z tohoto stromu, někdy s obavou, zda v plodech není vysoký obsah škodlivých sloučenin. Problém zdravotní nezávadnosti ořechů ze stromů rostoucích kolem silnic je obecnějším problémem, který znepokojuje mnoho obyvatel, kteří sbírají ořechy ze stromů rostoucích kolem silnic. Výsledky průzkumu provedeného v podniku DEZA mohou tedy zajímat i běžného občana. Vedení podniku zadalo výzkumný úkol stanovit obsah škodlivých látek v plodech ořešáku rostoucího na území závodu a porovnat jej s obsahem škodlivých látek v plodech z jiných lokalit. Vlašské ořechy spadají do třídy potravin skupiny B, v kterých je limitován obsah vybraných PAH (PAH je zkratka odvozené z angličtiny – Polyaromatic Hydrocarbons – Polyaromatických uhlovodíky). Obsah jednotlivých aromatických uhlovodíků nesmí překročit hranici 10 mikrogramů na kg, přičemž součet koncentrací těchto sloučenin nesmí překročit hranici 10 mikrogramů PAH v 1 kg jader. Při výzkumu byl porovnán obsah PAH v jádrech stromu rostoucího v areálu výroby DEZA porovnán s obsahem v plodech ze stromů rostoucích v jiných lokalitách:

Opava, bez průmyslového znečištění,
Poličná, strom stáří 20 let,
Poličná, strom stáří 4 roky,
Horní Bečva, strom stáří 20 let,
Valašské Meziříčí, mimo závod.

Analýzy prokázaly, že ve všech plodech, nezávisle na lokalitě, v níž strom roste, nezávisle na stáří stromu, byla koncentrace PAH menší než $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (stanoveno metodou HLPC). Není proto důvod obávat se závadnosti ořechů a ořešáky mohou být proto využity i při řešení zeleně v závodech.

Zdroj: Valašský chemik, čtrnáctideník DEZA, Valašské meziříčí, Ročník 36, číslo 21, listopad 2003.

OBSAH

ÚVODNÍK	823
REFERÁTY	
Xanthohumol-chmelová pryskyřice nebo polyfenol?	825
P. Hořta, P. Dostálek a G. Basařová	
Polarografie a medicína (očima internetového vyhledávače MEDLINE v údobí od roku 1997)	831
R. Kalvoda	
Analytické metody studia cytokininů	834
P. Tarkowski, K. Doležal a M. Strnad	
Biochemické vlastnosti proteolytických enzymů	842
M. Hřčková, E. Šturdík, T. Maliar a J. Zemanovič	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Metodika řešení systému následných reakcí prvního a pseudoprvního řádu z časového záznamu UV-VIS spekter	851
J. Hanusek a J. Svoboda	
Vliv periodicky modulovaného nástřiku na zádrž kapaliny a tlakovou ztrátu zkrápěného reaktoru	859
V. Tukač a J. Hanika	
Technological aspects of acid decontamination of carcasses	865
P. Pipek, P. Fíla, J. Jeleníková, J. Brychta a M. Miyahara	
VÝUKA CHEMIE	
Stačí ke zlepšení vysokoškolské výuky jen více peněz?	870
J. Pacák	
RECENZE	871
CHEMICKÝ PRŮMYSL	873

CONTENTS

EDITORIAL	823
REVIEW ARTICLES	
Xanthohumol - a Hop Resin or a Hop Polyphenol?	825
P. Hořta, P. Dostálek, and G. Basařová	
Polarography and Medicine (from the Viewpoint of the MEDLINE Internet Searcher)	831
R. Kalvoda	
Analytical Methods in Cytokinin Research	834
P. Tarkowski, K. Doležal, and M. Strnad	
Biochemical Properties of Proteolytic Enzymes	842
M. Hřčková, E. Šturdík, T. Maliar, and J. Zemanovič	
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Methods of Solution of a System of First-order and Pseudofirst-order Consecutive Reactions Based on Time Dependence of UV-VIS Spectra	851
J. Hanusek and J. Svoboda	
The Effect of Modulated Feed on Liquid Hold-up and Pressure Drop in Trickle Bed Reactor	859
V. Tukač and J. Hanika	
Technological Aspects of Acid Decontamination of Carcasses	865
P. Pipek, P. Fíla, J. Jeleníková, J. Brychta, and M. Miyahara	
EDUCATION IN CHEMISTRY	
Is More Money Sufficient for Improvement of University Teaching ?	870
J. Pacák	
BOOK REVIEWS	871
CHEMICAL INDUSTRY	873

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 98 (2004), čís./no. 9 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 128, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 114 • 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 • REDAKTORI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drařar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podeřva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: M. Bláhová, I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámostný • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Mišek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, 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; tel/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 © 2004 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 140 Kč, roční plně předplatné 2004 (12 čísel) 1440 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 720 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 2004 (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 zaslány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností.