

## Vysoká škola chemicko-technologická také v Mostě-Velebudicích

VŠCHT Praha otevře v Mostě-Velebudicích v září 2004 Výukové a studijní centrum. Škola s více než 170letou tradicí výuky technické chemie bude nabízet v severních Čechách bakalářské studium průmyslově orientovaného studijního programu „Aplikovaná chemie a materiály“ ve formě prezenčního i kombinovaného studia (denního studia i studia při zaměstnání) a také kurzy celoživotního vzdělávání.

Rozhodnutí vytvořit v Mostě pracoviště VŠCHT Praha je výsledkem iniciativy pracovníků školy, vedení Ústeckého kraje, mosteckého magistrátu a většiny průmyslových podniků regionu, např. Chemopetrolu, České rafinérské, Glaverbelu Czech, Spolchemie, Setuzy, Chemopharmy a Eastmanu Sokolov. Otevření studia je v souladu s Boloňskou deklarací a dlouhodobým záměrem MŠMT ČR, zaměřenými na zkvalitnění vysokoškolského vzdělávání a zpřístupnění terciárního vzdělávání většímu okruhu zájemců. Severozápadní region patří v současné době k oblastem s nejvyšší nezaměstnaností, na druhé straně je místem působení velkého počtu firem chemického, petrochemického, sklářského, keramického a farmaceutického průmyslu, které budou zaměstnávat velký počet chemiků – vysokoškoláků. VŠCHT Praha je proto připravena podpořit společenský a hospodářský rozvoj severozápadního regionu a zároveň zvýšit společenskou prestiž technických profesí. Založení Centra představuje také potenciál pro možné budoucí vytvoření vědecko-technologického parku v severozápadním regionu. Centrum v Mostě není proto odrazem módních iniciativ např. typu „u každé továrny univerzita“, ale je určitým vyvrcholením a naplněním dlouholeté intenzivní spolupráce a vzájemné podpory Vysoké školy chemicko-technologické v Praze a průmyslových podniků severozápadního regionu.

V souladu se současnými trendy evropského vysokého školství nebudou uchazeči o studium v akademickém roce 2004/2005 absolvovat písemné přijímací zkoušky, ale budou přijímáni pouze na základě ukončeného středoškolského vzdělání a posouzení studijních výsledků u vybraných předmětů. Přednášky, cvičení a semináře budou probíhat výhradně ve Velebudicích. Laboratorní cvičení budou zajištěna v rozsahu dvou až tří týdnů za semestr ve specializovaných laboratořích pražské vysoké školy. Pro některá laboratorní cvičení, především ve třetím ročníku studia, budou využity laboratoře blízkých průmyslových partnerů. Na výuce předmětů zaměřených na průmyslovou praxi se budou významně podílet špičkoví odborníci z regionálních podniků a institucí, intenzivní spolupráce s místní průmyslovou sférou je plánována zejména v rámci studentských prací a při vypracovávání závěrečných bakalářských prací.

VŠCHT bude ve Velebudicích nabízet v rámci bakalářského studijního programu „Aplikovaná chemie a materiály“ dva obory pro prezenční a kombinované studium a jeden obor pro prezenční studium. V rámci oboru „Chemie a chemické technologie“ získá absolvent studia praktické znalosti o základních anorganických a organických velkotonážních technologiích, bezpečnosti práce a ochraně životního prostředí. Seznámí se i se syntézou a výrobou chemických specialit.

Studium oboru „Chemie a technologie materiálů“ nabízí praktické znalosti o výrobě a vlastnostech chemických produktů, jako jsou např. sklo, keramika, plasty a kaučuky a biomateriály pro medicínské účely. Studenti se seznámí s procesy povrchové úpravy a ochrany kovů, s problematikou ochrany a obnovy kulturních památek a s ekologickým zpracováním odpadů. V oboru „Informatika a chemie“ určeném pro prezenční studium získají studenti praktické znalosti o základech moderního elektronického zpracování a publikování informací. Seznámí se s knihovnickými a vydavatelskými postupy a naučí se aplikovat získávané znalosti při řešení projektů týkajících se chemie a životního prostředí. Prakticky zvládnou práci s moderními technologiemi pro elektronické publikování (e-publishing).

Široké spektrum volitelných předmětů a kreditní systém umožní všem studentům vytvářet do určité míry vlastní studijní programy. Pro studenty budou připraveny inovované, elektronické studijní materiály a návody k laboratořím a řada témat samostatných projektů, orientovaných např. u studentů při zaměstnání na jejich konkrétní pracovní zaměření. K výuce a zároveň k samostatné práci a studiu bude zřízena v Mostě počítačová učebna, která bude propojena do sítě Internet i do sítě VŠCHT Praha. Studenti tak budou mít možnost plně využívat elektronické informační zdroje kvalitně vybavené ústřední knihovny VŠCHT Praha (např. databáze organických látek, abstraktů i plných textů časopiseckých článků, databáze nebezpečných látek a elektronické encyklopedie).

Absolventi bakalářského studia v Mostě obdrží titul bakalář (Bc.). Budou připraveni nejen pro přímé uplatnění v praxi, ale i pro další pokračování studia ve dvouletých navazujících magisterských a případně dalších tříletých doktorských programech, po jejichž ukončení získají titul inženýr nebo doktor. Bakaláři najdou uplatnění ve velkých výrobních závodech, v malých provozech soukromého sektoru a také ve výzkumné sféře. Uplatní se v poradenských kancelářích, projekčních společnostech, obchodně technických organizacích a domácích i zahraničních obchodních společnostech, ale i ve státní správě. Absolventi s osvojeným technickým a systémovým myšlením mohou po zapracování nalézt uplatnění prakticky ve všech technických oborech.

Zřízení a hlavně samotný provoz Výukového a studijního centra v Mostě bude vyžadovat nesporně vysoké finanční náklady, na kterých se budou podílet nejen VŠCHT v Praze, ale i územní samospráva a průmysloví partneři vysoké školy. Na druhé straně však mostecké Centrum umožní čerstvým i starším absolventům středních škol nebo jiných vysokých škol získat kvalitní vysokoškolské technické vzdělání v místě jejich bydliště a s nižšími náklady než v Praze. Navíc studium technické chemie nepatří mezi některé módní obory, u kterých se již dnes s vysokou pravděpodobností předpokládají potíže při uplatnění absolventů v praxi, spojené s dalším vynakládáním finančních prostředků na pozdější podporu v nezaměstnanosti a na rekvalifikaci.

Zdeněk Bělohav

## KDE ROSTE ADAMANTAN

ROBERT VÍCHA a MILAN POTÁČEK

*Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta  
Masarykovy Univerzity v Brně  
Kotlářská 2, 611 37 Brno  
rvicha@chemi.muni.cz, potacek@chemi.muni.cz*

Došlo 20.6.02, přepracováno 5.5.03, přijato 27.5.03.

Klíčová slova: adamantan, výskyt, přírodní zdroje, příprava, výroba

### Obsah

1. Úvod
2. Ropa
3. Klasické postupy
4. Přesmyky
5. Současná živá příroda
6. Závěr

### 1. Úvod

Sloučeniny odvozené od adamantanu pronikly, od doby objevení tohoto uhlovodíku počátkem třicátých let minulého století, do nejrozličnějších oblastí chemických věd. Sloužily při zkoumání procesů probíhajících při tvorbě ropy, při studiu iontových i radikálových přesmyků, solvolytických reakcí atd. Díky svým specifickým vlastnostem našly v současné době uplatnění zejména ve farmacii a v elektrotechnickém průmyslu.

Protože jednou z postav, které stály v počátcích této zajímavé kapitoly organické chemie, byl prof. Stanislav Landa z Ústavu technologie paliv a svítiv a technologie vody (jako první prezentoval izolaci adamantanu z hodonínské ropy na XII. sjezdu průmyslové chemie roku 1932 v Praze), rádi bychom toto ohlédnutí věnovali právě jemu.

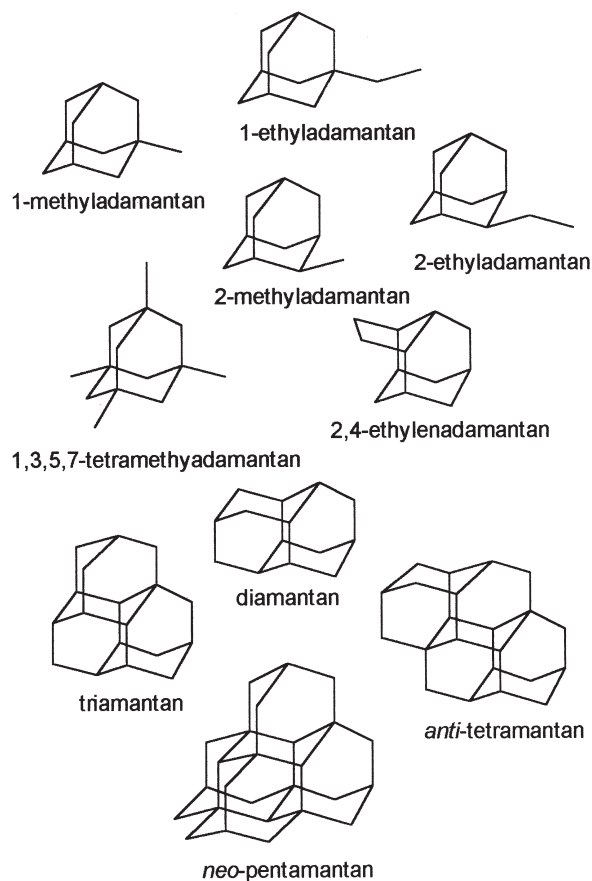
Následující odstavce shrnují dosavadní znalosti a informace o zdrojích uhlovodíků s adamantanovým skeletem, a to jak přírodních (ropa a současná živá příroda), tak umělých (laboratorní i průmyslová syntéza). V této souvislosti budou zmíněny všechny známé, významné reakce a procesy vedoucí k látkám s adamantanovým skeletem.

### 2. Ropa

Jak již bylo zmíněno, adamantan se poprvé podařilo izolovat z hodonínské ropy<sup>1</sup>. Jak už to bývá, nešlo v počátcích o cílený proces, ale o komplikaci při frakční destilaci ropy, kdy v předloze kondenzovala pevná látka o velmi vysokém

bodů tání. Poté co byla identifikována jako adamantan, byl tento uhlovodík separován z ropných podílů, zpočátku opakovanou frakční destilací ropného podílu destilujícího s vodní parou, později extrakční krystalizací s thiomocovinou<sup>2</sup>. Jakkoliv byly tyto metody elegantní, nikdy neposkytovaly příliš významná množství adamantanu, neboť jeho koncentrace v hodonínské ropě dosahuje pouze 0,02-0,03 %. Na dokreslení, pro získání 200 g adamantanu bylo nutné zpracovat 66 kg ropné frakce vydestilované s vodní parou. Je tedy snadno pochopitelné, že izolace z ropy sloužila jako zdroj adamantanu jen do objevu efektivních cílených syntetických metod.

V ropě byla detekována celá řada dalších látek obsahujících ve své struktuře adamantanový skelet. Hojně jsou zastoupeny methyl- a ethyladamantany nesoucí až čtyři alkyly<sup>3</sup>. Mezi další zajímavé struktury izolované z ropy bezesporu patří diamantan a 2,8-ethylenadamantan<sup>4</sup>. Z vyšších homologů adamantanu byly v kondenzátu, získaném při jímání zemního plynu z velmi hlubokých vrtů (~ 6800 m) na amerických nalezištích v Mexickém zálivu, identifikovány dokonce triamantan, *anti*-tetramantan, *neo*-pentamantan a jeden blíže neučený isomer hexamantanu<sup>3,5</sup> (obrázek 1) (názvosloví polymantanů,



Obr. 1. Některé z derivátů adamantanu, jejichž přítomnost v ropě je prokázána

cit.<sup>6)</sup>. Množství zmíněných uhlovodíků jsou však velmi malá a směsi natolik komplikované, že separace jednotlivých složek je až na výjimky prakticky nemožná.

Velmi zajímavá otázka, jak se adamantan a jeho deriváty v ropě ocitly, zůstává navzdory dlouhé době uplynulé od prvotního objevu stále nezodpovězena. Je možné a pravděpodobné, že ke vzniku adamantanových struktur došlo během dlouhého geotermálního procesu formování ropy. Za podmínek, které při tomto ději mohly panovat – teplota až 230 °C a tlak větší než 69 MPa – docházelo k přeměně původního organického materiálu na soubor rozvětvených uhlovodíků a dále na adamantan (schéma 1). Tyto reakce by

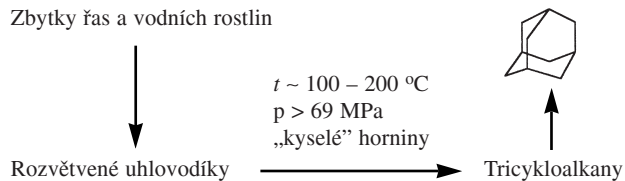


Schéma 1

mohly být katalyzovány horninami, které mají charakter Lewisových kyselin, např. hlinitokřemičitany a křemičitany. V této souvislosti Landa<sup>7</sup> prokázal, že zbytek po separaci adamantanu poskytuje reakci s chloridem hlinitým další podíl adamantanu.

Protože organický materiál neobsahuje žádné vhodné polycyklické uhlovodíky, které by mohly sledem přesmyků poskytovat vyšší polymantany, musí existovat jiná cesta vedoucí k těmto uhlovodíkům, vyskytujícím se v ropě. Takovou možností by mohla být přírodní obdoba syntetické metody, kterou Burns jako první připravil *anti*-tetramantan<sup>8</sup>. Základní skelet adamantanu či diamantanu je alkylován za katalýzy jílovými horninami a takto získaný uhlovodík přesmykuje na vyšší homolog adamantanu (schéma 2).

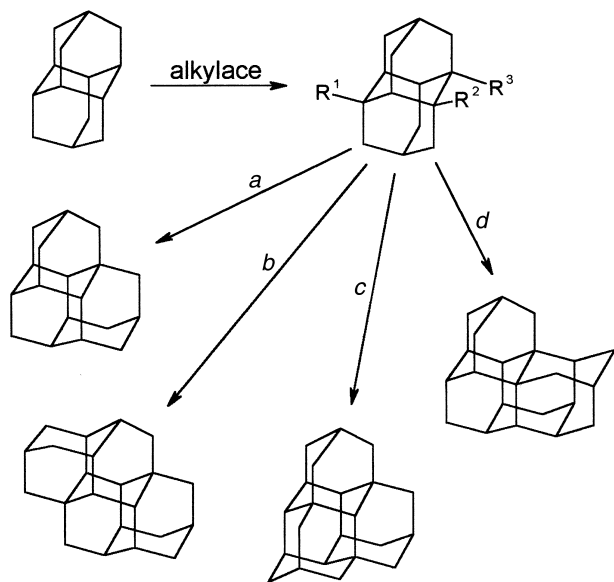


Schéma 2. a –  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{C}_4\text{H}_x$ ; b –  $R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = R^1 = \text{C}_4\text{H}_x$ ; c –  $R^3 = \text{H}$ ,  $R^1 = R^2 = \text{C}_4\text{H}_x$ ; d –  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{C}_4\text{H}_x$

Jinou zcela odlišnou možnost navrhli na základě svých experimentů Uskov a spol.<sup>9</sup>, kteří podrobili komerční  $\alpha$ -lecithin střídavě UV-indukované polymerizaci a oxidaci vzdušným kyslíkem za vzniku produktů, jejichž přeměnu na adamantan znázorňuje schéma 3. Zpracování výsledné

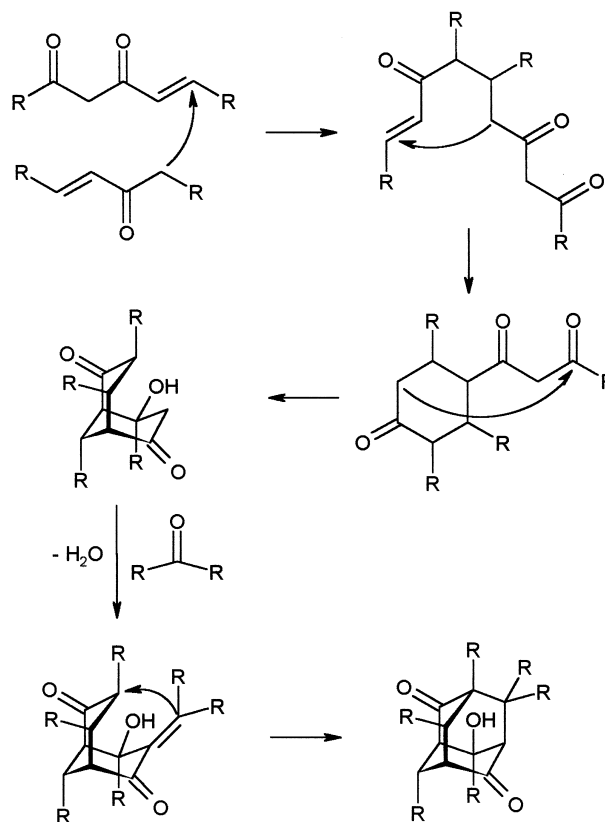


Schéma 3

směsi metodou GC-MS ukázalo mezi osmdesáti látkami přítomnost čtyř derivátů adamantanu.

Vzhledem k tomu, že se lipidy vyskytují v živých organizmech ve velkém množství, je tato jejich prokázaná „aerobní“ transformace na adamantan principiálně odlišnou alternativou k dříve již zmíněné možnosti. Takto však nevzniká samotný adamantan, alespoň se to zatím nepodařilo prokázat, zato vznikají neobvyklé adamantany substituované až osmiuhlíkovými postranními řetězci. Nicméně následné hydrotermální degradační procesy zahrnující redukce a dealkylace mohou vést k adamantanu. Navíc je prokázán výskyt adamantanu i v ropě, která vznikala na bazickém uhličitanovém podloží<sup>10</sup>, takže zde nemohlo docházet k obvyklým přesmykům vyžadujícím pro svůj průběh Lewisovy kyseliny.

Je zajímavé, že adamantany substituované uhlovodíkovými zbytky delšími než ethyl se v ropě nevyskytují, alespoň ne v detekovatelných množstvích. To však nesouhlasí s předpokladem nutné přítomnosti C4-zbytků pro tvorbu vyšších polymantanů. Právě tyto adamantany substituované až oktylem však byly detekovány Uskovem<sup>9</sup>, který vychá-

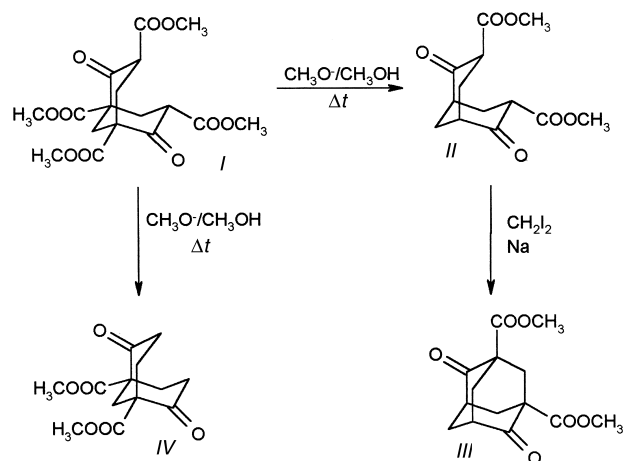


Schéma 4

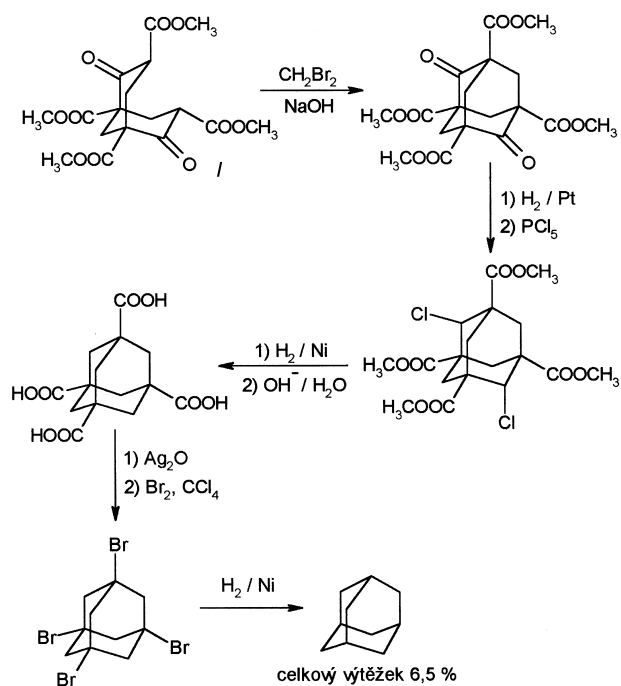


Schéma 5

zel z lipidů. Takže, jakým způsobem se adamantan do ropy dostal?

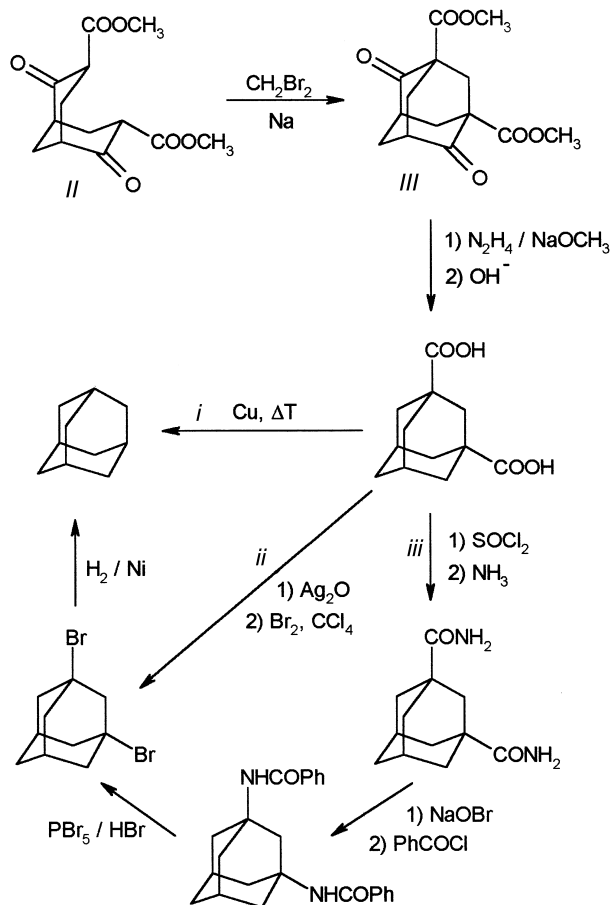
### 3. Klasické syntetické postupy

První neúspěšný pokus o syntézu derivátů adamantanu<sup>11</sup> učinil Meerwein již v roce 1922, tedy ještě před Landovým objevem. Výchozí látkou, stejně jako při některých pozdějších úspěšných pokusech, byl tzv. Meerweinův ester **I**, získaný reakcí formaldehydu s dimethyl-malonátem. První syntéza, znázorněná na schématu 4, nevedla k očekávanému derivátu adamantanu **III** pravděpodobně proto, že v prvním stupni nevzní-

kal derivát **II**, ale produktem byl spíše **IV**, který zjevně nemohl reagovat očekávaným způsobem s diiodmethanem.

První úspěšnou syntézu adamantanového skeletu pak publikoval Böttger v roce 1937, kdy vyšel přímo z Meerweinova esteru a reakcí s dibrommethanem v alkalickém prostředí získal očekávaný substituovaný adamantan<sup>12</sup>, jak ukazuje první reakce schématu 5.

Nesubstituovaný adamantan byl posléze připraven Prelogem a Seiwertem<sup>13</sup>. Za podmínek *i*) ve schématu 6, získali 0,3 % výtěžku adamantanu. Ani jiné metody převedení adamantan-1,3-dikarboxylové kyseliny na adamantan *ii*) a *iii*) nepřinesly výrazné zvýšení výtěžku. Z klasických metod je pak z hlediska výtěžku adamantanu nejvýhodnější způsob zobrazený ve schématu 5 (cit.<sup>14</sup>). Meerweinův ester byl již zmiňovanou reakcí s dibrommethanem převeden na derivát adamantanu. Hydrogenace a následné působení chloridu fosforečného vedlo k přeměně dioxoderivátu na dichlorderivát, který poskytl po reakci s vodíkem a alkalické hydrolyze adamantan-1,3,5,7-tetrakarboxylovou kyselinu. Analogický tetrabromadamantan získaný po reakci s oxidem stříbrným a bromem byl v konečném stupni převeden na adamantan opět reakcí s vodíkem. Ovšem ani zde nebyl výtěžek adamantanu o mnoho vyšší – pouhých 6,5 %. Z uvedených údajů

Schéma 6. Celkové výtěžky; *i* 0,3 %, *ii* 1,5 %, *iii* 3,1 %

je zřejmá nevhodnost uvedených metod pro běžnou laboratorní syntézu adamantanu, natož pro průmyslovou produkci. Jejich význam však spočíval především v tom, že poskytly autentický vzorek adamantanu pro srovnání a definitivní identifikaci adamantanu izolovaného z ropy.

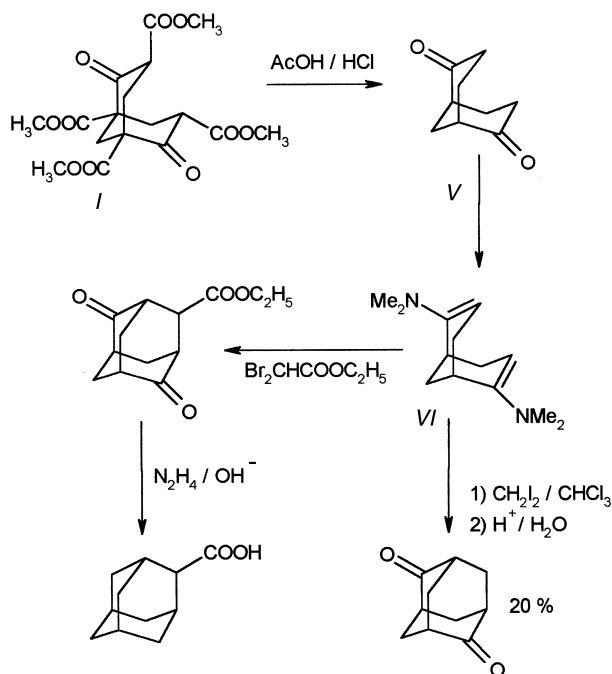


Schéma 7

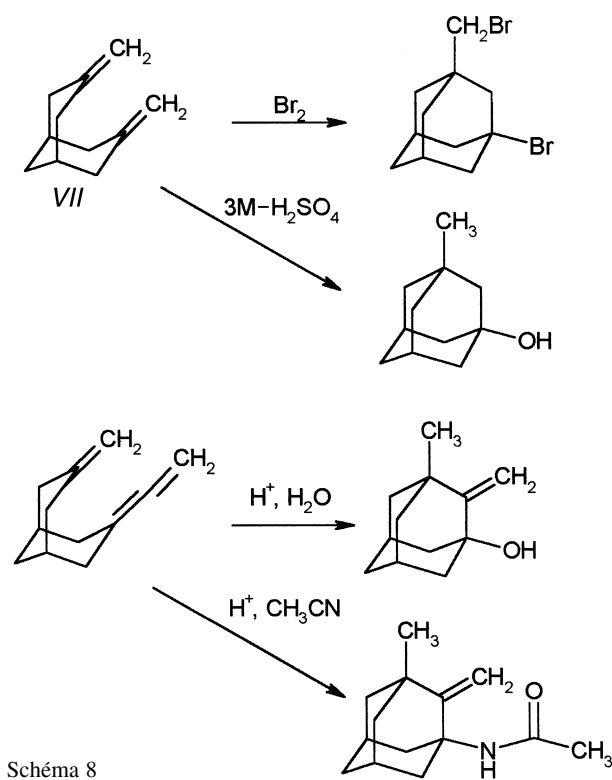


Schéma 8

Další nesporný význam těchto klasických chemických postupů spočívá v možnosti připravit jinak nedostupné deriváty adamantanu (schéma 7). Tak například dekarboxylace Meerweinova esteru v kyselém prostředí vede ke vzniku diketonu V, který po převedení na enamín VI poskytuje s vhodnými elektrofilními činidly deriváty adamantanu. Reakcí s ethyl-dibromacetátem a následnou redukcí hydrazinem je možné připravit adamantan-2-karboxylovou kyselinu<sup>15</sup>. Pro celou řadu 2,6-disubstituovaných derivátů adamantanu je pak klíčovým meziproduktem adamantan-2,6-dion dostupný reakcí enamínu VI s diiodmethanem<sup>16</sup>.

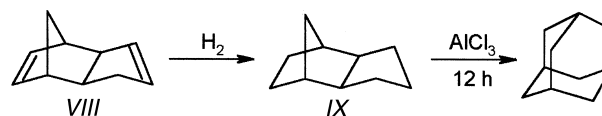


Schéma 9

Zajímavou možnost syntézy adamantanového skeletu představují takzvané transannulární cyklizační reakce vycházející z 3,7-dimethylenbicyclo[3.3.1]nonanu VII (schéma 8), nebo podobných sloučenin s exocyklickými dvojnými vazbami v patřičných pozicích. Tak například VII (schéma 8) reaguje s bromem za vzniku 3-brom-1-(brommethyl)adamantanu<sup>17</sup> nebo se zředěnou kyselinou sírovou za vzniku 3-methyladamantan-1-olu (cit.<sup>18</sup>). Ke vzniku adamantanu dochází po ataku elektrofilní částice ( $H^+$ ,  $Br^+$ ) na jednu z dvojných vazeb, kdy se přechodně vzniklý karbokation stabilizuje interakcí s druhým  $\pi$ -systémem a takto vzniklý karbokation zaniká reakcí s přítomným nukleofilem ( $Br^-$ ,  $H_2O$ ). Obdobné reakce potvrzující uvedený mechanismus lze pozorovat rovněž na allenovém systému<sup>19</sup> (schéma 8).

#### 4. Přesmyky

V předchozích odstavcích byla zmíněna celá řada postupů a reakcí vedoucích k adamantanu. Žádná z nich však neposkytuje uspokojivý výtěžek a nelze je tedy dlouhodobě využívat jako zdroj adamantanu.

Mezi strukturami o sumárním vzorci  $C_{10}H_{16}$  je právě adamantan látkou o nejnižší energii. Z tohoto důvodu je možné využít pro přípravu adamantanu přesmyků vhodných výchozích látek, které musí dříve či později skončit v energetickém minimu adamantanu. První taková reakce byla publikována v roce 1957 Schleyerem<sup>20</sup>, který podrobil hydrogenaci dicyclopentadienu a získaný tetrahydrodicyclopentadien IX zahříval pod refluxem přes noc s 10 % chloridu hlinitého (schéma 9). Přesněji řečeno, adamantan byl pouze vedlejším produktem při studiu *endo-exo*-isomerizace IX a byl autorem z reakční směsi odstraňován jako nežádoucí a komplikující příměs. Teprve později byla tato látka identifikována jako adamantan. Výtěžek takto provedené reakce se pohybuje v rozmezí 15–20 %. Pokud se namísto samotného  $AlCl_3$  použije  $AlCl_3 + HCl$  (cit.<sup>21</sup>) nebo  $HF-BF_3$  (cit.<sup>22</sup>), lze dosáhnout výtěžků 40 % nebo 30 %. Reakce po-

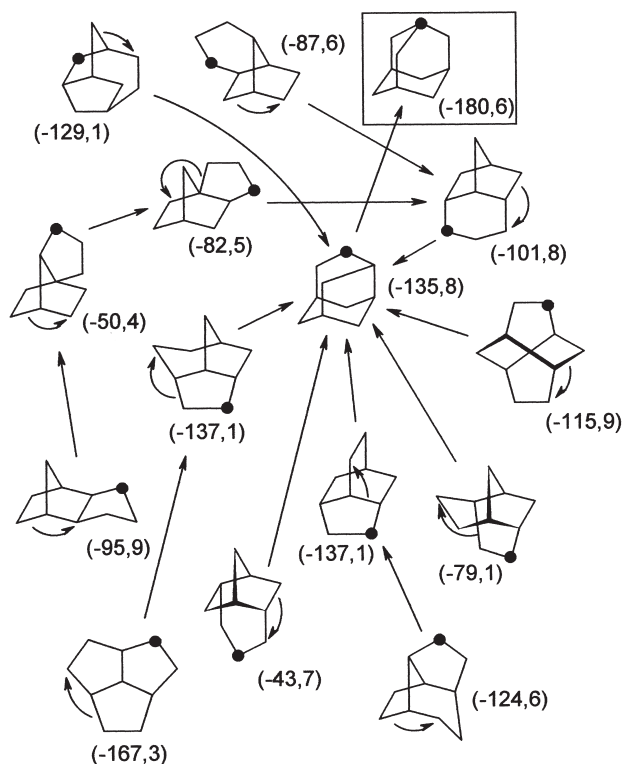
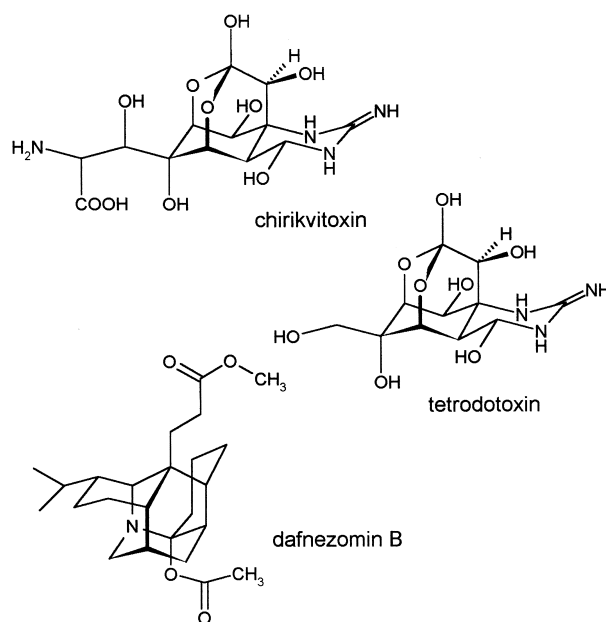


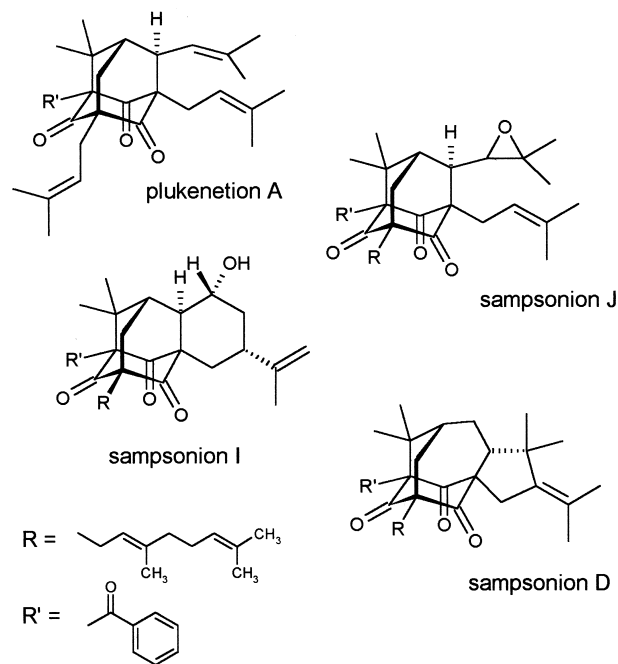
Schéma 10. V závorkách jsou uvedena slučovací tepla v  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  spočítaná semiempirickou metodou AM1. Černá tečka označuje vždy jeden konkrétní atom uhlíku a jeho polohu po přesmyku.

dle schématu 9, využívající pro katalýzu pouze chlorid hlinitý, se stala pro svou jednoduchost nejvýznamnějším komerčním zdrojem adamantanu, přestože výtěžky nepřesahují zmíněných 20 %. V České republice je takto vyráběn v podniku Pliva – Lachema a.s.. Pod tlakem rostoucích nároků na chemické výroby ve smyslu ochrany životního prostředí je snaha eliminovat značné množství nepříjemných odpadů při použití  $\text{AlCl}_3$ . V posledním desetiletí se zkoumá využití recyklovatelných zeolitových katalyzátorů isomerizace<sup>23,24</sup>. Tyto materiály se značně podobají přírodním, a tak to, že isomerizace IX na adamantan zde probíhá s přibližně stejnými výtěžky jako v případě  $\text{AlCl}_3$ , lze považovat za argument ve prospěch geotermální teorie vzniku adamantanu v ropě.

Na adamantan však izomerizuje, ve výtěžcích od 22 % až po prakticky kvantitativní, pestrá paleta uhlovodíků o sumárním vzorci  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$  (cit.<sup>25,26</sup>). Adamantan, jak již bylo zmíněno, totiž představuje energetické minimum na hyperploše potenciální energie, což na schématu 10 dokumentují slučovací tepla uvedená u příslušné struktury (vypočítaná semiempirickou metodou AM1). Schleyer<sup>27</sup> podrobil reakci s  $\text{AlCl}_3$  řadu přírodních látek a pokaždé obdržel určité procento substituovaných adamantanů. Tak například skvalen poskytuje po 90 hodinách 5 % (hmotnostně na množství výchozí látky) derivátů adamantanu, kyselina abietová po 75 hodinách 2 %, kamfen po 53 hodinách 9 %, cholesterol po 75 hodinách 11 % a cedren po 66 hodinách dokonce 44 %. Je zajímavé, že ani v jednom případě nebyla zjištěna přítomnost samotného adamantanu, zato reakční směs zpravidla obsahovala celou řadu různých methyl- a ethyladamantanů. Tyto experimenty tedy prokázaly, že deriváty adamantanu mohou za katalýzy Lewisovými kyselinami vznikat z běžných rostlinných metabolitů.



Obr. 2. Struktury přírodních heteroadamantanů



Obr. 3. Struktury derivátů adamantanu a homoadamantanu izolovaných z rostlin čeledi *Guttiferae*

cholesterol po 75 hodinách 11 % a cedren po 66 hodinách dokonce 44 %. Je zajímavé, že ani v jednom případě nebyla zjištěna přítomnost samotného adamantanu, zato reakční směs zpravidla obsahovala celou řadu různých methyl- a ethyladamantanů. Tyto experimenty tedy prokázaly, že deriváty adamantanu mohou za katalýzy Lewisovými kyselinami vznikat z běžných rostlinných metabolitů.

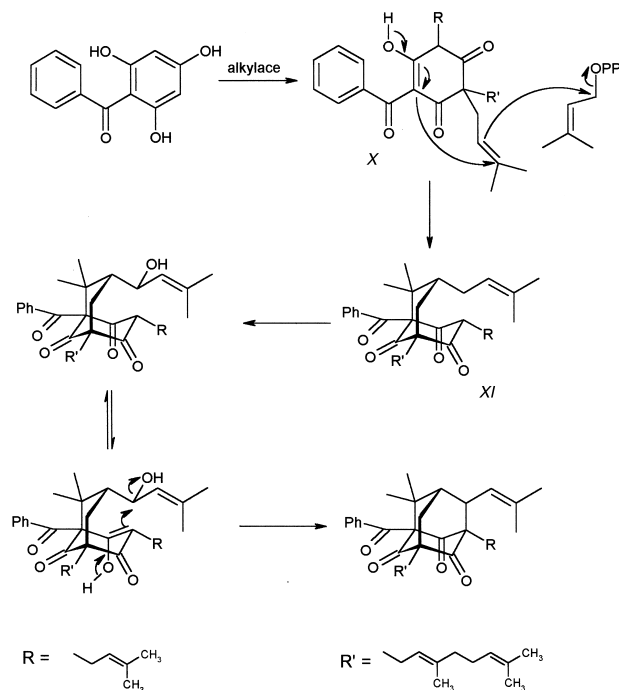


Schéma 11

## 5. Současná živá příroda

Adamantanové struktury, pomíneme-li diamant a ostatní minerály se stejným strukturálním motivem, nejsou v živé přírodě nikterak hojné, nicméně nelze říci, že se nevyskytují. Známý toxin ryb rodu *Fugu* tetrodotoxin nebo velmi podobný chirkivotoxin z žab rodu *Atelopus* jsou vlastně substituované heteroadamantany, přesně deriváty 2,4-dioxadamantanu (obrázek 2). Rovněž mezi alkaloidy můžeme nalézt zástupce s adamantanovým skeletem, přesně dafnesominy, deriváty 1-azaadamantanu, které byly izolovány z listů asijské rostliny *Daphniphyllum humile*<sup>28</sup> (obrázek 2).

Donedávna se soudilo, že živé organismy neumějí syntetizovat deriváty adamantanu a že jeho původ je čistě abiotický. S konečnou platností byl však tento názor v druhé polovině devadesátých let minulého století vyvrácen, když se podařilo izolovat a identifikovat některé účinné látky rostlin z čeledi *Guttiferae*, jež jsou právě deriváty adamantanu. Jako první byl izolován z rostliny *Clusia plukenetii* rostoucí na Malých Antilách plukenetion A (cit.<sup>29</sup>) a později z čínské třezalky *Hipericum sampsonii* sampsonion I a sampsonion J (cit.<sup>30</sup>, obrázek 3). Navíc tyto rostliny obsahují i deriváty homoadamantanu<sup>31,32</sup>, jako například sampsonion D. Zdá se, že obsah sekundárních metabolitů s adamantanovou strukturou je společný celé čeledi a pro další výzkum se nabízí možnost prokázat jejich přítomnost i v našich třezalkách. Tato oblast výzkumu by mohla mít velký význam, spojíme-li si prokázané antivirové účinky třezalkových výtažků s rovněž známým virostatickým účinkem některých jednoduchých aminoadamantanů. Nabízí se zde možnost objevu nových významných biologicky účinných

láték. Výchozí látkou při biosyntéze adamantanového skeletu (schéma 11) je pravděpodobně známý rostlinný metabolit 2,4,6-trihydroxybenzofenon. C-Alkylace geranyl-difosfátem a 3,3-dimethylallyl-difosfátem pak vede ke vzniku intermediátu X, který se mění současně s další alkyací 3,3-dimethylallyl-difosfátem na bicyklo[3.3.1]nonatrien XI. Následuje hydroxylace v allylové poloze a intramolekulární cyklizace, kdy vzniká adamantanový skelet. Známe-li tedy schopnost rostlin syntetizovat deriváty adamantanu, je snadné další hypotéza o původu adamantanu v ropě. Deriváty adamantanu mohly být přítomny už v původním organickém materiálu a během procesu vzniku ropy došlo k „očišťení“ adamantanového skeletu, a tak ke vzniku adamantanu. Přítomnost vyšších homologů se však takto vysvětlit nedá, neboť výskyt odpovídajících látek nebyl v živé přírodě dosud popsán a je ostatně velmi málo pravděpodobný. Pro tyto látky tedy zřejmě zůstává jedinou možností výše popisovaná cesta vycházející z adamantanu.

## 6. Závěr

Poprvé byl adamantan izolován z ropy, nicméně takto se již nezískává, neboť jeho výskyt je omezen pouze na některé ropy a i v nich je obsah příliš nízký. Zanedlouho po prvotním objevu byly deriváty adamantanu připraveny i uměle, klasickými syntetickými postupy. Bylo vyzkoušeno několik postupů vedoucích k samotnému adamantanu, ale pro velmi malé výtěžky jsou tyto metody nevhodné pro syntézu adamantanu ve větších množstvích. Vzhledem k tomu, že adamantan je struktura  $C_{10}H_{16}$  o minimální energii, lze pro přípravu adamantanu a jeho derivátů s úspěchem využít přesmyků katalyzovaných Lewisovými kyselinami. Proces založený na isomerizaci tetrahydrodicyklopentadienu chloridem hlinitým je v současnosti nejvíce využívaným průmyslovým zdrojem adamantanu. Další deriváty se získávají jeho následnou derivatizací. Vysoce substituované deriváty adamantanu se rovněž vyskytují v současné živé přírodě. Dosud byly prokázány v zástupcích dvou rodů z čeledi *Guttiferae* (kam se řadí i naše třezalky).

Co se týče původu adamantanu v ropě, nabízí se hned několik vysvětlení, přičemž je velmi málo pravděpodobné uplatnění analogie některého klasického postupu.

a) Velmi pestrou paletu látek (od cyklohexanu po skvalen) lze isomerizovat na adamantan či jeho deriváty působením Lewisových kyselin. Je tedy možné, že adamantan vznikl isomerizací vhodných prekurzorů biologického původu za přispění například silikátových hornin. Takto se však nepodařilo prokázat vznik adamantanu s delším postranním řetězcem než dvouuhlíkovým. Aby však mohly vznikat vyšší polymantany, jejichž přítomnost je prokázána v kondenzátu získaném při jímání zemního plynu v některých amerických nalezištích, je předpokládán nutným mezistupněm adamantanový skelet substituovaný alespoň C4-zbytkem.

b) Takové látky byly nalezeny v reakční směsi poté, co byly běžné lipidy podrobeny střídavě oxidaci a polymerizaci. Jelikož jsou lipidy velmi rozšířenou složkou živých organismů, je možné, že některé deriváty adamantanu

vznikly právě touto cestou za přítomnosti kyslíku a slunečního světla a teprve potom došlo k procesům, kterými vznikla dnešní ropa. Což ovšem nevylučuje participaci i první možnosti.

c) Zatím poslední možnost zvažuje přítomnost derivátů adamantanu již v organickém materiálu, přičemž se během dlouhého geotermálního procesu vzniku ropy zkrátily postranní řetězce. Protože však pro naše experimenty nemáme k dispozici obdobnou časovou škálu jako příroda, zůstává jednoznačná a definitivní odpověď nedosažitelná.

#### LITERATURA

- Landa S., Macháček V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 5, 1 (1933).
- Landa S., Hála S.: *Chem. Listy* 51, 2325 (1957).
- Wingert W. S.: *Fuel* 71, 37 (1992).
- Hála S., Landa S.: *Angew. Chem.* 78, 1060 (1966).
- Lin R., Wilk Z. A.: *Fuel* 74, 1512 (1995).
- Balaban A. T., Schleyer P. R.: *Tetrahedron* 34, 3599 (1978).
- Landa S., Kamýček Z., Kamýčková J.: *Erdoel Kohle* 14, 904 (1961).
- Burns W., McKervey M. A., Mitchell T. R. B., Rooney J. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 100, 906 (1978).
- Uskov S. I., Rokosov Yu. V., Pokrovskii L. M.: *Petroleum Chem.* 40, 244 (2000).
- Gordadze G. N., Aref'ev O. A.: *Něftěchimija* 37, 387 (1997).
- Meerwein H.: *J. Prakt. Chem.* 104, 179 (1922).
- Bötger O.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 70, 314 (1937).
- Prelog V., Seiwert R.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 74, 1644 (1941).
- Stetter H., Bander O. E., Neumann W.: *Chem. Ber.* 89, 1922 (1956).
- Stetter H., Mayer J.: *Angew. Chem.* 71, 430 (1959).
- Janků J., Landa S.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 35, 375 (1970).
- Stepanov F. N., Suchoverkov W. D., Baklan V. F., Jurčenko A. G.: *Zh. Org. Khim.* 6, 884 (1970).
- Stetter H., Gaertner J.: *Chem. Ber.* 99, 925 (1966).
- Krasintskii P. A., Fokin A. A., Yurchenko A. G.: *Zh. Org. Khim.* 21, 2522 (1985).
- Schleyer P. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3292 (1957).
- Koch H., Franken J.: *Brennstoff-Chem.* 42, 90 (1961); *Chem. Abstr.* 55, 059 (1961).
- Ludwig R. E.: *U.S. 2*, 937, 211; *Chem. Abstr.* 54, 540 (1960).
- Navrátilová M., Sporka K.: *Appl. Catal., A* 2000, 127.
- Kosaku H., Michio S., Nobuaki S., Konomu K.: *Chem. Lett.* 1986, 315.
- Amir-Ebrahimi V., Rooney J. J.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1988, 260.
- Olah G. A., Wu A., Farooq O., Prakash G. K. S.: *J. Org. Chem.* 54, 1450 (1989).
- Nomura M., Schleyer P. R., Arz A. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3657 (1967).
- Morita H., Yoshida N., Kobayashi J.: *J. Org. Chem.* 64, 7208 (1999).
- Henry G. E., Jacobs H., Carrington C. M. S., McLean S., Reynolds W. F.: *Tetrahedron Lett.* 1996, 8663.
- Hu L., Sim K.: *Org. Lett.* 1, 879 (1999).
- Hu L., Sim K.: *Tetrahedron* 56, 1379 (2000).
- Henry G. E., Jacobs H., Carrington C. M. S., McLean S., Reynolds W. F.: *Tetrahedron* 55, 1581 (1999).

**R. Vícha and M. Potáček** (*Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*):  
**Where Adamantane Grows**

Adamantane was discovered 70 years ago in the crude oil from Hodonín (Czech Republic). Later on, a number of hydrocarbons with adamantane skeleton, from simple alkyl derivatives to polymantanes, were identified in crude oil. In animated nature, adamantane derivatives were found in some plants of the Guttiferae family. Adamantane is accessible by classic synthetic procedures and/or acid-catalyzed rearrangements of appropriate precursors. Possible ways of formation of adamantane and its derivatives in crude oil are compiled.



## UNIKÁTNE LIPIDY A ŠTRUKTÚRY MEMBRÁN ARCHAEBAKTÉRIÍ

EUBOMÍRA ČUBOŇOVÁ a PETER ŠMIGÁŇ

*Ústav biochémie a genetiky živoãíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika*

Lubomira.Cubonova@savba.sk

Došlo 24.7.02, prepracované 26.9.03, prijaté 30.9.03.

Kľúčové slová: Archaea, membránové lipidy, membránové proteíny, štruktúra membrán, archaeozómy

### Obsah

1. Úvod
2. Chemické zloženie membrán
  - 2.1. Membránové lipidy
    - 2.1.1. Polárne membránové lipidy
    - 2.1.2. Neutrálne lipidické komponenty membrán
  - 2.2. Membránové proteíny
3. Molekulová organizácia archaeobakteriálnych biomembrán
4. Vplyv zloženia membrán na ich funkciu
5. Archaeozómy
6. Záver

### 1. Úvod

Biologické membrány sú predmetom veľkého záujmu bádateľov, nakoľko sú s nimi úzko späté mnohé, životne dôležité procesy, ako je transport látok, transformácia energie, regulácia metabolizmu, koordinácia biologických procesov či bunková diferenciácia.

Počas evolúcie sa každý živý systém vyvíjal a prispôboval zmenám a existencii v novom prostredí. Aj v prípade bunkových membrán dochádzalo počas tohto procesu nielen k veľkým štruktúrnym zmenám, ale i významným zmenám ich funkcie.

Viditeľné znaky prispôsobenia sa organizmu nehostinným a často extrémnym podmienkam prostredia možno teraz pozorovať u organizmov, ktoré patrili k jedným z prvých obyvateľov Zeme, u Archaea (archaeobaktérie). Extrémne teploty a hodnoty pH, vysoká koncentrácia solí či striktná anaerobióza boli nesporne dôvodom toho, že tieto najstaršie prežívajúce organizmy sú vybavené nezvyčajnými komponentami a jedinečnými biologickými procesmi. Na základe týchto špecifických vlastností, Woese a Fox v roku 1977 zaradili Archaea k tretej, samostatnej ríši, odlišnej od Baktérií a Eukaryotov<sup>1</sup>. Prevažnú väčšinu Archaea

tvoria predstavitelia troch základných fenotypických skupín: halofily, metanogénne baktérie a termoacidofily. Ich významným spoločným menovateľom je, že sa nachádzajú v extrémnych ekologických podmienkach<sup>2</sup>.

Jedným z najdôležitejších biochemických rysov Archaea je okrem iného, aj unikátne lipidické zloženie a z toho odvodená špecifická štruktúra membrány, čo tiež slúži ako prioritný taxonomický znak tejto skupiny mikroorganizmov.

Štúdium archaeobakteriálnych membrán otvára nové, fascinujúce a doposiaľ nevyriešené problémy membranológie. Je možné predpokladať, že zavedenie metód molekulyvej biológie, ktoré zatiaľ v Archaea nie sú uspokojivo aplikovateľné, prinesie mnohé významné objavy z teoretického, ale i praktického hľadiska.

### 2. Chemické zloženie membrán

Základnými zložkami všetkých bunkových membrán sú molekuly bielkovín a lipidov. Mnohé membrány obsahujú menšie množstvo sacharidov vo forme glykoproteínov a glykolipidov a určitý podiel sterolov a iných zložiek lipidických vlastností<sup>3</sup>.

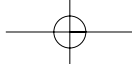
Archaeobakteriálne membrány sa výrazne odlišujú od membrán baktérií aj eukaryotov, a to nielen zložením a fyzikálno-chemickými vlastnosťami jednotlivých zložiek, ale aj ich vzájomným usporiadaním. Jedinečné membránové lipidy prispievajú Archaea k možnosti existovať v extrémnych podmienkach.

#### 2.1. Membránové lipidy

Podstatnú časť lipidov, nachádzajúcich sa v biomembránach eukaryotov, tvoria fosfoglyceridy, sfingofosfolipidy (klasifikované ako fosfolipidy) a cholesterol. U fosfoglyceridov je hydrofóbná časť tvorená masnými kyselinami s rôznou dĺžkou reťazca a stupňom nasýtenia, naviazanými esterovou väzbou na glycerol. U sfingofosfolipidov je glycerol nahradený sfingozínom. Rôzne membrány sa líšia zastúpením jednotlivých amfifilných lipidov, ako aj ich pomerom k lipidom neutrálnym<sup>3-5</sup>.

Základné rozdiely medzi lipidickým zložením membrán u baktérií, eukaryotov a u Archaea možno zhrnúť nasledovne:

1. Rozdielny charakter uhľovodíkových reťazcov. Kým baktérie a eukaryoty obsahujú masné kyseliny s rôznym stupňom nasýtenia, u Archaea nachádzame silne metylované izoprenoidné reťazce.
2. Rozdielny charakter väzby medzi glycerolom a masnými kyselinami resp. izoprenoidnými reťazcami. U baktérií a eukaryotov sa jedná o esterovú väzbu (-CH<sub>2</sub>-OCOR), u Archaea o éterovú väzbu (-CH<sub>2</sub>OR). Výnimku tvoria plazmalogény u eukaryotov, kde sa tiež vyskytuje éterová väzba.



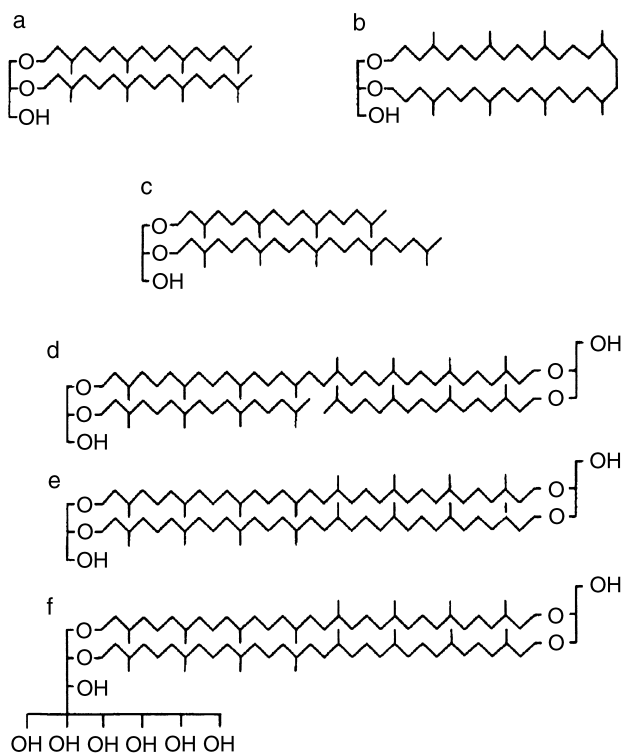
3. Ďalšou zvláštnosťou u Archaea je to, že izoprenoidy sú vo fosfolipidoch membrán viazané v pozíciách *sn*-2,3 na fosfoglycerolovú kostru, zatiaľ čo u baktérií a eukaryotov sú masné kyseliny viazané na fosfoglycerolovú kostru fosfolipidov v pozíciách *sn*-1,2.
4. Z hľadiska štruktúry membrány je pozoruhodné, že u Archaea sa zistila prítomnosť tetraéterových lipidov typu 2,2',3,3'-tetra-*O*-bisfytandiyl-*sn*-diglycerol. Podrobnosti budú uvedené ďalej<sup>3,6</sup>.

Prítomnosť éterových lipidov v membránach extrémnych halofilov bola objavená v roku 1978 (Kates a spol. identifikovali glycerol-diéterové lipidy u *Halobacterium cutirubrum*)<sup>7</sup>. Neskôr sa ukázalo, že unikátnosť archaeobakteriálnych lipidov je jedným z faktorov, ktoré umožňujú zaradenie týchto organizmov do samostatnej ríše. Analýza polárnych lipidov sa stala bežne používanou metódou pri klasifikácii a druhovom zatriedení nových izolátov archaeobaktérií<sup>8</sup>.

80–95 % membránových lipidov archaeobaktérií tvoria polárne éterové lipidy a 5 – 20 % neutrálne skvalény (C<sub>30</sub>) a iné izoprenoidy<sup>9</sup>.

### 2.1.1. Polárne membránové lipidy

Polárne archaeobakteriálne lipidy pozostávajú z glycerol-éterovej časti, na ktorú sú naviazané polárne „hlavičky“.



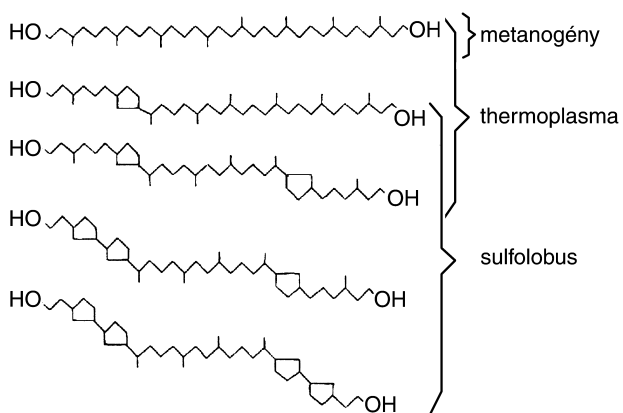
Obr. 1. Membránové lipidy archaeobaktérií. a) fytanyl-diéter, b) bifytanyl-diéter (makrocyclický), c) fytanyl/sesterterpanyl-diéter, d) bifytanyl/fytanyl/fytanyl/diglycerol-tetraéter, e) bisfytandiyl/diglycerol-tetraéter, f) bisfytandiyl/nonitolglycerol-tetraéter<sup>11</sup>

Tieto sú tvorené organickými fosfátovými esterami alebo sacharidovými zvyškami, podobné baktériám a eukaryotom.

Na základe éterových „chvostíkov“ rozoznávame u archaeobaktérií tzv. archaeolové a caldarchaeolové lipidy (ďalej diéterové a tetraéterové lipidy)<sup>6</sup>.

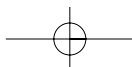
Diéterové lipidy predstavujú C<sub>20,20</sub>-diétery (ide o 2,3-di-*O*-difytanyl-*sn*-glycerol, označované tiež D<sub>S</sub>), v ktorých sú dva uhľovodíkové reťazce éterovou väzbou viazané na glycerol v polohe *sn*-2,3<sup>10,11</sup> (obr. 1a). Extrémne halofily obsahujú okrem C<sub>20,20</sub>-diéterov aj variabilné množstvá C<sub>20,25</sub>-diéterov (obr. 1c) a C<sub>25,25</sub>-diéterov<sup>11</sup>. V membránach metanogénov *Methanococcus jannaschii* sa dokázala makrocyclická forma diéterových lipidov<sup>11</sup> (obr. 1b). Charakteristickou črtou niektorých metanogénov je i výskyt hydroxylovaných diéterov, v ktorých je na 3 uhlíku *sn*-2 alebo *sn*-3 alkylového reťazca naviazaná OH skupina<sup>10</sup>.

Tetraéterové lipidy predstavujú C<sub>40,40</sub>-tetraétery (2,2',3,3'-tetra-*O*-bisfytandiyl-*sn*-diglycerol, označované T<sub>S</sub>). Je to jedinečná forma lipidov, ktorej existencia bola dokázaná len u archaeobaktérií. Tetraéterové lipidy sú diméry, ktoré vznikajú kondenzáciou dvoch diéterových lipidov a väčšinou obsahujú dve oproti sebe stojace molekuly glycerolu spojené 40-uhlíkovými bisfytandiylovými reťazcami (obr. 1e). Vo všeobecnosti ich možno nájsť u termoacidofilov, extrémnych termofilov a metanogénov. Doposiaľ ne-



Obr. 2. Štruktúra bifytanylových reťazcov tetraéterových lipidov a ich distribúcia v rámci Archaea. Termofilné archaeobaktérie rodov Sulfolobus a Thermoplasma môžu v reťazci obsahovať 1 až 4 cyklopentánové kruhy<sup>2</sup>

boli dokázané u extrémnych halofilov. U niektorých Archaea sa v malých množstvách vyskytujú aj tetraétery, ktoré obsahujú jeden C<sub>40</sub> fytanylový reťazec a dva C<sub>20</sub> fytanylové reťazce, u ktorých nedošlo ku kondenzácii a nevytvorili druhý C<sub>40</sub> reťazec<sup>11</sup> (obr. 1d). Špecifikom termoacidofilov rodu Sulfolobus je výskyt nonitolglycerol-tetraéterov s 9-uhlíkovým alkoholom nonitolom, ktorý nahrádza jednu molekulu glycerolu v štruktúre tetraéteru<sup>11</sup> (obr. 1f). Typickou vlastnosťou termofilov je prítomnosť 1 až 4 cyklopentánových kruhov v bifytanylových reťazcoch<sup>2</sup> (obr. 2).



### 2.1.2. Neutrálne lipidické komponenty membrán

Ďalšie významné zložky membrán predstavujú neutrálne lipidy, ktoré sú u eukaryotov reprezentované hlavne sterolmi.

Keďže membrány prokaryotických buniek neobsahujú steroly, predpokladá sa, že u prokaryotov sa v dôsledku neprítomnosti kyslíka v atmosfére, evolúcia sterolov zastavila na úrovni skvalénu. Prokaryotické bunky si však aj za anaeróbných podmienok dokázali zo skvalénu nasyntetizovať štruktúrne a funkčné ekvivalenty sterolov, tzv. hopanoidy. Hopanoidy sú, podobne ako steroly, päťcyklické uhľovodíky s rôznym počtom nasubstituovaných OH skupín. Dokázalo sa, že sa vo zvýšenej miere vyskytujú najmä u acidofilov a v membránach tvoriacich veľký protónový elektrochemický gradient<sup>3</sup>.

Neutrálne lipidy Archaea sú zastúpené najmä C<sub>30</sub> izoprenoidmi (skvalénmi), ale aj inými izoprenoidnými uhľovodíkmi. Archaeobakteriálne neutrálne lipidy, ale aj fytyanové reťazce ich polárnych lipidov, majú v podstate rovnaký izoprénový štruktúrny základ, ako eukaryotické steroly či prokaryotické hopanoidy. Predpokladá sa, že tieto látky majú v membránach Archaea podobnú funkciu, ako steroly v membránach eukaryotov a hopanoidy v membránach prokaryotov<sup>11,12</sup>.

### 2.2. Membránové proteíny

Membránové proteíny majú okrem štruktúrnej, aj mnohé špecifické enzymatické funkcie v transporte látok cez membránu, ale i vo vnútri bunky, v prenose informácie prostredníctvom receptorov a iné. Zdá sa pravdepodobné, že variabilita membrány archaeobaktérií v zložení lipidov zodpovedá aj variabilita v zložení proteínov. V tejto súvislosti sú zaujímavé najmä proteíny, ktoré sa podieľajú na transporte látok cez membrány.

Napriek odlišnej štruktúre lipidov v membránach Archaea, membránové transportné kanály sú veľmi podobné bakteriálnym a eukaryotickým. Sú tvorené polypeptidovým reťazcom, ktorý je v membráne ukotvený pomocou jedného alebo viacerých transmembránových úsekov so štruktúrou  $\alpha$ -helixu<sup>13</sup>.

Vzhľadom na fylogenetické postavenie archaeobaktérií je zaujímavá i komplexita elektrón-transportného systému. Predpokladalo sa totižto, že archaeobakteriálne cytochrómy a respiračné enzýmy by mali mať oveľa jednoduchšiu štruktúru, ako ich bakteriálne či eukaryotické ekvivalenty. Ukázalo sa však, že u viacerých Archaea dochádza ku vzniku neobvyklých asociácií medzi cytochrómami a inými respiračnými proteínmi za vzniku tzv. superkomplexov<sup>14-16</sup>.

Vplyvom extrémnych životných podmienok sa počas evolúcie vytvorili už u Archaea viaceré adaptačné mechanizmy, ktoré zahŕňajú i zmeny v charaktere membránových proteínov. Ide hlavne o ovplyvnenie celkového náboja proteínu, zmeny v charaktere väzieb v rámci proteínu ako i interakcií proteínu s inými molekulami, či zmeny v procese samotného skladania proteínu<sup>17</sup>.

Doposiaľ nie je úplne objasnený spôsob, akým dokážu niektoré extremofilné Archaea predchádzať degradácii aminokyselín, nakoľko mnohé z týchto aminokyselín majú za extrémnych teplôt polčas života kratší, ako je generačná doba termofilu. Existuje viacero možností; môže ísť napr. o modifikácie aminokyselín, ktoré bránia ich degradácii (deaminácia,  $\beta$  eliminácia, oxidácia, hydrolýza a iné), ďalej o využívanie špecifických ochranných látok, alebo dochádza vo zvýšenej miere k samotnej syntéze aminokyselín<sup>17</sup>.

Membránové proteíny Archaea sú v súčasnosti predmetom záujmu mnohých pracovných skupín. Ich snahou je identifikovať spôsob, akým si z nášho pohľadu aj za extrémnych podmienok, archaeobakteriálne proteíny dokážu udržiavať svoju stabilitu. Výsledky doterajších experimentov priniesli niekoľko možných mechanizmov tohto prispôsobenia sa. Analýzou proteínov niektorých termofilov sa zistilo, že majú znížený obsah glycínu a znížený pomer povrchu proteínu k jeho objemu. Dokázalo sa, že k zvýšeniu stability proteínov u termofilov môže prispieť zväčšenie množstva slabých interakcií (vodíkových mostíkov, iónových a hydrofóbných väzieb) v rámci proteínu, obzvlášť ale vytváranie iónových párov<sup>18,19</sup>. Mnohé proteíny extrémnych halofilov obsahujú väčší podiel kyslých aminokyselín a menšie množstvo zásaditých aminokyselín<sup>18</sup>.

Záujem o tieto skupiny proteínov je jasný, pretože poznanie ich zloženia a štruktúry môže mať významné biotechnologické aplikácie. Súčasný trend v spoznávaní kompletných genómových sekvencií a ich funkčná analýza u Archaea vytvárajú dobré predpoklady na to, aby sa v rámci komparatívnej genómiky a proteomiky dali rozpoznať princípy vedúce k rozdielom medzi membránovými proteínmi Archaea, baktérií a eukaryotov. Treba podotknúť, že v súčasnosti sú naše znalosti archaeobakteriálnych membránových proteínov len obmedzené.

### 3. Molekulová organizácia archaeobakteriálnych biomembrán

Všetky doposiaľ študované membrány z eukaryotických alebo z prokaryotických buniek majú v podstate podobné zloženie, a sú aj veľmi podobné v štruktúrnej organizácii.

Bunkové membrány sú supramolekulárne štruktúry, ktorých základnou zložkou je fosfolipidová dvojvrstva. Dvojvrstva má vnútornú a vonkajšiu stranu, a molekuly lipidov sú v nej orientované tak, že hydrofóbné reťazce smerujú do stredu a polárne skupiny na povrch dvojvrstvy. Časť povrchu pokrývajú periférne proteíny, ktoré sa dajú z membrány relatívne ľahko uvoľniť. Integrované proteíny môžu byť ponorené vo fosfolipidovej dvojvrstve rozlične hlboko<sup>3</sup>.

Jednotlivé štruktúrne elementy biologickej membrány sú spolu viazané hydrofóbnymi a elektrickými interakciami ako aj van der Waalsovými silami. Navzájom spolu geometricky a termodynamicky interagujú<sup>2</sup>. Elektrostatickými silami sa môžu spolu viazať polárne skupiny fosfolipidov s polárnymi skupinami bielkovín, ale rozhodujúcou silou, ktorá drží membránové kontinuum pospolu, je práve hydro-

fõbna vãzba, ktorã sa vytvãra medzi uhlovodíkovými reťazcami membrãnových lipidov a transmembrãnovými úsekmi membrãnových proteínov<sup>20</sup>.

Z tohto hľadiska bolo prekvapujúce zistenie, že membrãny Archaea sa chemicky zásadne odlišujú od membrãny prokaryotov a eukaryotov.

Archaea dokãzali prispõsobiť zloženiu, ale i štruktúru membrãny podmienkam vonkãjšieho prostredia. Účelom bolo udržanie membrãnovej fluidity, ktorej kvapalno-kryštalický stav závisí od teploty, charakteru alkãnových reťazcov, pH či prítomnosti divalentných iónov<sup>21</sup>.

Jedinečné zloženie a štruktúra lipidov v membrãnach Archaea zabezpečuje jej optimãlnu funkčnosť.

Diéterové lipidy archaeobaktérií sú schopné vytvãrať „klasickú“ lipidickú dvojvrstvu vďaka interakciãm oproti sebe orientovaných fytylyových reťazcov.

Dĺžka fytylyového reťazca je zhodná s dĺžkou reťazca mastných kyselín u „klasických“ lipidov baktérií a eukaryotov, a tak i celková hrúbka dvojvrstvy je podobná<sup>10,22</sup>.

Zvlãštnosťou Archaea je vãak membrãna zloženã z tetraéterových lipidov, prípadne zo zmesi diéterových a tetraéterových lipidov. Lipid zložený z diglyceroltetraéteru má dve polãrne skupiny a aj svojou dĺžkou splňa predpoklady na to, aby prestúpil archaeobaktériãlnu membrãnu po celej jej hrúbke, a tak dokãzal nahradiť obe polovice „klasickej“ lipidickej dvojvrstvy. Tento zaujímavý fakt bol základom fyzikãlno-chemických experimentov, ktoré potvrdili, že v prítomnosti tetraéterov mõže archaeobaktériãlna membrãna existovať vo forme „monovrstvy“. Monovrstva je tvorenã tetraéterom, ktorého dve polãrne skupiny nachãdzajúce sa oproti sebe, vytvãrajú dve opačné strany membrãny<sup>10,22</sup>. U metanogénov a termoacidofilov, u ktorých sú membrãnové lipidy tvorené zmesou diéterov a tetraéterov, sa mõže aj membrãna nachãzãť vo forme zmesi monovrstvy a dvojvrstvy<sup>10</sup>.

#### 4. Vplyv zloženã membrãn na ich funkciu

Alkylovã éterovã štruktúra dodãva stabilitu lipidom v prostredí s extrémnymi hodnotami pH. Netypická konfigurãcia zvyšuje rezistenciu lipidov voči fosfolipãzam<sup>23</sup>. Tetraéterové lipidy svojim usporiadaním v membrãne ovplyvňujú pohyb menších susediacich molekúl a pôsobia i na celkovú vertikãlnu stabilitu dvojvrstvy<sup>24</sup>.

Optimãlnou rastovou teplotou značného množstva Archaea organizmov je teplota vãčšia ako 45 °C. Predpokladã sa, že kvapalno-kryštalický stav membrãny v prostredí s vysokými teplotami pomãhãjú udržiavať aj rozvetvené izoprenoidné reťazce diéterových a tetraéterových lipidov. Rast v prostredí s vysokými teplotami vyžaduje nielen tepelnú stabilitu enzýmov a iných makromolekúl, ale aj určité obmedzenia v membrãnovej permeabilite. Pri vysokých teplotãch sa vo všeobecnosti zvyšuje rýchlosť chemických reakcií. To sa týka aj pohybu iónov cez membrãny. Ak spriahajúci (coupling) ión (protón alebo sodný ión) nešpecificky difunduje príliš rýchlo, organizmus si nie je schopný vytvãriť adekvãtný elektrochemický gradient tohto iónu cez

membrãnu, ktorý je dõležitý z bioenergetického hľadiska. V membrãnach, zložených z tetraéterových lipidov, je protónovã permeabilita limitovãná, čo umõžňuje termofilným Archaea udržiavať stabilnú protónmotívnu silu<sup>25,26</sup>.

Za účelom vytvãrania optimãlneho elektrochemického potenciãlu protónov cez membrãny sú mnohé baktérie a vãčšina Archaea schopné meniť a prispõsobovať lipidické zloženie svojej membrãny. Tento jav sa nazýva „homeoprotónovã permeabilnã adaptãcia“<sup>25,26</sup>.

U metanogénov mõže byť výskyt archaeobaktériãlných lipidov výhodou v prostredí s vysokými koncentraciãmi metãnu, ktorý má na klasickú bunkovã membrãnu nepriãznivý rozpúšťãci vplyv<sup>23</sup>.

#### 5. Archaeozõmy

Lipozõmy sú umelã sfãrickã uzatvorenã vezikuly, ktoré sú tvorenã jednou alebo viacerými fosfolipidovými dvojvrstvami a je v nich zachovãná bariãrovã schopnosť membrãny.

V súčasnosti sa lipozõmy využívãjú nielen ako umelã membrãnovã modely pri získãvaní nových poznãtkov o transporte látok, transportných mechanizmoch a funkciãch zabudovaných proteínov, ale nachãdzajú stále vãčšie využitie aj v medicíne a farmãcii. Pri pokusoch o ich aplikãciu v živých systãmoch vãak často nie sú schopné odolãvať vysokej teplote pri sterilizãcii, kyslým hodnotãm pH v žalúdku, či koncentracii solí v močovom mechúre, ktoré spôsobujú napríklad zvýšenã agregãciu vezikúl, hydrolyzu fosfolipidov alebo nežiãduce uvoľnenie prenášãnej látky<sup>27-29</sup>.

Niektorã „nedostatky“ klasických lipozõmov úspešne pomãha riešiť využívanie archaeobaktériãlných lipidov a tzv. archaeozõmov.

Sú to lipozõmy pozostãvajúce vylúčne z archaeobaktériãlných lipidov, alebo sa tieto nachãdzajú v zmesi s inými esterovými lipidmi. Doterãjšie experimenty preukãzali, že archaeozõmy tvorenã polãrnymi archaeobaktériãlnymi lipidmi sú relatívne stabilnejšie ako klasické lipozõmy. Ide najmä o stabilitu voči zmenãm pH, vysokej teplote, zvýšenej koncentracii žlčových solí, účinku fosfolipãz, sú stabilnejšie i po dlhšom skladovaní na vzduchu. Stupeň stability závisí od zdroja polãrných lipidov<sup>10,27,30</sup>.

Archaeozõmy, priprãvenã z vybraných archaeobaktériãlných lipidov, i po tepelnej sterilizãcii v autoklãve nepodliehãjú fúziã či agregãcii jednotlivých vezikúl, ktorã je v tomto prípade problémom klasických lipozõmov. Takto si archaeozõmy aj pri vysokej teplote dokãžu udržãť zabudovanã prenášãnanã látku. Zvýšenã záujem o archaeozõmy podnietila aj ich schopnosť interagovať s fagocytujúcimi bunkami niekoľko násobne intenzívnejšie ako konvenčné lipozõmy, čím sa otvorili nové možnosti použitia ich adjuvantnej schopnosti pri príprãve vakcín<sup>30,31</sup>.

Predpokladã sa, že archaeozõmy, podobne ako lipozõmy, pomõžu v budúcnosti vyriešiť eãte mnoho nezodpovedaných otãzok spojených s existenciou samotných archaeobaktérií. Nesporne nãjdu využitie aj ako proteolipozõmy pri štúdiu transportu látok cez archaeobaktériãlne membrãny a spôsobu zabudovania a funkcie membrãnových proteínov.

## 6. Záver

Cieľom tejto práce bolo ukázať, čím sa Archaea výrazne odlišujú od ostatných organizmov, z hľadiska membrán. Archaeobaktérie sú však charakteristické nielen unikátnym zložením bunkových membrán a povrchových obalov, ale zároveň obsahujú radu enzýmov a biochemických komponentov nezvyčajných vlastností. V ich bunkách prebiehajú jedinečné metabolické procesy a navyše majú rozdielny genetický a proteosyntetický aparát.

S existenciou Archaea sa doposiaľ spája množstvo nezodpovedaných otázok. Dôvodom je i to, že ich izolácia a kultivácia prináša aj v súčasnosti mnohé experimentálne ťažkosti. Spoznávanie pozoruhodných vlastností týchto organizmov má však obrovský význam. Štúdium biochemickej, genetickej a molekulárno-biologickej podstaty Archaea môže nielen pomôcť porozumieť procesu bunkovej evolúcie, ale nadobudne určite význam i pri ich ďalšej biotechnologickej aplikácii.

*Autori práce ďakujú za finančnú podporu VEGA finančným grantom 2/7134/20. Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky prostredníctvom finančnej podpory č. APVT -51-016502.*

## LITERATÚRA

1. Woese C. R., Fox G. E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5088 (1977).
2. Langworthy T. A., Tornabene T. G., Holzer G.: Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3, 228 (1982).
3. Ferencík M., Škárka B., Novák M., Turecký L.: *Biochémia*. Slovak Academic Press, Bratislava 2000.
4. Šubík J.: Chem. Listy 65, 180 (1971).
5. Hayes J. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 14033 (2000).
6. Koga Y., Nishihara M., Morii H., Akagawa-Matsushita M.: Microbiol. Rev. 57, 164 (1993).
7. Kates M.: Prog. Chem. Fats Lipids 15, 301 (1987).
8. Ross H. N. M., Grant W. D., Harris J. E., v knihe: *Chemical Methods in Bacterial Systematics* (Goodfellow M., Minnikin D. E., ed.), str. 289. Academic Press, New York 1985.
9. Sprott G. D.: J. Bioenerg. Biomembr. 24, 555 (1992).
10. Patel B. P., Sprott G. D.: *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers, London 2001.
11. Langworthy T. A., Pond J. L.: Syst. Appl. Microbiol. 7, 253 (1986).
12. Haines T. H.: Prog. Lipid Res. 40, 299 (2001).
13. Saier M. H., Jr.: J. Membr. Biol. 175, 165 (2000).
14. Schäfer G., Engelhard M., Müller V.: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 570 (1999).
15. Schäfer G., Purschke W., Schmidt Ch. L.: FEMS Microbiol. Rev. 18, 173 (1996).
16. Schütz M., Brugna M., Baymann E. L. F., Huber R., Stetter K. O., Toci G. H. R., Lemesle-Maunier D., Schmidt P. T. Ch., Nitschke W.: J. Mol. Biol. 300, 663 (2000).
17. Jaenicke R., Böhm G.: Curr. Opin. Struct. Biol. 8, 738 (1998).
18. Madigan M. T., Oren A.: Curr. Opin. Microbiol. 2, 265 (1999).
19. Jaenicke R.: FEMS Microbiol. Rev. 18, 215 (1996).
20. Yeagle P. L.: *Horizons in Membrane Biotechnology*. Wiley-Liss, New York 1990.
21. Driessen A. J. M., Van de Vossenberg J. L. C. M., Konings W. N.: FEMS Microbiol. Rev. 18, 139 (1996).
22. Bullock C.: Biochem. Mol. Biol. Educ. 28, 186 (2000).
23. Kates M.: Biochem. Soc. Symp. 58, 51 (1992).
24. Beveridge T. J., Choquet C. G., Patel G. B., Sprott G. D.: J. Bacteriol. 175, 1191 (1993).
25. Van de Vossenberg J. L. C. M., Driessen A. J. M., Konings W. N.: Extremophiles 2, 163 (1998).
26. Albers S. V., Van de Vossenberg J. L. C. M., Driessen A. J. M., Konings W. N.: Front. Biosci. 5, 796 (2000).
27. Choquet Ch. G., Patel G. B., Sprott G. D.: Can. J. Microbiol. 42, 183 (1995).
28. Szoka F., Jr.: Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 467 (1980).
29. Yamauchi K., Doi K., Kinoshita M.: Biochim. Biophys. Acta 1283, 163 (1996).
30. Patel G. B., Sprott G. D.: Crit. Rev. Biotechnol. 19, 317 (1999).
31. Sprott G. D., Brisson J. R., Dicaire Ch. J., Pelletier A. K., Deschatelets L. A., Krishnan L., Patel G. B.: Biochim. Biophys. Acta 1440, 275 (1999).

**E. Čuboňová and P. Šmigáň** (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Unique Lipids and Structures of Membranes in Archaeobacteria**

The most striking chemical differences between Archaea membrane lipids and lipids of living organisms are as follows. The former contain (1) 2,3-di-*O*-difityanyl-*sn*-glycerol instead of 1,2-diacyl-*sn*-glycerol, (2) ether bonds instead of ester bonds, (3) isoprenoid chains instead of fatty acids, (4) branched isoprenoids. The structure of Archaea membranes is also unique. Lipid vesicles prepared from archaeal lipids (archaeosomes) are more stable than liposomes and are useful for medical and biotechnological applications.

## POSTUPY IZOLACE POLYAROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ A POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ PŘI JEJICH STANOVENÍ

JANA MIKOŠKOVÁ<sup>a</sup>, LUBOMÍR ČÁP<sup>b</sup> a KAREL  
LEMR<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoř MORAVA, s. r. o., Butovická 828, 742 13 Studénka, <sup>b</sup>Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc  
lemr@prfnw.upol.cz, lab.morava@mail.miramo.cz

Došlo 3.10.02, přepracováno 18.8.03, přijato 5.9.03.

Klíčová slova: polyaromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, izolace, prekoncentrace

### Obsah

1. Úvod
2. Odběr vzorků
3. Izolace analytů
  - 3.1. Kapalně vzorky
  - 3.2. Tuhé vzorky
4. Přečištění
5. Analytická koncovka
6. Závěr

### 1. Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) patří spolu s polychlorovanými bifenyly (PCB) mezi persistentní kontaminanty životního prostředí, tj. kontaminanty s vysokou stabilitou proti chemickým, fyzikálním a biologickým účinkům okolí, schopné dlouhodobě „přežívat“, cirkulovat a kumulovat se v ekosystému.

PAU jsou sloučeniny se dvěma nebo více kondenzovanými benzenovými kruhy. Mají rozmanité rizikové vlastnosti. Mnohé z nich jsou potenciálními karcinogeny a mutageny a mnohé mají toxické vlastnosti. PAU vykazují silnou absorpci v UV oblasti a mají také charakteristická fluorescenční spektra<sup>1</sup>. Díky nepolárnímu charakteru a relativně vysoké molekulové hmotnosti je rozpustnost PAU ve vodě velice nízká<sup>2</sup>. PAU mají proto tendenci se sorbovat na pevných částicích a kontaktních plochách<sup>3</sup>. Do prostředí se mohou dostávat jak z přírodních (požáry, vulkanická činnost, rozklad biologického materiálu, biosyntéza mikroorganismy a rostlinami<sup>4</sup>), tak antropogenních zdrojů<sup>1,6</sup> (spalovací děje, zejména nedokonalé spalování organického materiálu<sup>1,5</sup>). Bylo identifikováno více než 100 těchto látek, převážně se však analyzují tzv. prioritní polutanty dle americké EPA (Environmental Protection Agency), z jejichž koncentrací se odhaduje míra a charakter kontaminace – jde o naftalen, acenaften

(1,2-dihydroacenaften), acenaften, fluoren, fenanthren, anthracen, fluoranthren, pyren, benzo[*a*]anthracen, chrysen, benzo[*b*]fluoranthren, benzo[*k*]fluoranthren, benzo[*a*]pyren, dibenzo[*ah*]anthracen, benzo[*ghi*]perylene a indeno[1,2,3-*cd*]pyren<sup>7</sup>.

Polychlorované bifenyly (PCB), někdy též nesprávně nazývané polychlorované difenyly (PCD)<sup>8</sup>, jsou skupinou chemických látek, jejichž základem je bifenyl substituovaný 1–10 atomy chloru<sup>7</sup>. Existuje celkem 209 kongenerů PCB (kongener je člen určité skupiny chemických látek, v tomto případě skupiny polychlorovaných bifenyly)<sup>9,10</sup>. Pouze 20 kongenerů má koplanární konformaci (postrádají kompletní substituci v ortho polohách). Nejvyšší toxicitu vykazují tři z nich (PCB 77, PCB 126 a PCB 169, cit.<sup>10</sup>). PCB patří mezi xenobiotika, tj. látky, které do přírody vnesl svou činností člověk a které se v ní předtím nevyskytovaly<sup>11</sup>. Nejznámější komerční směsi jsou Aroclor (USA), Clophen (Německo), Kanechlor (Japonsko) a u nás Delor. PCB byly dlouhodobě používány jako dielektrikum, v hydraulických tekutinách, nátěrových hmotách a v papírenském průmyslu. Jde o látky hydrofobní, persistentní a snadno rozpustné v organických rozpouštědlech, tucích a olejích<sup>9</sup>. Jejich spalováním při teplotách nižších než 1 200 °C vznikají mnohem toxičtější polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany<sup>8</sup>.

Analytický proces stanovení PAU resp. PCB ve vzorcích životního prostředí je tvořen několika stupni – odběr vzorku, izolace analytů, přečištění a vlastní stanovení analytů (analytická koncovka).

### 2. Odběr vzorků

Vzorky pro stanovení PAU jsou odebírány do předem propláchnutých (organickým rozpouštědlem, např. acetonitrilem<sup>12</sup>, acetonem a hexanem<sup>13</sup>) hnědých zbarvených skleněných vzorkovnic se skleněným nebo teflonovým uzávěrem. Uchovávají se v temnu při teplotě 4 °C (cit.<sup>12</sup>). Samara se spoluautory<sup>13</sup> uvedl jako maximální skladovací dobu 2–3 dny pro odpadní vody a 7–8 dní pro tuhé odpady a kaly. Lopéz García a spol.<sup>5</sup> uchovávali tuhé a kapalně vzorky maximálně 7 dní. Harrak a spol.<sup>14</sup> doporučili po odběru vzorku vody přidat do odběrové nádoby vhodné organické rozpouštědlo kvůli zamezení sorpce PAU na stěnách vzorkovnice. Experimentálně zjistil, že nejvhodnější je propan-2-ol (15 obj.%), ale lze použít též methanol<sup>15</sup> (20 obj.%) nebo acetonitril. García Pinto a spol.<sup>15</sup> použili ke stejnému účelu neionogenní tenzid Triton X-114 (5 obj.%).

Také při stanovení PCB je doporučeno používat skleněné vzorkovnice umyté horkým roztokem detergentu, opláchnuté pod tekoucí vodou, poté vodou destilovanou a nakonec acetonem a destilovaným hexanem<sup>8</sup>. Vodné vzorky se doporučuje<sup>16</sup> před extrakcí skladovat ve tmě při teplotě asi 4 °C. Extrahovány by tyto vzorky měly být co nejdříve po odběru (nejlépe do 24 hodin).

### 3. Izolace analytů

#### 3.1. Kapalné vzorky

Samara a spol.<sup>13</sup> při stanovení 16 prioritních PAU ve vodných vzorcích metodou HPLC s fluorescenční detekcí izolovali analyty extrakcí kapalina – kapalina (LLE – liquid-liquid extraction). 1000 ml odpadní vody s přísadkou vnitřního standardu (3,6-dimethylfenanthren) bylo extrahováno dvakrát 25 ml cyklohexanu. Spojené extrakty byly sušeny bezvodým síranem sodným. Po sušení byl extrakt zakonzentrován na rotační odparce (výsledný objem asi 0,5 ml). Následovalo přečištění na koloně s náplní silikagelu a analýza vzorku metodou HPLC.

Lopéz García a spol.<sup>5</sup> se zabývali sledováním PAU ve filtrátech z promývání uhlí. Rovněž použili k izolaci LLE. 100 ml filtrátu bylo extrahováno třikrát vždy 20 ml dichlormethanu. Spojené dichlormethanové extrakty byly sušeny bezvodým síranem sodným. Extrakt byl poté odpařen téměř do sucha ve vakuové rotační odparce. Zbytek byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu a 20  $\mu$ l tohoto vzorku bylo dávkováno na HPLC kolonu.

Při analýzách PAU, PCB a jiných látek zejména nepolárního charakteru v relativně čistých vodách se uplatňují mikroextrakce (nejčastěji hexanem)<sup>7</sup>. Při této metodě dochází oproti klasické extrakci kapalina – kapalina k výraznému snížení spotřeby organického rozpouštědla (jednotky mililitrů)<sup>9</sup>, zkrácení doby potřebné ke zpracování vzorku a minimalizuje se či odpadá potřeba následného čištění a zakonzentrování extraktu.

Geissler a spol.<sup>18</sup> využili k izolaci PCB a organochlorových pesticidů LLE dle metody DIN. 1 l vzorku vody s přísadkou 10 ml *n*-pentanu byl intenzivně míchán na magnetické míchačce po dobu 10 minut. Pomocí mikroseparatoru byla oddělena organická fáze a po přísadce 1 ml isooktanu (2,2,4-trimethylpentan) byl její objem zredukován na 0,5 ml.

V téže práci<sup>18</sup> autoři využili k izolaci PCB a organochlorových pesticidů také modifikaci metody LLE. Vzorek vody (1 l) s přísadkou extrakčního rozpouštědla (*n*-pentan) byl umístěn v rotačním perforátoru a extrahován po dobu 1 hodiny (extrakční činidlo je dispergováno do vodné fáze ve formě nepatrných kapiček, které jí prostupují). Po ukončení extrakce bylo rozpouštědlo s analyty převedeno do baňky a byly přidány 2 ml isooktanu (modifikátor). Objem roztoku byl zredukován v rotační vakuové odparce. Výhodou této metody je dosažení vysokých výtěžností. Praktický problém se však vyskytuje u analýz minerálních vod. Rozpuštěný CO<sub>2</sub> se sráží jako CaCO<sub>3</sub>, který může blokovat aparaturu.

Metoda LLE se využívá i při stanovení PCB a PAU podle českých norem<sup>16,19</sup>. Doporučená extrakční rozpouštědla jsou pro stanovení PCB hexan, petrolether, nebo heptan a pro stanovení PAU *n*-hexan, nebo cyklohexan.

Dále Geissler a spol.<sup>18</sup> použili destilace vzorku vody, kdy kondenzát par proudil do extrakčního zařízení, kde prostupoval vrstvou chlazeného organického rozpouštědla (15 ml hexanu). Poté se kontinuálně vracel do destilační baňky. Tato metoda je vhodná zejména při analýzách velice

znečištěných vod nebo sedimentů, neboť v sobě zahrnuje i čisticí stupeň (lipidy, vosky a jiné příbuzné složky nedehtilují spolu s analyty). Extrakce trvala 2 hodiny. Extrakt s přísadkou 1 ml isooktanu byl zakonzentrován na objem 0,5 ml.

García Pinto a spol.<sup>5</sup> využili CPP (cloud point preconcentration – prekonzentrace s využitím bodu zákalu neionogenního tenzidu) pro izolaci PAU z vodných vzorků. Metoda je založena na skutečnosti, že vodný roztok povrchově aktivní látky (PAL) se po zahřátí nad teplotu bodu zákalu rozdělí na dvě fáze (fázi s vysokou koncentrací tenzidu obsahující analyty a vodnou fázi s nízkým obsahem tenzidu). Získaný prekonzentrační faktor je srovnatelný s faktory jiných extrakčních technik. Výhodami CPP jsou jednoduchá aparatura a použití méně toxických činidel<sup>6,15</sup>. Autoři ke vzorku vody (10–50 ml) přidávali Triton X-114 (0,5 obj. %). Roztok byl zahříván v termostátované lázni při teplotě 40 °C po dobu 5 minut. Rozdělení obou fází bylo dosaženo odstředěním. 10  $\mu$ l fáze bohaté na PAL bylo dávkováno do chromatografického systému.

Ferrer se spolupracovníky<sup>6</sup> provedl CPP (pro izolaci PAU) zahřátím 25 ml vzorku vody, který obsahoval 1 obj. % Tritonu X-114 na teplotu 40 °C. Při této teplotě zahřívával vzorek celkem 10 minut. Vodná fáze nad fází bohatou na PAL byla odsáta Pasteurovou pipetou. K úplné eliminaci zbylého množství vodné fáze bylo použito odpaření za sníženého tlaku. Fáze bohatá na PAL obsahující PAU byla rozpuštěna v 5 ml cyklohexanu. Následovalo přečištění na koloně se silikagelem a bezvodým síranem sodným a analýza HPLC.

Alternativou k extrakci kapalinou je extrakce tuhými fázemi (SPE – solid phase extraction)<sup>7,17,20</sup>. Velice oblíbené je použití sorbentu v koloně. Přes řadu předností má tato technika i určitá úskalí. Vzorky s obsahem tuhých částic ucpávají póry náplně nebo mohou vzniknout kanálky, kterými přednostně protéká rozpouštědlo sorbentem.

Kayali-Sayadi a spol.<sup>12</sup> izolovali PAU z vodných vzorků na koloně SPE Sep-Pak vac tC-18. Kolona byla nejprve kondicionována methanolem (dvakrát 6 ml) a poté vodou (dvakrát 6 ml). Na kolonu bylo nanášeno 1500 ml filtrovaného vzorku. Průtoková rychlost byla 50 ml.min<sup>-1</sup>. Kolona byla dále sušena za vakua (5 min) a potom centrifugována (1200 ot.min<sup>-1</sup>). Adsorbované složky byly eluovány nejprve 3 ml, potom 1 ml diethyletheru průtokovou rychlostí 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. Extrakt byl odpařen a zbytek byl rozpuštěn v 1 ml methanolu. Zfiltrovaný roztok byl poté dávkován do systému HPLC.

Nirmaier a spol.<sup>21</sup> k izolaci PAU použili SPE systém tvořený jednotkou Baker SPE-10 a autory připravenou skleněnou kolonou plněnou 1 g sorbentu C18 (sorbent na bázi silikagelu modifikovaný oktadecylovými skupinami). Kolona byla kondicionována 5 ml methanolu, poté 5 ml dichlormethanu, 5 ml propan-2-olu a 5 ml směsi voda : propan-2-ol (20:3). K 500 ml vzorku vody bylo přidáno 75 ml propan-2-olu. Zfiltrovaný vzorek byl nanášeno na kolonu (průtok 2,5 ml.min<sup>-1</sup>). Poté byla kolona dvakrát promyta 10 ml směsi voda : propan-2-ol (20:3) a vysušena za vakua (30 min). Extrahované složky byly eluovány 1 ml a potom

dvakrát 500  $\mu$ l dichlormethanu. Následovalo vysušení proudem dusíku a rozpuštění zbytku v 350  $\mu$ l směsi methanol : voda (85:15). Tento vzorek byl pak analyzován HPLC.

Moret a spol.<sup>4</sup> použili k izolaci PAU z vodných vzorků a ze vzorků alkoholických nápojů SPE kolony Supelco ENVI-18. Kondicionace byla provedena dvakrát 6 ml směsi toluen : methanol (10:1), 6 ml methanolu a 6 ml vody. Následovalo nanášení vzorku na kolonu, sušení za vakua (15 min) a trojnásobná eluce 1 ml směsi dichlormethan : acetonitril (10:1). Eluát byl zakoncentrován (proudem dusíku) a poté znovu rozpuštěn ve 120  $\mu$ l acetonitrilu. On-line SPE prekoncentraci využil při stanovení PAU Hatřík se spoluautory<sup>2</sup>.

Bernal a spol.<sup>22</sup> použili techniku SPE při stanovení pesticidů a PCB ve vodných vzorcích. SPE kolonka C18 byla promyta methanolem a následně vodou. Na upravenou kolonku byl nanášen 1 l vzorku. Průtoková rychlost byla 10 ml.min<sup>-1</sup>. K eluci zachycených analytů byl použit *n*-hexan. Výsledný roztok byl zakoncentrován v rotační odparce na 1 ml. Následovalo čištění na kolonce florisilu, zakoncentrování a dávkování do systému GC.

Geissler a spol.<sup>18</sup> izolovali technikou SPE organochlorové pesticidy a PCB. Kolonky C18 (500 mg) byly kondicionovány 5 ml hexanu, methanolu a nakonec vodou. Vzorky obsahující 1 % methanolu byly aplikovány na kolonku průtokovou rychlostí 7–17 ml.min<sup>-1</sup>. Dále byly kolonky vysušeny proudem dusíku a eluovány třikrát 1 ml hexanu. K eluátu byl přidán 1 ml isooktanu (2,2,4-trimethylpentan) a vzorek byl odpařen na 0,5 ml.

V posledních letech roste počet aplikací extrakčních disků, které mají oproti kolonkám některé výhodné vlastnosti (nižší hydraulický odpor umožňuje při srovnatelném tlaku docílit vyšších průtoků, větší průměr disků zmenšuje problém jejich ucpávání při extrakci). Disky mají podobu filtračních membrán s velkou plochou a obsahují např. 10 % matrice z poly(tetrafluorethen)ových vláken (PTFE) a 90 % tvoří polymery nebo částice silikagelu s chemicky vázanými alkylovými skupinami.

El Harrak a spol.<sup>14</sup> izolovali PAU z vodných vzorků pomocí extrakčních disků (průměr 47 mm, tloušťka 0,5 mm, 500 mg C18 nebo SDB (kopolymer styren-divinylbenzen)). Disky C18 byly kondicionovány 20 ml směsi dichlormethan : ethyl-acetát : acetonitril (50:30:20). Rozpouštědlo bylo odsáto. Poté bylo přefiltrováno 20 ml směsi aceton : voda (80:20) a nakonec 10 ml vody. SDB disky byly kondicionovány 20 ml acetonu, 20 ml acetonitrilu a 20 ml dichlormethanu. Nakonec bylo přefiltrováno 20 ml vody. Na upravený disk byl nanášen vzorek s přísadkou organického rozpouštědla nebo PAL. PAU zachycené na disku byly eluovány dvakrát 15 ml směsi dichlormethan : ethyl-acetát : acetonitril (50:30:20). Po vysušení extraktu bezvodým síranem sodným byl extrakt zakoncentrován na vakuové rotační odparce (objem asi 0,5 ml). Objem byl nakonec upraven acetonitrilem na 1 ml. Následovala analýza metodou HPLC.

K analýze PAU a PCB byla rovněž použita mikroextrakce tuhými fázemi (SPME – solid phase microextraction, cit.<sup>7,17,23</sup>). Analyty ze vzorků jsou sorbovány přímo na vlákne, které je vyrobeno z křemene potaženého vrstvou

chemicky vázané stacionární fáze (poly(dimethylsiloxan), polyakrylát, poly(divinylbenzen) s Carbowaxem nebo Carboxenem). Nedochozí přitom k úplné extrakci, ale k ustálení rozdělovací rovnováhy analytu mezi matricí vzorku a stacionární fází vlákna. Někdy se při této technice využívá tzv. „head space“ systému, kdy jsou po ustavení rovnováhy mezi kapalnou fází (vzorkem) a plynnou fází nad vzorkem analyty sorbovány z plynné fáze. Desorpce z vlákna je prováděna tepelně s on-line dávkováním na kolonu plynového chromatografu nebo rozpouštědlem, jestliže je analytickou koncovkou HPLC. Mezi výhody této techniky patří rychlost, citlivost, eliminace použití rozpouštědel a možnost využití pro screening.

Hageman se spoluautory<sup>24</sup> použil SPME při stanovení PAU v tuhých vzorcích po převedení na vodný vzorek. PAU byly nejprve z tuhého vzorku extrahovány vodou za podkritických podmínek (viz dále). Následně byly PAU extrahovány z vodné fáze metodou SPME. Sorpční vlákno bylo na 15 minut umístěno do vodného roztoku, který byl po celou dobu extrakce míchán magnetickým míchadlem. Po extrakci bylo vlákno vsunuto do GC injektoru a při teplotě 300 °C byly analyty z vlákna desorbovány.

Byl použit také vzorkovač na principu membránové extrakce (SPMD – semipermeable polymeric membrane device, cit.<sup>25</sup>). Ten je tvořen polopropustnou membránou, která je ve vnitřní části pokryta tenkou vrstvou lipidu (triolein). Analyty ze vzorku difundují přes polopropustnou membránu a zachytávají se ve vrstvě trioleinu. Bennett a spol.<sup>26</sup> detailně ve svém článku popsali přípravu membrán, které pak rozmístili do několika vodních toků na 4 týdny. Exponované membrány po omytí vodou a mechanické úpravě byly extrahovány 400 ml hexanu. Po extrakci bylo rozpouštědlo s analyty nanášené na kolonku s bezvodým síranem sodným. Eluát byl zakoncentrován na objem přibližně 1 ml. Koextrahované trioleinové složky byly odstraněny gelovou chromatografií. Získaný eluát obsahující PAU a PCB byl odpařen na vakuové rotační odparce na objem asi 2 ml. Vzniklý vzorek byl frakcionován na silikagelové kolonce (eluce 40 ml hexanu – frakce A, obsahující PCB, – potom eluce 70 ml směsi hexan : dichlormethan (1:1) – frakce B, obsahující PAU). Následovalo zakoncentrování a aplikace GC/ECD nebo GC/MS.

Exponované membrány jsou přepravovány za snížené teploty a do dalšího zpracování se uchovávají v mrazničce. Výhodou je, že skladovací doba může být až několik měsíců.

### 3.2. Tuhé vzorky

Bergen a spol.<sup>10</sup> extrahovali 2–5 g zhomogenizovaného vzorku slávyk obecné (mořský mlž) 25 ml acetonu. Po centrifugaci byla oddělena kapalná fáze. Proces se opakoval ještě dvakrát. Spojené extrakty v dělicí nálevce byly zředěny deionizovanou vodou (300 ml) extrahovanou pentanem. Tento roztok byl extrahován třikrát vždy 50 ml pentanu (LLE). Spojené pentanové extrakty byly vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Objem rozpouštědla byl zredukován a zby-



tek byl rozpuštěn v hexanu (10 ml). 1 ml byl použit ke gravimetrickému stanovení lipidů a 9 ml bylo použito ke stanovení PCB. Po přečištění koncentrovanou  $H_2SO_4$ , redukci objemu rozpouštědla a rozpuštění zbytku v 1 ml heptanu byl výsledný vzorek dávkován do plynového chromatografu.

López García se spoluautory<sup>5</sup> extrahoval tuhou fází po promývání uhlí nebo sedimenty dvakrát 20 ml 40% hexanu v acetonu vždy po dobu 7 minut v ultrazvukové lázni. Po filtraci suspenze bylo rozpouštědlo odpařeno téměř do sucha v rotační odparce a zbytek byl znovu rozpuštěn v 5 ml hexanu. Následovalo čištění extraktu adsorpční chromatografií na kolonce se silikagelem a aluminou. Eluát byl odpařen téměř do sucha a zbytek byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu nebo tetrahydrofuranu. 20  $\mu$ l vzniklého roztoku bylo dávkováno do kapalinového chromatografu.

Hubert a spol.<sup>27</sup> použili techniku zrychlené extrakce rozpouštědlem (ASE – accelerated solvent extraction), při níž extrakce v systému tuhá látka – kapalina probíhá za zvýšené teploty (50–200 °C) a tlaku (10–15 MPa) po krátkou dobu. K izolaci PAU a persistentních organických polutantů (chlorované pesticidy, PCB a chlorbenzeny) autoři použili pro vzorky rostlin extrakční teploty 40 °C a 120 °C a pro půdní vzorky teploty 80 °C a 120 °C.

Hageman se spoluautory<sup>24</sup> použil místo organického rozpouštědla vodu za podkritických podmínek. Tento přístup využívá skutečnosti, že při vyšších teplotách se výrazně snižuje polarita kapalně vody. Pro účinnou extrakci PAU a PCB je doporučována teplota 250 °C. Autoři uskutečnili extrakci v nerezové trubici s uzávěrem, kterou po naplnění vzorkem a vodou umístili do předehřáté pece plynového chromatografu. Po extrakci byly analyty zakoncentrovány technikou SPME a následně analyzovány metodou GC/MS.

García Pinto a spol.<sup>15</sup> extrahovali 0,1–2 g popelu ze dřeva vodným roztokem Tritonu X-114. Po filtraci suspenze následovala CPP při teplotě 40 °C.

Bernal se spolupracovníky<sup>22</sup> použil k izolaci pesticidů a PCB z tuhých vzorků Soxhletovu extrakci. 1 g vzorku, který byl nejprve smísen s bezvodým síranem sodným, byl extrahován v Soxhletově extraktoru po dobu 3,5 hodiny směsí rozpouštědel *n*-hexan : dichlormethan (1:1) (při analýze vzorků bez obsahu tuku) nebo samotným *n*-hexanem (u analyzovaných vzorků s obsahem tuku). Extrakt byl poté zakoncentrován v rotační odparce na objem 1 ml. Následovalo čištění na kolonce s florisilem, eluce, zakoncentrování a dávkování do plynového chromatografu.

Wells a Echarri<sup>28</sup> extrahovali v Soxhletově aparatuře vzorky rybích tukových tkání (20 g), které byly nejprve rozetřeny s bezvodým síranem sodným. Extrakce trvala 4 hodiny a použitým rozpouštědlem byl dichlormethan (100 ml). Extrakt byl rozdělen na dvě části. První byla použita ke stanovení množství extrahovatelných lipidů. Druhá byla použita ke stanovení PCB. Byla zakoncentrována v odparce a po přidavku hexanu odpařena téměř do sucha proudem suchého vzduchu. Lipidy byly hydrolyzovány 20% KOH v ethanolu (300 ml) po dobu 1 hodiny při 60 °C. Reakční směs byla ochlazena a zředěna destilovanou vodou (200 ml) a poté byla extrahována (LLE) dvakrát 50 ml hexanu. Hexa-

nový extrakt byl odpařen asi na 1 ml proudem vzduchu a následně čištěn na kolonkách s  $Al_2O_3$  a poté se silikagelem. Alternativním nebo přídavným stupněm čištění bylo použití kolonky plněné silikagelem impregnovaným  $H_2SO_4$ . Frakce získané kapalinovou chromatografií byly postupně analyzovány pomocí GC.

Eggens a spol.<sup>29</sup> extrahovali (při stanovení PCB) v Soxhletově extraktoru vzorky rybích jater a svalové hmoty směsí hexan : aceton (3:1). Čištění bylo provedeno na koloně plněné  $SiO_2$  (2 g) a deaktivovaným  $Al_2O_3$  (8 g). Po eluci 25 ml hexanu a přidavku 1 ml isooktanu byl extrakt zakoncentrován proudem dusíku na 1 ml. K tomuto vzorku bylo přidáno 50 ng PCB 143 (vnitřní standard). Výsledný extrakt byl analyzován GC/ECD.

Lopez-Avila a spol.<sup>30</sup> využili k extrakci organických polutantů z kontaminovaných půd mikrovlnné energie (aplikace mikrovln umožňuje šetrnější provedení extrakce ve srovnání s použitím horkých extrakčních rozpouštědel<sup>17</sup>). 5 g vzorku bylo kvantitativně převedeno do teflonové extrakční nádoby, poté bylo ke vzorku přidáno 30 ml směsi hexan : aceton (1:1). Extrakce byla provedena při 115 °C po dobu 10 minut při výkonu 1000 W. Po extrakci byla nádoba ochlazena na laboratorní teplotu (asi 10–15 minut). Kapalína nad sedlinou byla přefiltrována přes skelnou vatu předem promytou směsí hexan : aceton a byla spojena s 2–3 ml směsi hexan : aceton po oplachu sedliny. Extrakt byl proudem dusíku zakoncentrován na 5 ml. Následovalo oddělení jemných částic centrifugací (2300 ot.min<sup>-1</sup>). Extrakt byl nakonec zakoncentrován na 1 ml a analyzován pomocí GC/ECD nebo metodou ELISA.

David se spoluautory<sup>31</sup> využil k izolaci PCB z pevných vzorků superkritické fluidní extrakce (SFE – supercritical fluid extraction). Autoři při optimalizaci SFE kladli důraz na selektivitu izolace. Nejprve pomocí modelových vzorků s přidavkem analytů optimalizovali podmínky, které pak aplikovali na vzorky reálné. Zjistili však, že výtěžnosti ve vzorcích s přidavkem analytů, kde se uplatňuje pouze faktor rozpustnosti analytů v extrakčním médiu, byly několikrát vyšší než u vzorků reálných, kde se navíc uplatňuje fixační efekt analytů na matici. K překonání tohoto efektu bylo třeba zvolit optimální průtokovou rychlost extrakčního média. Výsledné podmínky SFE byly tyto: extrakční médium  $CO_2$ , průtoková rychlost 1 ml.min<sup>-1</sup>, hustota 0,75 g.ml<sup>-1</sup>, teplota extrakce 60 °C, tlak 20 MPa. Extrakty nebylo třeba dále přečišťovat.

SFE lze použít též ke specifické izolaci PAU z tuhých vzorků. PAU jsou však v superkritickém  $CO_2$  málo rozpustné, proto je třeba jejich rozpustnost zvýšit přidavkem modifikátoru ( $CHClF_2$ , cit.<sup>31</sup>).

Ling se spolupracovníky<sup>32</sup> použil SPE k izolaci PCB ze vzorků rybích tkání. 2 g sorbentu C18 spolu s přibližně 0,5 g rybích plátků bylo rozetřeno ve třecí misce. Získaná polosuchá a homogenní směs byla vnesena do předem zvážené skleněné kolony s fritou, která obsahovala 1 g silikagele (modifikovaného kyselinou sírovou). Eluce byla provedena 10 ml hexanu (volným průtokem). Hexanový eluát byl zakoncentrován proudem dusíku na konečný objem 1 ml. Následovala analýza GC-ECD příp. GC-MS.

#### 4. Přechištění

Úprava vzorku nekončí izolací analytů z matrice. Zpravidla je nutné extrakty přechistit a odstranit tak koextrahované složky, které analýzu ruší. Nejčastěji se využívá čištění na vhodném sorbentu<sup>5,6,13,16,19,22,25,29</sup> nebo gelu<sup>26</sup>, méně pak reextrakce do jiného rozpouštědla<sup>10</sup> (příp. do směsi rozpouštědel).

S úspěchem lze při analýzách PAU a PCB, kdy je třeba odstranit z extraktu tuky nebo oleje, využít semipermeabilní membrány propouštějící menší molekuly analytů, ale zdrazující větší molekuly (triglyceridy, fosfolipidy, atd.)<sup>7</sup>.

#### 5. Analytická koncovka

Analytickou koncovkou pro stanovení PAU je zejména vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí<sup>3-6,12-15,19,33</sup>, méně pak s UV detekcí<sup>2,4,14,34</sup> a ojedinele s ampérometrickou detekcí<sup>21</sup>, a dále plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GG-MS, cit.<sup>19,24,26</sup>). Analytickou koncovkou při stanovení PCB jsou plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (GC-ECD, cit.<sup>10,18,26,28,32</sup>), GC se dvěma kapilárními kolonami a dvěma detektory ECD (cit.<sup>7,16,29,30,35,36</sup>) a GC-MS<sup>10,32</sup>, ojedinele pak ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, tj. enzymová imunologická analýza, cit.<sup>30</sup>).

#### 6. Závěr

PAU a PCB jsou významnými kontaminanty životního prostředí. Sledování jejich obsahu je důležitým úkolem kontrolních laboratoří. V různých složkách životního prostředí se vyskytují zpravidla ve stopových koncentracích ( $\text{ng.l}^{-1}$ ,  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ,  $\text{ng.kg}^{-1}$ ,  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Vzhledem k tomu je nezbytné věnovat při jejich stanovení značnou pozornost odběru a zpracování vzorku před vlastní analytickou koncovkou. Významnou součástí postupu stanovení je izolace vzorku, ke které lze využít řadu metod zmíněných výše, přičemž při volbě vhodného řešení hraje významnou roli matrice, ve které mají být analyty stanoveny. V České republice jsou k dispozici platné normy pouze pro stanovení PAU resp. PCB ve vzorcích vod.

Řada publikovaných postupů nabízí zajímavé řešení analytického problému, např. zefektivnění analýzy pro různé typy matric. Před jejich zavedením do praxe je však nezbytná jejich pečlivá validace.

#### LITERATURA

- Čížek Z. (ed.): *Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)*. ČKD TIS., Praha 1995.
- Hatřík Š., Lehotay J.: Chem. Pap. 48, 334 (1994).
- Lintelmann J., Waadt K., Sauerbrey R., Kettrup A.: Fresenius' J. Anal. Chem. 352, 735 (1995).
- Moret S., Amici S., Bortolomeazzi R., Lercker G.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 201, 322 (1995).
- López García A., Blanco González E., García Alonso J. I., Sanz-Medel A.: Chromatographia 33, 225 (1992).
- Ferrer R., Beltrán J. L., Guiteras J.: Anal. Chim. Acta 330, 199 (1996).
- Helán V. (ed.): *Analýza organických látek*. T-PRINT, Třinec 1999.
- Čížek Z. (ed.): *Polychlorované bifenyly*. ČKD TIS., Praha 1992.
- Font G., Mañes J., Moltó J. C., Picó Y.: J. Chromatogr., A 733, 449 (1996).
- Bergen B. J., Nelson W. G., Pruell R. J.: Environ. Toxicol. Chem. 15, 1517 (1996).
- Totevová S., Prouza M., Brenner V., Demnerová K.: Chem. Listy 91, 858 (1997).
- Kayali-Sayadi M. N., Rubio-Barroso S., Beceiro-Roldan C., Polo-Diez L. M.: J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 19, 3135 (1996).
- Samara C., Lintelmann J., Kettrup A.: Toxicol. Environ. Chem. 48, 89 (1995).
- El Harrak R., Calull M., Marcé R. M., Borrull F.: Int. J. Environ. Anal. Chem. 64, 47 (1996).
- García Pinto C., Pérez Pavón J. L., Moreno Cordero B.: Anal. Chem. 66, 874 (1994).
- ČSN EN ISO 6468: *Jakost vod (Stanovení některých organochlorových insekticidů, polychlorovaných bifenyly a chlorbenzenů – Metoda plynové chromatografie po extrakci kapalina – kapalina*, (červenec 1998).
- Straková M., Matisová E.: Chem. Listy 91, 330 (1997).
- Geissler A., Schöler H. F.: Chemosphere 23, 1029 (1991).
- ČSN 75 7554: *Jakost vod – Stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) – Metoda HPLC s fluorescenčním a metoda GC s hmotnostním detektorem*, (srpen 1998).
- Tříška J.: Chem. Listy 89, 223 (1995).
- Nirmaier H.-P., Fischer E., Meyer A., Henze G.: J. Chromatogr., A 730, 169 (1996).
- Bernal J. L., Del Nozal M. J., Atienza J., Jiménez J. J.: Chromatographia 33, 67 (1992).
- Sedláková J., Matisová E., Slezáčková M.: Chem. Listy 92, 633 (1998).
- Hageman K. J., Mazeas L., Grabanski C. B., Miller D. J., Hawthorne S. B.: Anal. Chem. 68, 3892 (1996).
- Helán V. (ed.): *Analýza organických látek v životním prostředí*. T-PRINT, Třinec 1998.
- Bennett E. R., Metcalfe T. L., Metcalfe C. D.: Chemosphere 33, 363 (1996).
- Hubert A., Wenzel K. D., Engelwald E., Schurmann G.: Rev. Anal. Chem. 20, 101 (2001).
- Wells D. E., Echarrri I.: Int. J. Environ. Anal. Chem. 47, 75 (1992).
- Eggens M. L., Opperhuizen A., Boon J. P.: Chemosphere 33, 1579 (1996).
- Lopez-Avila V., Benedicto J., Charan Ch., Young R.: Environ. Sci. Technol. 29, 2709 (1995).
- David F., Verschuere M., Sandra P.: Fresenius' J. Anal. Chem. 344, 479 (1992).
- Ling Y.-C., Chang M.-Y., Huang I.-P.: J. Chromatogr., A 669, 119 (1994).

33. Marriott P. J., Carpenter P.D., Brady P.H., Mc Cormick M. J., Griffiths A. J., Hatvani T. S. G., Raddell S. G.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 3229 (1993).
34. Cutright T. J., Lee S.: *Fresenius Environ. Bull.* 3, 42 (1994).
35. Benická E., Novakovsky R., Hrouzek J., Krupčík J., Sandra P.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 19, 95 (1996).
36. Atuma S. S., Linder C.-E., Andersson Ö., Bergh A., Hansson L., Wicklund-Glynn A.: *Chemosphere* 33, 1459 (1996).

**J. Mikošková<sup>a</sup>, L. Čáp<sup>b</sup> and K. Lemr<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>Laboratory Morava, <sup>b</sup>Department of Analytical Chemistry, Palacký University, Olomouc): **Isolation Procedures for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls**

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) as important contaminants of environment is a task of many control laboratories. Suitable methods of sample treatment and isolation of analytes must be used due to low contents of the compounds in complex matrices. Individual steps of PCB and PAH analyses are mentioned, the main emphasis being put on the published methods of isolation. Treatment of liquid as well as solid samples using, e.g., liquid-liquid extraction, cloud point preconcentration, solid phase extraction including microextraction and extraction disks, application of membranes, accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction, supercritical fluid extraction and microwave application is presented. Many of the mentioned processes offer interesting alternatives for isolation, but careful validation is necessary before they are used in laboratory practice.

## HODNOTENIE ÚSPEŠNOSTI LABORATÓRNYCH METÓD

**BRANKO BALLA<sup>a</sup>, JÁN MOCÁK<sup>a</sup>,  
ELEONORA VARMUSOVÁ<sup>b</sup>, DENISA KAVKOVÁ<sup>b</sup>  
a IVAN TUDÍK<sup>b</sup>**

*<sup>a</sup>Katedra analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, 812 37 Bratislava, <sup>b</sup>Ústav tuberkulózy a respiračných chorôb, Kvetnica, 058 87 Poprad  
mocak@cvt.stuba.sk*

Došlo 25.10.02, prepracované 15.2.03, prijaté 18.3.03.

Kľúčové slová: miera citlivosti, miera špecifickosti, účinnosť, hranica rozhodovania, ROC-krivky

### Úvod

Chemometrické spracovanie výsledkov laboratórnych metód vytvára nové možnosti ako podporiť proces diagnostikovania v laboratórnej medicíne a v klinickej chémii. Táto oblasť laboratórnych meraní priniesla v ostatnom čase nové prvky do teórie analytickej chémie, vďaka čomu to, čo je obsahom tohto prehľadného referátu, platí nielen o výsledkoch analytických a biochemických stanovení v klinickej praxi, ale je použiteľné všeobecnejšie pre hodnotenie akýchkoľvek analytických meraní<sup>1</sup> či laboratórnych meraní vôbec. Táto práca si kladie za úlohu vysvetliť význam a objasniť použitie najdôležitejších pojmov používaných na charakterizovanie laboratórnych výsledkov, ako sú napr. miera citlivosti a miera špecifickosti<sup>2</sup>, kritické hodnoty (hranice rozhodovania), alebo ROC-krivky, ako aj ukázať možnosti, ktoré poskytujú dostupné softvéry a odkázať na najvhodnejšiu literatúru pre podrobnejšie štúdium.

### Binárne rozhodovanie a kontingenčná tabuľka

Častou úlohou pri posudzovaní laboratórnych meraní je vyhodnotenie ich úspešnosti alebo výkonnosti a zistenie, do akej miery možno laboratórne výsledky použiť na spoľahlivú výpoveď o študovaných objektoch. To je obzvlášť významné pri použití laboratórnych meraní na klinicko-diagnostické účely, kde napr. rozpoznanie stavu ochorenia na základe úrovne hodnôt tej-ktorej posudzovanej laboratórnej metódy (v klinickej praxi sa viac používa termín laboratórny parameter) môže priniesť včasné zistenie zdravotného rizika alebo aspoň môže ušetriť príslušnú osobu od zložitejších a invazívnejších diagnostických vyšetrení.

Laboratórna metóda pri binárnom rozhodovaní poskytuje binárnu výpoveď, existujúcu obvykle v tvare áno/nie, prítomný/nepítomný alebo pozitívny/negatívny. Vo vše-

becnosti sa uvažujú prelínajúce sa populácie dvoch kategórií, ktorým síce v zásade zodpovedajú odlišné hodnoty laboratórnych výsledkov (malé vs. veľké, alebo naopak), ale bez úplnej, ideálnej diferenciácie, takže spraviť deliacu čiaru, kde končí jedna a začína druhá populácia, nie je jednoduchá úloha. Celý problém je potrebné chápať z pravdepodobnostného hľadiska. Náhodnosť je príznačnou črtou nielen samotného analytického či biochemického merania, ale napr. v prípade laboratórnych meraní pre klinicko-diagnostické účely je ich náhodná zložka značne ovplyvnená aj zložitou procesov v ľudskom organizme, ktorý v tomto prípade predstavuje extrémne zložitú maticu. Navyiac ho v tomto prípade značne ovplyvňuje preanalytická fáza laboratórnej metódy (angl. tiež: laboratory test, assay), kde zarúčenie jednotných podmienok odberu vzorky, vrátane správania sa vyšetřovaného subjektu napr. 24 hodín pred odberom, je stav, ku ktorému sa realita len viac-menej približuje.

V tejto práci sa pre názornosť a jednoduchosť budú uvažovať nasledujúce dve kategórie: *a*) chorí (**ill**) s veľkosťou súboru  $n_1$  a *b*) zdraví (**healthy**) s veľkosťou súboru  $n_2$ . Rozdelenie subjektov do týchto dvoch skupín sa má vykonať vždy nezávislým spôsobom, napr. iným, vysoko hodnoverným laboratórnym meraním. Napr. na dôkaz malígneho ochorenia sa používa jednoznačný histologický nález. Zatriedenie vyšetřovanej osoby do skupiny chorých alebo zdravých však v tomto prípade možno s vysokou úspešnosťou predpokladať na základe hodnôt analyzovaných tumorových markerov<sup>3-6</sup>, čo je omnoho jednoduchšie a pre vyšetřovaného prijateľnejšie. Na výpočet jednotlivých charakteristík skúmaných laboratórnych metód sa potom používajú rôzne druhy porovnania medzi výstupom – výsledkom metódy a správnym zatriedením skúmaného objektu (v tomto prípade subjektu, vyšetřovanej osoby) do jednej či druhej skupiny podľa nezávislého jednoznačného testu. Testovací súbor dát použitých na hodnotenie úspešnosti laboratórnych metód obsahuje len dáta, ktorých príslušnosť do jednej z dvoch uvažovaných kategórií (skupín, tried) je známa. Ide o tzv. „learning set“ (učebný súbor, t.j. dáta, podľa ktorých sa vybraná chemometrická technika učí ako diskriminovať predmetné kategórie) a z hľadiska chemometrickej metódy ide o tzv. „supervised learning“ (riadené učenie), pri ktorom zatriedenie objektov či subjektov do kategórií je vopred známe. Naproti tomu zadelenie objektov či subjektov do tried pri metodikách typu „unsupervised learning“ (neriadené učenie) nie je apriórne známe (napr. pri analýze hlavných komponentov).

Základom výpočtov pri hodnotení úspešnosti laboratórnych metód je kontingenčná tabuľka (tab. I). Pri konštrukcii kontingenčnej tabuľky sa pre meranie danou laboratórnou metódou najprv určí, resp. odhadne kritická hodnota (nazývaná aj hranica rozhodovania, angl. decision level alebo cut-off value), podľa ktorej sa vykoná zatriedenie do príslušnej skupiny, **i** alebo **h**. Potom sa zatriedenie získané laboratórnou metódou porovná so správnym, nezávisle získa-

ným zatriedením, z čoho rezultuje pre každé meranie jedna zo štyroch možností: *a*) true positive, *tp*, ak výstup laboratórnej metódy sa zhoduje so správnym zatriedením do skupiny s pozitívnym nálezom, *b*) false positive, *fp*, ak výstup laboratórnej metódy poskytuje zatriedenie do skupiny s pozitívnym nálezom, ktoré nie je správne, *c*) true negative, *tn*, ak výstup laboratórnej metódy sa zhoduje so správnym zatriedením do skupiny s negatívnym nálezom, a *d*) false negative, *fn*, ak výstup laboratórnej metódy poskytuje zatriedenie do skupiny s negatívnym nálezom, ktoré nie je správne.

Tabuľka I

Kontingenčná tabuľka 2 × 2 – posúdenie výsledku laboratórnej metódy

Výsledok laboratórnej metódy	Správny výsledok (t.j. správna diagnóza)		Celkom
	ill (chorí)	healthy (zdraví)	
pozitívny	<i>tp</i>	<i>fp</i>	<i>tp</i> + <i>fp</i>
negatívny	<i>fn</i>	<i>tn</i>	<i>fn</i> + <i>tn</i>
Celkom	<i>tp</i> + <i>fn</i> = $n_1$	<i>fp</i> + <i>tn</i> = $n_2$	$n_1$ + $n_2$

### Spôsoby hodnotenia úspešnosti laboratórnych metód

Charakterizovanie výsledkov zhromaždených v kontingenčnej tabuľke umožňujú nasledujúce, vzájomne sa dopĺňajúce charakteristiky<sup>1,7-9</sup>: citlivosť *Se* (senzitivita – z angl. sensitivity), špecifickosť *Sp* (specificity) a účinnosť *E* (efficiency), ktoré sú definované v rovniciach (1)–(3):

$$Se = tp / (tp + fn) = tp / n_1 = 1 - \beta = P[p|i] \quad (1)$$

$$Sp = tn / (tn + fp) = tn / n_2 = 1 - \alpha = P[n|h] \quad (2)$$

$$E = (tp + tn) / (tp + fn + fp + tn) = (tp + tn) / (n_1 + n_2) \quad (3)$$

Symbody  $n_1$  a  $n_2$  označujú počet subjektov v prvej, resp. druhej kategórii,  $\alpha$  a  $\beta$  označujú štatistickú chybu prvého druhu (pravdepodobnosť, že neplatí nulová hypotéza, ak je v skutočnosti správna), resp. chybu druhého druhu (pravdepodobnosť, že sa prijme nulová hypotéza, ak je v skutočnosti nesprávna). Chyby prvého a druhého druhu sa vyskytujú nielen pri rozmanitom štatistickom testovaní, ale majú napr. základný význam pri určovaní násobiaceho koeficientu v prípade medze detekcie alebo medze stanovenia<sup>10-12</sup>.

Podmienené pravdepodobnosti, ktoré sa nachádzajú v rov. (1), (2), ako aj ďalej v rov. (6) a (7), majú nasledujúci zmysel:  $P[p|i]$  je pravdepodobnosť, že daný subjekt bude laboratórnou metódou posudzovaný ako pozitívny (*p*), ak patrí naozaj do skupiny chorých (*i*);  $P[n|h]$  je pravdepodobnosť, že daný subjekt bude laboratórnou metódou posudzovaný ako negatívny (*n*), ak patrí naozaj do skupiny zdravých (*h*);  $P[i|p]$  je pravdepodobnosť, že daný subjekt bude diagnostikovaný ako chorý (*i*), ak jeho laboratórny test (výsledok laboratórnej metódy) je

pozitívny (*p*);  $P[h|n]$  je pravdepodobnosť, že daný subjekt bude diagnostikovaný ako zdravý (*h*), ak jeho laboratórny test je negatívny (*n*).

Na tomto mieste treba upozorniť, že v analytickej chémii dávnejšie zavedená citlivosť má aj iný význam, keďže v oblasti kvantitatívnej analýzy je definovaná ako smernica kalibračnej závislosti, vypočítaná pomocou derivácie  $\partial S/\partial c$ , kde *S* je signál a *c* označuje koncentráciu<sup>13-15</sup>. Preto AOAC označuje veličinu vyjadrenú v rov. (1) ako miera citlivosti (angl. sensitivity rate)<sup>2</sup>. Aj špecifickosť sa niekedy používa v kvantitatívnej analýze v inom význame, a to na charakte-

rizovanie vplyvu interferencií v multikomponentnom analyte<sup>15</sup>, preto AOAC veličinu vyjadrenú v rov. (2) označuje ako miera špecifickosti (angl. specificity rate)<sup>2</sup>. Tam, kde k nejednoznačnosti nemôže dôjsť, používajú sa však stručnejšie termíny citlivosť a špecifickosť, čo je bežné napr. v klinickej chémii.

V odbornej literatúre sa vyskytujú aj ďalšie charakteristiky výsledku laboratórnej metódy<sup>1</sup>: pozitívny pravdepodobnostný pomer (angl. positive likelihood ratio, *PLR*) negatívny pravdepodobnostný pomer (angl. negative likelihood ratio, *NLR*), definované v rov. (4) a (5), pozitívna prediktívna hodnota (angl. positive predictive value, *PPV*) a negatívna prediktívna hodnota (angl. negative predictive value, *NPV*), definované v rov. (6) a (7), kde sa rôznym spôsobom kombinujú pomery, v ktorých sa vyskytujú *tp*, *fp*, *tn* a *fn*:

$$PLR = (tp/n_1) / (fp/n_2) = Se / (1 - Sp) \quad (4)$$

$$NLR = (tn/n_2) / (fn/n_1) = Sp / (1 - Se) \quad (5)$$

$$PPV = tp / (tp + fp) = P[i|p] \quad (6)$$

$$NPV = tn / (tn + fn) = P[h|n] \quad (7)$$

*PPV* má podobný priebeh ako *Sp*, t.j. hodnoty *PPV* sú v rozsahu <0;1> a s hodnotou príslušnej premennej stúpajú. *NPV* má podobný priebeh ako *Se*, teda hodnoty *NPV* sú v rozsahu <0;1> a s hodnotou príslušnej premennej klesajú. *PLR* má so vzrastom príslušnej premennej stúpajúci trend a jej priebeh je málo hladký (značne zubatý); *NLR* má naopak klesajúci trend. Rozsah hodnôt *PPV*, ako aj *NPV* nie je zhora pevne ohraničený (zdola je nula), takže ich stupnice v porovnaní s citlivosťou a špecifickosťou majú výrazne väčší rozsah.

## Hranica rozhodovania a ROC-krivky

Hranica rozhodovania  $\delta$ , prípadne nazývaná aj ako kritická hodnota (angl. decision limit, cut-off value), definuje hodnotu, nad ktorou sa výstup laboratórnej metódy hodnotí ako pozitívny; hodnoty pod medzou rozhodovania sa hodnotia ako negatívne<sup>1,9,16</sup>. To však platí len v prípade, ak hodnoty testu vzťahované na populáciu **h** (zdraví) sú menšie oproti hodnotám vzťahovaným na populáciu **i** (chorí), inak sa vykoná presné opačné hodnotenie<sup>9</sup>. Ak by populácie **h** a **i** boli úplne separované, potom by platilo, že  $tn = n_2$  ( $fp = 0$ ) a  $tp = n_1$  ( $fn = 0$ ). V reálnom živote sú však rozdelenia pravdepodobností oboch kategórií vzájomne prekrývajúce a zvolená hodnota  $\delta$  reguluje hodnoty charakteristík úspešnosti laboratórneho testu, t.j. citlivosti, špecifickosti, účinnosti, prípadne hodnôt *PLR*, *NLR*, *PPV* a *NPV*. Vzrast citlivosti je vždy sprevádzaný poklesom špecifickosti, a naopak. Podobné antagonizmy sú aj v prípadoch *PLR* a *NLR*, ako aj *PPV* a *NPV*.

Správna voľba hranice rozhodovania  $\delta$  závisí od cieľa laboratórneho merania, t.j. či klasifikácie *fp* sú viac škodlivé než klasifikácie *fn*, alebo naopak. Riziko, resp. cena nesprávnej klasifikácie, by mali byť známe predtým, než sa zvolí spôsob, ako určiť optimálnu hodnotu  $\delta$ . Najobvyklejšia voľba medze rozhodovania  $\delta$  je daná hodnotou laboratórneho testu, zodpovedajúcou maximu účinnosti (angl. efficiency).

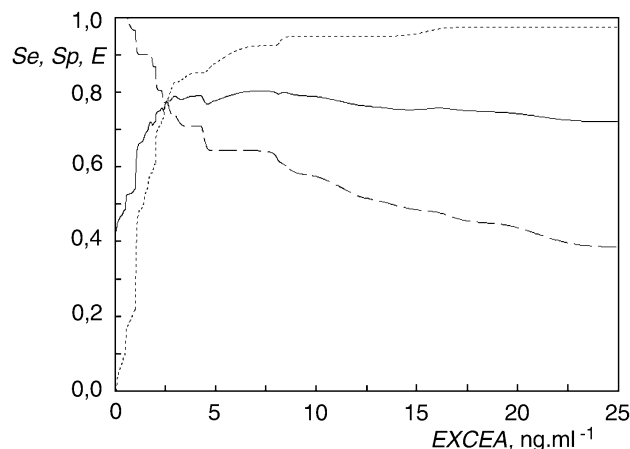
Prediktívnu schopnosť laboratórnej metódy (testu) možno efektívne zviditeľniť pomocou ROC-krivky, ktorá je vynesena v súradniciach *Se* vs.  $(1 - Sp)$ . Skratka ROC je odvodená od slov receiver operating characteristic, keďže sa pôvodne využívala ako operačná charakteristika rádiológátora<sup>17</sup>; až neskôr sa objavili aplikácie ROC v medicíne<sup>18-20</sup> a v analytickom kontexte sa ROC vyskytuje len v ostatnej dobe<sup>1</sup>. Diagonálna línia na ROC-diagrame predstavuje prípad celkom neúspešnej laboratórnej metódy s nulovou prediktívnou hodnotou, keďže pravdepodobnosť úspešného a neúspešného zatriedenia je zhodne 50 %, čo zodpovedá celkom náhodnej klasifikácii. Vzdialenosť ROC-krivky od diagonálnej línie je preto mierou výkonnosti laboratórnej metódy, čím je vzdialenosť väčšia, tým metóda lepšie odlišuje dve uvažované populácie (zmena od 50 % smerom k 100 %) <sup>21</sup>. V ROC-diagramoch sa ROC-krivky majú v zásade nachádzať v hornom trojuholníku nad diagonálou; nespĺnenie tejto podmienky indikuje nesprávne zadanie dát; presnejšie takýto prípad indikuje plocha pod ROC-krivkou menšia ako 0,5.

Zo štatistického hľadiska ROC-krivky definujú vzťah medzi chybou  $(1 - \beta)$  a chybou  $\alpha$ , pričom chyba  $\alpha$  (chyba I. druhu) reprezentuje frakciu  $fp/n_1$  výsledkov, chyba  $\beta$  (chyba II. druhu) reprezentuje frakciu  $fn/n_2$  výsledkov, takže chyba  $(1 - \beta)$  prislúcha frakcii výsledkov  $tp/n_1$ . ROC-krivka ukazuje pre každú možnú hodnotu hranice rozhodovania  $\delta$ , aké je percento správne diagnostikovaných abnormálnych subjektov (t.j. *tp*) voči percentu nesprávne diagnostikovaných normálnych subjektov (t.j. *fp*)<sup>21</sup>.

Výhodou ROC-analýzy je, že pomocou ROC-kriviek možno znázorniť a porovnať niekoľko laboratórnych metód

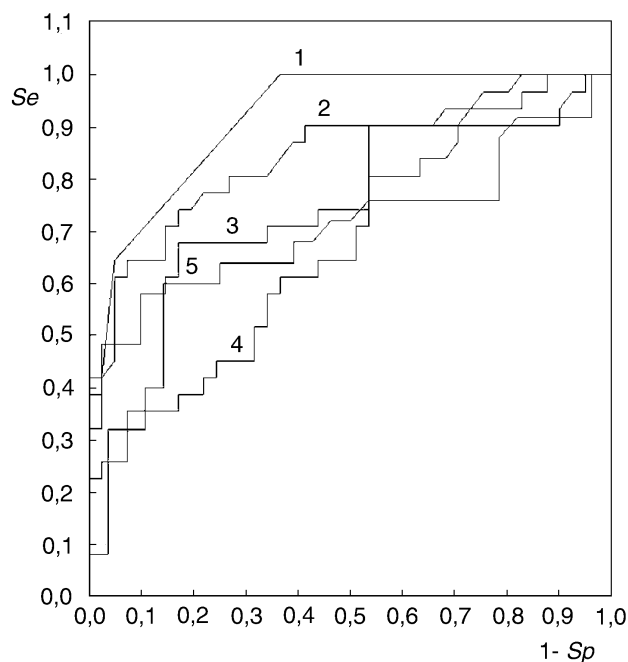
a napokon z nich možno vybrať najlepšiu metódu<sup>9</sup>. Metódy, ktoré lepšie diskriminujú dve predmetné kategórie objektov, resp. subjektov, majú ROC-krivky čo najviac hore a vľavo. Ideálna diagnostická metóda, ktorá by umožnila dokonale diskriminovať normálne a abnormálne subjekty, mala by vykazovať ROC-krivku strmo stúpajúcu hneď od počiatku smerom k ľavému rohu diagramu a potom smerujúcu takmer horizontálne k pravému hornému rohu diagramu<sup>21</sup>. Táto zásada umožňuje vizuálne porovnanie ROC-kriviek, teda kvalitatívny spôsob hodnotenia laboratórnych metód, umožňujúci zostaviť poradie ich výkonnosti. V prípade prekrytých ROC-kriviek je však takáto vizuálna inšpekcia dost subjektívna.

Hlavným kritériom výkonnosti laboratórnej metódy je plocha *A* vypočítaná pod ROC-krivkou; čím je väčšia, tým je metóda účinnejšia<sup>9,22-25</sup>. Ak sa do jedného grafu vynesie niekoľko ROC-kriviek, možno jednoduchým porovnaním plochy pod krivkami zistiť, ktoré laboratórne meranie poskytuje najväčšiu diskrimináciu medzi uvažovanými kategóriami, teda v nami uvažovanom prípade medzi skupinami chorých (**i**) a zdravých (**h**). V našich prácach<sup>3-6</sup> sme napr. ukázali, že medzi skúmanými údajmi laboratórnych metód, predstavujúcich tumorové markery na diagnostikovanie malígnych pľúcnych ochorení, najlepšiu informáciu poskytuje premenná *CEA* vo výpotku (*EXCEA*), potom *CYFRA 21-1* vo výpotku (*EXCYF*), ďalej *CEA* v sére (*SCEA*) a najmenší informačný obsah má *CYFRA 21-1* v sére (*SCYF*). Pri



Obr. 1. Grafický priebeh kriviek citlivosti *Se* (---), špecifickosti *Sp* (---) a účinnosti *E* (—) pre premennú *EXCEA*, ktorú predstavuje pľúcny tumorový marker *CEA* (karcinoembryonálny antigén) v pleurálnom výpotku (*EX*). Vyšetřilo sa 72 osôb, z toho 41 histologicky bez malignity a 31 s histologicky dokázanou malignitou

tomto štúdiu sa použili dva tumorové markery, a to *CEA* (karcinoembryonálny antigén) a *CYFRA 21-1* (cytokeratín fragment), v dvoch pacientom odobratých telesných tekutinách – vo výpotku, čo je kvapalina v oblasti pohrudnice, vyskytujúca sa pri benígnych i malígnych pľúcnych ochoreniach, a v krvi. V názve premennej sme vzorky z výpotku



Obr. 2. ROC-krivky pre 4 premenné predstavujúce pľúcne tumorové markery *CEA* a *CYFRA* v pleurálnom výpotku (indikuje počiatková skratka *EX*) a v sére (počiatková skratka *S*), ako aj pre *PCI* multikomponent, získaný lineárnou kombináciou *EXCEA*, *EXCYF*, *SCEA* a *SCYF* technikou *PCA*. Vyšetřilo sa 72 osôb, z toho 41 histologicky bez malignity a 31 s histologicky dokázanou malignitou. Plochy pod krivkami *A*: (1) *PCI*:  $A = 0,9182$ ; (2) *EXCEA*:  $A = 0,8482$ ; (3) *EXCYF*:  $A = 0,7549$ ; (4) *SCEA*:  $A = 0,6869$ ; (5) *SCYF*:  $A = 0,6864$ . Poradie premenných pri hodnote súradnice  $(1 - Sp) = 0,3$  je: 1, 2, 3, 5, 4 a pri hodnote  $(1 - Sp) = 0,7$  je: 1, 2, 4, 3, 5.

označili ako *EX* a vzorky v krvnom sére ako *S*. Na obr. 1 je ukážka priebehu kriviek *Se*, *Sp* a *E* pre *EXCEA*, na obr. 2 štyri spodné ROC-krivky zodpovedajú uvedeným štyrom premenným. Takto sa dalo zistiť, že medzi individuálnymi údajmi markerov najrelevantnejšiu indikáciu malígneho ochorenia v tomto štúdiu poskytuje *CEA* vo výpotku (*EXCEA*). Ešte väčšiu plochu *A* však poskytuje multikomponent *PCI*, čo je prvý hlavný komponent zistený technikou *PCA* (analýzou hlavných komponentov), ktorý bol lineárnou kombináciou troch pôvodných premenných, *EXCEA*, *EXCYF* a *SCEA*, teda obsahuje kolektívnu informáciu najlepších tumorových markerov. Plocha *A* pod najvyššou krivkou zodpovedajúcou multikomponentu *PCI* je výrazne väčšia v porovnaní s najlepšou individuálnou premennou *EXCEA*. Zistili sme tiež, že väčšiu plochu *A* v porovnaní s premennou *EXCEA* dáva aj multikomponent *DFI*, čo je prvá diskriminačná funkcia, vypočítaná ako lineárna kombinácia pôvodných premenných technikou *LDA* (lineárnu diskriminačnú analýzu), v ktorej sa však lineárna kombinácia premenných vykonáva iným spôsobom než pri *PCA*.

O charakteristikách úspešnosti laboratórných metód, voľbe hranice rozhodovania, ROC-krivkách a ďalšej problematike

diskutovanej v tejto práci existuje dnes už pomerne veľa literárnych prameňov, ktoré umožnia hlbšie štúdium. Na prvom mieste tu treba spomenúť prehľadné referáty<sup>27-31</sup>. Asi najobsažnejším rýchlym literárnym zdrojom je harvardská web stránka K. H. Zou<sup>32</sup>.

### Chemometricky podporovaná predpoveď diagnózy

Pre zvolenú laboratórnu metódu, ktorú možno všeobecne označiť symbolom  $x$ , možno výber kritickej hodnoty  $\delta$  pre premennú  $x$  urobiť na základe priebehu kriviek  $Se - x$ ,  $Sp - x$  a najmä  $E - x$ , v tomto často používanom prípade podľa súradnice  $x$  maxima účinnosti  $E$ . Určenie kritickú hodnotu  $\delta$  potom možno využiť na chemometrickú predikciu diagnózy u ďalších osôb vyšetřovaných pomocou metódy  $x$ . Určenie hodnotu  $\delta$  možno použiť buď priamo na diagnostikovanie, alebo na porovnanie s uzančnou kritickou hodnotou používanou v klinickom laboratóriu, prípadne na jej korekciu. Je však zrejmé, že vykonanie viacerých laboratórných metód s cieľom spresniť diagnózu obvyklým spôsobom, poskytujú len sekvenciu postupne získaných jednotlivých diagnostických informácií. Významný zisk diagnostickej informácie predstavuje určenie kritickej hodnoty z multikomponentu, nájdeného optimálnou lineárnou kombináciou jednotlivých premenných. Treba zdôrazniť, že predikcia diagnózy pomocou multikomponentu je jednoduchá a ľahko vykonateľná v praxi. Poslúži na to nasledujúca príkladová štúdia, v ktorej sa predpoveď pľúcnej malignity vykonáva pomocou prvého hlavného komponentu *PCI*.

### Príkladová štúdia

Technikou *PCA* (analýza hlavných komponentov) sme zistili rovnicu na výpočet *PCI* pomocou troch vyššie opísaných zvolených metód, a to *EXCEA*, *EXCYF* a *SCEA*. Premennú *SCYF* sme vynechali, pretože je najmenej informatívna (na základe ROC-kriviek, obr. 2). Pre testovací súbor 72 pacientov sa v *PCA* použité tri premenné lineárne kombinovali podľa rovnice získanej vo výstupe použitého softvéru (*STATGRAPHICS*):

$$PCI = 0,6667 EXCEA + 0,3060 EXCYF + 0,6797 SCEA \quad (8)$$

Z maxima krivky účinnosti pre *PCI*, t.j.  $E$  vs.  $PCI$ , sme vo výstupe použitého softvéru (*GraphROC for Windows*) zistili kritickú hodnotu  $-0,442$  na stupnici premennej *PCI*. Ide o bezrozmernú hodnotu, čo je zapríčinené štandardizáciou, opísanou ďalej. Na predpoveď diagnózy pacienta s ešte neurčenou diagnózou je potrebné vedieť uvedenú kritickú hodnotu a koeficienty v rov. (8). Naviac sú potrebné priemerné hodnoty *EXCEA*, *EXCYF* a *SCEA* v testovacom súbore 72 pacientov a príslušné smerodajné odchýlky, pretože v metóde *PCA* sa originálne dáta predspracúvajú štandardizáciou, t.j. od jednotlivých laboratórne zistených hodnôt  $x_i$  sa odčíta ich priemer  $\bar{x}$  a výsledok sa podelí smerodaj-

nou odchýlkou  $s_x$ . Hodnoty priemerov a smerodajných odchýlok sa ľahko získajú zo súboru nameraných údajov  $x_i$  v tabuľke MS EXCEL alebo v inom tabuľkovom procesore.

#### *Predpoveď diagnózy pre pacienta A*

Po štandardizácii nameraných laboratórnych hodnôt sa získali údaje pre pacienta A:

$$EXCEA = -0,388, EXCYF = -0,162, SCEA = -0,234.$$

Výpočtom podľa rov. (8) sa získala príslušná hodnota  $PCI = -0,467$ .

Keďže  $-0,467 < -0,442$ , diagnostický záver je: benígny.

#### *Predpoveď diagnózy pre pacienta B*

Po štandardizácii nameraných laboratórnych hodnôt sa získali údaje pre pacienta B:

$$EXCEA = 2,294, EXCYF = 0,033, SCEA = -0,273.$$

Výpočtom podľa rov. (8) sa získala príslušná hodnota  $PCI = 1,354$ .

Keďže  $1,354 > -0,442$ , diagnostický záver je: malígny.

Citlivosť, špecifickosť, účinnosť a ďalšie ukazovatele laboratórnych metód, ako aj ROC-krivky, možno vypočítať pomocou viacerých programových balíkov. Sú to hlavne softvéry: a) GraphROC for Windows 2.0 (cit.<sup>9,33</sup>), b) Analyse-it 1.61 (cit.<sup>21</sup>), c) CBstat 4.1.0 (cit.<sup>34</sup>), d) MedCalc 6.14 (cit.<sup>35</sup>), e) SYSTAT 9 (cit.<sup>36</sup>), f) NCSS 2000 (cit.<sup>37</sup>) a g) SAS 8.1 (cit.<sup>38</sup>). Z nich najbližšie k bezprostrednému uplatneniu pri riešení problémov klinickej diagnózy sú GraphROC, Analyse-it, CB-stat a MedCalc. Naproti tomu SYSTAT 9 rieši problémy tohto druhu veľmi všeobecne ako rozlíšenie samotného šumu od signálu so šumom, čo je potenciálne využiteľné na rozmanité aplikácie v analytickej chémii. Modul SIGNAL v SYSTATE umožňuje analyzovať dáta zatriedované do 2 až 11 kategórií, pričom sa používa buď binárna stupnica (pre 2 kategórie) alebo poradová stupnica. Kombinované použitie viacerých softvérových balíkov umožňuje vybrať numerické a grafické výstupy najvhodnejšie pre študovaný problém.

### Záver

Táto práca podáva stručný prehľad o základných ukazovateľoch výkonnosti laboratórnych metód, ako sú najmä citlivosť, špecifickosť a účinnosť. Podáva tiež základnú informáciu o voľbe hranice rozhodovania (kritickej hodnoty) a o ROC-krivkách a ich využití na diagnostické účely. Kriticky zostavený výber významných článkov a knižných prác, zaoberajúcich sa uvedenou problematikou, umožní doplniť požadované detaily podľa potreby. Uvádžajú sa tiež najdôležitejšie softvérové balíky, využiteľné na správnu a podrobnú interpretáciu výsledkov laboratórnych analytických a biochemických metód.

*Autori ďakujú Slovenskej grantovej agentúre za podporu grantu VEGA1/9129/02.*

### LITERATÚRA

1. Massart L. M., Vandeginste B. M. G., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J.: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Part A, kapitola 13 a 16. Elsevier, Amsterdam 1997.
2. AOAC (Association of Official Analytical Chemists): *Definitions and calculations proposed for method performance parameters, 6-12 March 1995*. The Referee.
3. Varmusová E., Mocák J., Balla B., Kavková D., Tudič I.: *5th Symposium with Int. Participation Labkvalita '01, Poprad, 4-6 June 2001*, str. 243. Slov. lek. spoloč., Bratislava 2001.
4. Balla B., Mocak J., Pivovarniková H., Balla J., Kavková D., Varmusová E.: *Clin. Chem. Lab. Sci.* 39, 285 (2001).
5. Kavková D., Varmusová E., Tudič I., Mocak J., Balla B., Berezová M.: *Eur. Respir. J.* 18, 397 (2001).
6. Balla B., Mocák J., Varmusová E.: *Laborat. Diagnostika* 6, 65 (2001).
7. Gerhardt W., Keller H.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1986, Suppl. 181, 1.
8. Galen R. S., Gambino S. R.: *Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnoses*. Wiley, New York 1975.
9. Kairisto V., Poola A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1995, Suppl. 222, 43.
10. Massart L. M., Vandeginste B. M. G., Deming S. N., Michotte Y., Kaufman L.: *Chemometrics: a Textbook*, kap. 7. Elsevier, Amsterdam 1988.
11. Mocák J., Bond A. M., Mitchell S., Scollary G.: *Pure Appl. Chem.* 69, 297 (1997); IUPAC document 550/35/87.
12. Meloun M., Militký J.: *Kompendium statistického zpracování experimentálních dat*. Academia, Praha 2002.
13. Currie L. A.: *Pure Appl. Chem.* 67, 1699 (1995).
14. ISO Standard 8466-1 (1994): *Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics, Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*.
15. Vessman J.: *Pure Appl. Chem.* 73, 1381 (2001), IUPAC Recommendations 2001.
16. Bairagi R., Suchindran C. M.: *Ind. J. Stat., Ser. B.* 51, 263 (1989).
17. Egan J. P.: *Signal Detection Theory and ROC Analysis*. Academic Press, New York 1975.
18. Lusted L. B.: *Science* 171, 1217 (1971).
19. McNeil B. J., Adelstein S. J.: *J. Nucl. Medicine* 17, 439 (1976).
20. Swets J. A.: *Signal Detection Theory and ROC Analysis in Psychology and Diagnostics: Collected Papers*. Lawrence Erlbaum, Mahwah 1995.
21. Analyse-it Software Ltd.: *Manuál k softvéru Analyse-it 1.61*, Leeds 1997–2000. <http://www.analyse-it.com>, staženo 11.12.2000.
22. Hanley J. A., McNeil B. J.: *Radiology* 439, 29 (1982).
23. Hays R. D.: *Appl. Psych. Meas.* 14, 208 (1990).
24. Hilden. J.: *Med. Decision Making* 11, 95 (1991).



25. Zweig M. H., Campbell G.: *Clin. Chem.* 39, 561 (1993).
26. Emir B., Wieand S., Jung S. H., Ying Z.: *Stat. Med.* 19, 511 (2000).
27. Hsiao J. K., Bartko J. J., Potter W. Z.: *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 664 (1989).
28. Begg C. B.: *Stat. Medicine* 10, 1887 (1991).
29. Champbell G.: *Stat. Medicine* 13, 499 (1994).
30. Centor R. M.: *Med. Decision Making* 11, 102 (1991).
31. Shultz E. K.: *Clin. Chem.* 41, 1248 (1995).
32. Zou K. H.: *Receiver Operating Characteristic (ROC) Literature Research*. <http://www.spl.harvard.edu:8000/pages/ppl/zou/roc.html>, staženo 10.9.2002.
33. Kairisto V., Poola A.: *Manuál k softvéru GraphROC for Windows 2.0.*, Turku – Tallinn 1994-96. <http://www.netti.fi/~maxiw>, staženo 28. 05. 2001.
34. Linnet K.: *Manuál k softvéru CBstat 4.1.0.* Risskov 2001. <http://www.cbstat.com>, staženo 8. 6. 2001.
35. Schoonjans F.: *Manuál k softvéru MedCalc 6.14.* Gent 2002. <http://www.medcalc.be>, staženo 10. 9. 2002.
36. SPSS: *Manuál k softvéru SYSTAT 9.* SPSS Science, Chicago 1998. <http://www.systat.com>, staženo 10. září 2002.
37. SAS: *SAS Software Release 8.2.* SAS Institute, Cary 2000. <http://www.sas.com>, staženo 8. 4. 2002.
38. NCSS: *Manuál k softvéru NCSS 2000.* NCSS Statistical Software, Kaysville 2000. <http://www.ncss.com>, staženo 20.7.2000.

**B. Balla<sup>1</sup>, J. Mocák<sup>1</sup>, E. Varmusová<sup>2</sup>, D. Kavková<sup>2</sup>, and I. Tudík<sup>2</sup>** (<sup>1</sup>*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*, <sup>2</sup>*Institute of Tuberculosis and Respiratory Diseases, Poprad - Kvetnica, Slovak Republic*):  
**Assessment of Outcome of Laboratory Methods**

Chemometrical processing of the results of laboratory methods create new possibilities for supporting decisions about appropriate diagnosis in laboratory medicine and clinical chemistry. Used approach, originally applied in medicine, has been recently transferred also into analytical chemistry. Qualitative characteristics of laboratory methods, like Sensitivity, Specificity or Efficiency are used for the selection of the appropriate decision limit, according to which all examined objects or subjects can be classified into chosen two categories (e.g. healthy and ill subjects). Assessment of performance of the compared laboratory methods is made by means of ROC-curves. Utilization of multivariate statistical methods, combining original variables in an optimal way, increases the diagnostic value of laboratory assays. Case study, based on the multicomponent calculation by Principal Component Analysis, shows how the linear combination of the analysed tumor markers increases their diagnostic value for the differential diagnostics of pleural malignancy.

## OPTIMALIZACE ANALYTICKÝCH POSTUPŮ POMOCÍ PLACKETTOVA-BURMANOVA PLÁNU

MIROSLAV HOLÍK

*Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno*  
holik@chemi.muni.cz

Došlo 8.11.02, přepracováno 22.5.03, přijato 5.6.03.

Klíčová slova: úplný faktorový plán, Plackettův-Burmanův plán, confounding, víceúrovňový plán

### Obsah

1. Úvod
2. Úplný faktorový plán
3. Neúplný faktorový plán
4. Plackettův-Burmanův plán
5. Fiktivní (dummy) proměnné
6. Confounding
7. Víceúrovňové plány

### 1. Úvod

V roce 1975 napsal S. N. Deming v *Science*<sup>1</sup>: „Recent awareness of the finite character of both material and energy resources has stimulated a renewed interest in the optimization of reaction yields“. A opravdu, v sedmdesátých a osmdesátých letech se objevila řada publikací a článků popisujících nejen optimalizaci syntéz, ale také nastavení měřicích zařízení. Také u nás se optimalizaci, hlavně v průmyslu, věnovala značná pozornost. Tak již v roce 1968 vydalo Státní nakladatelství technické literatury knihu Jiřího Likeše *Navrhování průmyslových experimentů*. Časopis *Chemický průmysl* přinášel občas příklady matematického modelování technologických podmínek průmyslové syntézy, např.<sup>2-4</sup>. Do laboratoří se u nás optimalizace dostala hlavně knihou, kterou spolu s K. Doerfflelem vydal vynikající český chemometrik Karel Eckschlagger<sup>5</sup>. Tato kniha je překladem práce obou autorů, která vyšla<sup>6</sup> v němčině v roce 1981. Již před tím se ale v *Chemických listech* objevil krátký článek „Optimalizace analytických postupů“ věnovaný prof. Čútovi k 80. narozeninám<sup>7</sup>. V současné době kromě úspory „materiálu a energie“ hraje důležitou roli při optimalizacích také čas. Proto se příliš nepoužívají klasické postupy<sup>8</sup>, ale důležitou úlohu převzaly tzv. neúplné faktorové plány, z nichž nejčastěji používaný je Plackettův-Burmanův plán<sup>9</sup>. Protože není originální literatura<sup>9</sup> snadno dostupná a v řadě publikací je tento plán uváděn jen velmi stručně, případně s nepřesnostmi a chy-

bami<sup>5,6,10-13</sup>, dovoluji si nabídnout českému čtenáři tento článek. Než se ale dostanu k Plackettovu-Burmanovu plánu, je třeba stručně vysvětlit, co je to úplný faktorový plán.

### 2. Úplný faktorový plán

Pro jednoduchost uvažujme, že výsledek pokusu mohou ovlivnit dvě proměnné veličiny. Při syntéze to mohou být např. teplota a polarita rozpouštědla, při nastavení přístroje rychlost průtoku plynu a otevření nebo zavření přidavného zařízení. Proměnná může být buď plynule měnitelná (teplota, průtok plynu) nebo binární (otevřeno – zavřeno, polární – nepolární). Při plánování takového pokusu převádíme všechny proměnné na binární,  $-1$  a  $+1$ : u plynule měnitelných proměnných volíme tedy jen dva stavy: nominální a extrémní. Počet úrovní proměnné veličiny je tedy  $L = 2$ . Pro teplotu může být nominálním stavem třeba teplota místnosti a stavem extrémním teplota varu použitého rozpouštědla, při průtoku plynu zvolíme podle své zkušenosti dvě vhodné hodnoty: nízký průtok – vysoký průtok. Při popisování plánu pak nižší hodnotě přiřadíme číslo  $-1$  a vyšší hodnotě číslo  $+1$ . Přiřazení čísel veličinám binárním je libovolné – polární rozpouštědlo může mít  $+1$  a nepolární  $-1$  nebo naopak. Pro uvedený příklad vyplývá, že provedeme čtyři pokusy, a to pro nižší a vyšší hodnotu jedné proměnné, zatímco druhá proměnná je na své nižší nebo vyšší hodnotě. Číselně lze tento plán zapsat takto:

1. proměnná	2. proměnná	výsledek
$-1$	$-1$	$y_1$
$-1$	$+1$	$y_2$
$+1$	$-1$	$y_3$
$+1$	$+1$	$y_4$

U každého pokusu zaznamenáme výsledek ( $y_1$  až  $y_4$ ); podle povahy pokusu to může být výtěžek produktu, jeho čistota, nebo účinnost přístroje, jeho citlivost nebo dělicí (rozlišovací) schopnost. K tomu, abychom odhadli, která proměnná ovlivní výsledek a jak mnoho, použijeme lineární regresi: proměnná  $Y$  (výsledek) závisí na nezávisle proměnné  $X$  a citlivost této závislosti udávají hodnoty směrnice (parametrů)  $A$ . Matici  $X$  sestavíme ze sloupců plánu pro první a druhou proměnnou (tj. základní matice  $Z$ ) a předřadíme jim sloupec jedniček pro výpočet tzv. lokačního parametru (úsek na ose  $y$ ). Naměřené výsledky jsou  $Y$ , výsledky vypočtené z lineární regrese se označují  $\hat{Y}$ :

$$Y = X * A + E \quad \hat{Y} = X * A \quad (1)$$

kde

$$Y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ y_4 \end{bmatrix} \quad X = \begin{bmatrix} 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

a  $\mathbf{E}$  je vektor náhodných chyb. Žádané parametry  $\mathbf{A}$  získáme převedením matice  $\mathbf{X}$  z jedné strany rovnice  $I$  na druhou tzv. pseudoinverzí.

$$\mathbf{A} = (\mathbf{X}' * \mathbf{X})^{-1} * \mathbf{X}' * \mathbf{Y} \quad (2)$$

Protože jsou sloupce matice  $\mathbf{X}$  ortogonální, je výsledkem násobení matic  $\mathbf{X}'$  a  $\mathbf{X}$  matice diagonální.

$$\mathbf{X}' * \mathbf{X} = \begin{bmatrix} 4 & 0 & 0 \\ 0 & 4 & 0 \\ 0 & 0 & 4 \end{bmatrix} \quad (\mathbf{X}' * \mathbf{X})^{-1} = \begin{bmatrix} 1/4 & 0 & 0 \\ 0 & 1/4 & 0 \\ 0 & 0 & 1/4 \end{bmatrix}$$

Ortogonalita vede k výraznému zjednodušení výpočtu parametrů  $\mathbf{A}$ . Rovnici (2) můžeme nahradit rovnicí (3).

$$\mathbf{A} = (1/m) * \mathbf{X}' * \mathbf{Y} \quad (3)$$

kde  $m$  je počet řádků matice  $\mathbf{X}$ , tj. počet experimentů. Výpočet je pak velmi jednoduchý – do transponované matice  $\mathbf{X}$  dosadíme místo jedniček odpovídající hodnoty výsledků  $y$ ; je to vlastně násobení matice  $\mathbf{X}'$  sloupcovým vektorem  $\mathbf{Y}$ . Potom čísla v řádcích sečteme a výsledek vydělíme počtem experimentů  $m = 4$ .

$$\mathbf{X}' * \mathbf{Y} = \begin{bmatrix} +y_1 & +y_2 & +y_3 & +y_4 \\ -y_1 & -y_2 & +y_3 & +y_4 \\ -y_1 & +y_2 & -y_3 & +y_4 \end{bmatrix} \begin{matrix} \text{suma} / 4 = a_0 \\ \text{suma} / 4 = a_1 \\ \text{suma} / 4 = a_2 \end{matrix}$$

Jak je patrné,  $a_0$  je součet všech výsledků  $y$ ,  $a_1$  a  $a_2$  pak představují směrnice (citlivosti) závislosti výsledků na proměnných 1 a 2.

Pozor! V literatuře<sup>5,6,9-13</sup> se často setkáváme s odlišným postupem v tom, že se parametry  $a_1$  a  $a_2$  vypočítávají jako rozdíly průměrů kladných a záporných hodnot  $y$ . Tedy pro výpočet např.  $a_1$  se bere  $(y_3+y_4)/2 - (y_1+y_2)/2$ . Je zřejmé, že takto vypočítané hodnoty  $a_1$  a  $a_2$  jsou dvojnásobné vzhledem k těm, které získáme lineární regresí a nejsou konzistentní s výpočtem parametru  $a_0 = (y_1 + y_2 + y_3 + y_4)/4$ .

Někdy se používají místo binárních proměnných  $-1$  a  $+1$  proměnné  $0$  a  $1$ . Pochopitelně je to možné a lineární regrese poskytne stejné směrnice jako při použití  $-1$  a  $+1$ . Protože však v tomto případě není matice  $\mathbf{X}' * \mathbf{X}$  diagonální, nelze použít zjednodušenou rovnici (3), ale je třeba počítat s pseudoinverzí (rovnice 2). Lokační člen není v tomto uspořádání průměrem všech výsledků, ale odpovídá výsledku měření při nastavení všech proměnných na nominální hodnoty.

Počet experimentů  $m$ , a tedy i velikost matice  $\mathbf{X}$ , roste s počtem proměnných  $n$  podle  $2^n$ .

Pro jednu proměnnou máme jen dva stavy – nižší a vyšší. Při dvou proměnných se dva stavy druhé proměnné přidávají ke dvěma stavům proměnné první, tak jak bylo ukázáno výše. Tři proměnné ( $A$ ,  $B$ ,  $C$ ) pak vyžadují  $2^3$ , tj. 8 experimentů. Tzv. úplný faktorový plán pro tento případ je v následující tabulce I.

Tabulka I  
Úplný faktorový plán pro tři proměnné

	1	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
	1	1	1	1	1	1	1	1

Základní matici  $\mathbf{Z}$  zde představují sloupce  $A$ ,  $B$  a  $C$ . Hodnoty v řádcích nám říkají, jak se mají provést jednotlivé experimenty, např. v prvním experimentu se použijí u všech proměnných nominální hodnoty. V každém sloupci základní matice je stejný počet kladných a záporných znamének. To může sloužit jako kontrola správnosti sestavení plánu.

Další sloupce v tabulce dostaneme vynásobením sloupců základní matice tak, jak je uvedeno v záhlaví tabulky I. Tyto čtyři poslední sloupce představují vzájemné ovlivnění jednotlivých proměnných. Řešení podle tohoto plánu si ukážeme na příkladě z literatury<sup>8</sup>. Matici  $\mathbf{X}$  tvoří čísla  $(-1$  a  $+1)$  z uvedené tabulky I. Sloupcový vektor  $\mathbf{Y}$  jsou výsledky experimentů (observations):

	11,8	$a(I)$	=	13,71
	9,9	$a(A)$	=	-0,64
	8,5	$a(B)$	=	-1,51
	20,9	$a(C)$	=	4,14
$\mathbf{X}' * \mathbf{Y} = \mathbf{X}' * \mathbf{Y}$	8,1	$a(AB)$	=	0,49
	18,3	$a(AC)$	=	-0,06
	16,2	$a(BC)$	=	-0,24
	16,0	$a(ABC)$	=	0,11

Kontrolu správnosti výpočtu lze provést takto: výsledky experimentů se umocní na druhou a zprůměrují:  $\Sigma (y^2) / 8 = 208,1562$ . Stejně číslo se musí dostat součtem druhých mocnin vypočítaných parametrů:  $\Sigma (a^2) = 208,1562$ .

Hodnoty parametrů u součinných proměnných jsou relativně malé, což napovídá, že se proměnné  $A$ ,  $B$  a  $C$  vzájemně neovlivňují. V takových případech je vhodné celý plán zjednodušit a snížit tak počet potřebných experimentů.

### 3. Neúplný faktorový plán

Při úplném faktorovém plánu se počet experimentů s každou další proměnnou zdvojnásobí. To může někdy vést až k ekonomicky a časově neuskutečnitelnému případu. Například při optimalizaci postupu pro silanizaci silikagelu pro kapalinovou chromatografii museli autoři posoudit významnost 23 proměnných<sup>10</sup>. V případě, že by jeden experiment trval jen 10 minut, bylo by třeba k provedení úplného faktorového plánu asi 160 roků nepřetržité práce. V takových náročných případech zanedbáváme možnost vzájem-

ného ovlivňování proměnných a uchylujeme se k neúplnému faktorovému plánu. Takových plánů existuje celá řada a lze je najít v literatuře<sup>8</sup>. Mezi nimi významné místo zaujímá tzv. Plackettův-Burmanův plán<sup>9</sup> a tomuto plánu je věnován další výklad.

#### 4. Plackettův-Burmanův plán

Vraťme se k tabulce I pro úplný faktorový plán se třemi proměnnými. Omezme ji jen na čtyři první sloupce a vyberme řádky 4, 6, 7 a 1. Dostaneme tabulku II.

Tabulka II  
Plackettův-Burmanův plán pro 3 proměnné

Řádek	I	A	B	C
4	1	1	1	-1
6	1	1	-1	1
7	1	-1	1	1
1	1	-1	-1	-1

Jestliže u prvního řádku základní matice  $Z$  (tj. sloupce A, B a C v tabulce II) provedeme cyklickou záměnu, tj. první prvek vyjmeme a vložíme za poslední, dostaneme řádek 2. Při další cyklické záměně dostaneme řádek 3; tím cyklické záměny končí (při další bychom dostali zase řádek 1). Poslední řádek vytvoříme ze samých -1. To je podstata Plackettova-Burmanova plánu pro počet úrovní  $L = 2$ , u kterého platí:

1. pro  $n$  proměnných budeme mít jen  $n+1 = m$  experimentů,
2. přitom musí být  $n + 1$  dělitelné 4, pokud není, přidá se k reálným proměnným potřebný počet fiktivních (dummy) proměnných,
3. pomocí cyklické záměny prvního řádku definovaného autory<sup>9</sup> (viz tab. III) se vytvoří základní matice  $Z$ , kde poslední řádek je tvořen samými -1.

Tabulka III  
Základní vektory Plackettova-Burmanova plánu

$m$	První řádek Plackettova-Burmanova plánu										
8	1	1	1	-1	1	-1	-1				
12	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1
20	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1
24	1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1

4. provede se  $m$  experimentů, při nichž se použijí proměnné v jejich nominální nebo extrémní hodnotě podle znamének u jedniček v jednotlivých řádcích,
5. před výpočtem citlivostí výsledků na jednotlivých proměnných se k základní matici  $Z$  předřadí vektor jedni-

ček a citlivosti ( $A$ ) se vypočítají jako směrnice z lineární regrese pomocí rovnice (2),

6. protože jsou sloupce základní matice  $Z$  ortogonální, lze použít i v této regresi zjednodušenou rovnici (3).

Příklad se třemi proměnnými, který byl vyřešen pomocí úplného plánu, bude nyní vypadat takto:

$$Z = \begin{bmatrix} 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix} \quad X = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & -1 \end{bmatrix}$$

$$X' = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 \\ -1 & 1 & 1 & -1 \end{bmatrix}$$

$$\begin{array}{r} +8,1 \\ +8,1 \\ +8,1 \\ -8,1 \end{array} \begin{array}{r} +18,3 \\ +18,3 \\ -18,3 \\ +18,3 \end{array} \begin{array}{r} +16,2 \\ -16,2 \\ +16,2 \\ +16,2 \end{array} \begin{array}{r} +11,8 \\ -11,8 \\ -11,8 \\ -11,8 \end{array} \begin{array}{r} +54,4/4 = +13,60 \\ -1,6/4 = -0,40 \\ -5,8/4 = -1,45 \\ +14,6/4 = +3,65 \end{array}$$

Parametry vypočtené podle úplného plánu (13,71; -0,64; -1,51 a 4,14) se mírně liší od hodnot získaných pomocí neúplného faktorového plánu Plackettova-Burmanova. V každém jednotlivém případě je proto třeba se rozhodnout, zda dát přednost úspoře času a materiálu na úkor přesnosti v získaných parametrech (citlivostech na proměnné).

#### 5. Fiktivní (dummy) proměnné

Zatím jsme se zabývali výpočty parametrů, ale nezjistili jsme nic o jejich přesnosti a statistické významnosti. Plackettův-Burmanův plán umožňuje i tato zjištění. Dosáhne se toho zavedením tzv. fiktivních proměnných (známých pod anglickým označením dummy). Tyto fiktivní proměnné umožňují prove-

dení více experimentů s různou kombinací nastavení reálných proměnných a doplňují reálné proměnné na počet potřebný pro sestavení Plackettova-Burmanova plánu. Tím, že fiktivní proměnné neovlivňují nijak průběh experimentu, měly by mít odpovídající parametry nulové. Odchylka vypočtených parametrů

od nuly umožňuje vytvořit si představu o přesnosti parametrů pro reálné proměnné.

Vraťme se k našemu příkladu s proměnnými  $A$ ,  $B$  a  $C$ . Místo plánu s  $m = 4$ , použijeme plán s  $m = 8$  a čtyři chybějící proměnné ( $d_1 - d_4$ ) budeme považovat za fiktivní. Matice  $\mathbf{X}$ , sestavená podle Plackettova-Burmanova plánu pro 8 experimentů, je v levé části tabulky IV.

Tabulka IV  
Plackettův-Burmanův návrh matice  $\mathbf{X}$  spolu s vektorem  $\mathbf{y}$

l	A	B	C	$d_1$	$d_2$	$d_3$	$d_4$	y
1	1	1	1	-1	1	-1	1	16,0
1	1	1	-1	1	-1	1	1	8,1
1	1	-1	1	-1	-1	1	1	18,3
1	1	1	1	1	1	1	1	8,5
1	1	-1	-1	1	1	1	-1	9,9
1	-1	-1	1	1	1	-1	1	20,9
1	-1	1	1	1	1	1	-1	16,2
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	11,8

Experimentální uspořádání se řídí opět jen sloupci reálných proměnných  $A$ ,  $B$  a  $C$ , tak jako u úplného faktorového plánu. V prvním experimentu budou všechny tři proměnné na své extrémní úrovni, v posledním, osmém experimentu budou proměnné v nominálním stavu.

Pokud se soustředíme na nastavení těchto proměnných  $A$ ,  $B$  a  $C$ , můžeme jednotlivým experimentům přiřadit výsledky y uvedené výše u úplného plánu. Následující tabulka V uvádí srovnání výsledků výpočtu parametrů podle Plackettova-Burmanova plánu a podle úplného faktorového plánu.

Tabulka V  
Parametry vypočtené podle neúplného Plackettova-Burmanova a podle úplného plánu

Neúplný plán			Úplný plán	
parametr	a	$ a /s_a$	parametr	a
$a(l)$	13,7125	49,21	$a(l)$	13,7125
$a(A)$	-0,6375	2,29	$a(A)$	-0,6375
$a(B)$	-1,5125	5,43	$a(B)$	-1,5125
$a(C)$	4,1375	14,85	$a(C)$	4,1375
$a(d_1)$	0,0625	0,22	$a(AB)$	0,4875
$a(d_2)$	0,1125	0,40	$a(AC)$	-0,0625
$a(d_3)$	-0,4875	1,75	$a(BC)$	-0,2375
$a(d_4)$	0,2375	0,85	$a(ABC)$	0,1125

První čtyři parametry (tj. lokační a pro proměnné  $A$ ,  $B$  a  $C$ ) jsou v obou případech stejné; to je pochopitelné, pro-

tože pro tyto parametry jsou v obou plánech stejné kombinace nominálních a extrémních hodnot proměnných.

Všimněme si však parametrů, odpovídajících fiktivním proměnným. Pokud by měření v experimentech byla bez chyb, byly by tyto parametry nulové. Skutečně naměřené hodnoty můžeme tedy použít k odhadu rozptylu  $s_a^2$  podle rovnice (4).

$$s_a^2 = \sum (a(d) - 0)^2 / p \quad (4)$$

kde  $p$  je počet fiktivních proměnných (v našem případě = 4) a 0 představuje očekávanou hodnotu parametru  $a(d)$ .

Odmocninou rozptylu  $s_a^2$  je odhad standardní odchylky  $s_a$ . Když touto hodnotou vydělíme jednotlivé parametry (v absolutní hodnotě), dostaneme hodnoty testu  $t$ , které srovnáme s kritickou hodnotou  $t(\text{krit})$  Studentova rozdělení pro  $p$  stupňů volnosti na 95% nebo 90% hladině spolehlivosti. Výběr z kritických hodnot je v tabulce VI.

Tabulka VI  
Výběr z kritických hodnot Studentova rozdělení

p	1	2	3	4	5	6	7
$t(\text{krit})$ 95%	12,706	4,303	3,182	2,776	2,571	2,447	2,365
$t(\text{krit})$ 90%	6,314	2,920	2,353	2,132	2,015	1,943	1,895

V našem případě je počet fiktivních proměnných a tedy i počet stupňů volnosti 4. To znamená, že všechny proměnné, u nichž je  $|a|/s_a$  větší než 2,776, jsou statisticky významné z 95 % a ty, u nichž je tento poměr větší než 2,132, jsou významné na 90% úrovni.

Pozor! Někdy se v literatuře<sup>6</sup> setkáme s jinou rovnicí pro výpočet rozptylu, podobnou rovnici (4). Místo nuly je v čitateli průměrná hodnota  $a(d)$  parametrů a ve jmenovateli je  $p - 1$ . Tento způsob není správný, protože očekávaná hodnota parametrů u fiktivních proměnných je nula a pokud se nepracuje s průměrem, je správné použít ve jmenovateli počet všech použitých parametrů  $p$ .

V našem případě je

$$s_a^2 = \sum ((0,0625)^2 + (0,1125)^2 + (-0,4875)^2 + (0,2375)^2) / 4$$

a standardní odchylka  $s_a = 0,279$ . Z toho plyne, že všechny tři proměnné  $A$ ,  $B$  a  $C$  jsou statisticky významné;  $B$  a  $C$  na 95% a  $A$  na 90% hladině spolehlivosti. Všechny čtyři fiktivní proměnné ( $d_1 - d_4$ ) jsou statisticky nevýznamné. Tento druhý fakt je důležité zjištění. Všimněme si, že stejné hodnoty, které jsme použili pro výpočet standardní odchylky, představují v úplném plánu vzájemné ovlivnění jednotlivých proměnných. Kdyby k takovému ovlivnění docházelo, vyšel by pro odpovídající parametr test  $t$  jako významný.

Pro posouzení kvality uvedené regrese nelze použít korelační koeficient. Když dosadíme  $\mathbf{A}$  z rovnice (2) do rovnice (1), dostaneme rovnici pro přepočtené výsledky  $\mathbf{Y}$  na výsledky vypočítané z regrese  $\hat{\mathbf{Y}}$  pomocí tzv. „hat“ matice  $\mathbf{H}$ , rovnice (5).

$$\hat{Y} = X*(X'*X)^{-1}*X'*Y = H*Y \quad (5)$$

Protože je matice  $H$  v tomto případě jednotková, je  $\hat{Y} = Y$  a korelační koeficient, který charakterizuje podobnost obou vektorů  $\hat{Y}$  a  $Y$  je vždy roven jedné.

## 6. Confounding

Confounding je termín, který je snad lepší nepřekládat. Žádný český ekvivalent totiž nepopisuje odpovídající jev srozumitelně (confound = smíchat, poplést, zahanbiti).

Nejblíže skutečnému významu je anglický výklad: confound = mistake for another, čili omylem považovat za něco jiného. Co se tedy může omylem považovat za něco jiného?

Všimněme si sloupců pět až osm v Plackettově-Burmanově matici  $X$  (tabulka IV). Označíme-li každý ze sloupců této matice jako vektor s číslem, tedy  $v_1$  pro první sloupec, atd., můžeme psát:

$$v_5 = (-1) \cdot v_2 \cdot v_4, \quad v_7 = (-1) \cdot v_2 \cdot v_3, \quad v_8 = (-1) \cdot v_3 \cdot v_4$$

ale také

$$v_6 = v_2 \cdot v_3 \cdot v_4$$

To znamená, že významná hodnota parametrů pro vektory  $v_5$ – $v_8$  může být způsobena interakcí proměnných tvořících základní matici (vektory  $v_2$ – $v_4$ ). Pozor! Není to ale přesně to, co pozorujeme v úplném faktorovém plánu. Totiž, vznikne-li confounding vynásobením dvou vektorů, násobí se tento součin ještě  $-1$ . V případě confoundingu ze tří vektorů je tento násobitel  $+1$ . I když vzájemné ovlivnění čtyř a více proměnných je většinou málo pravděpodobné, dá se vypočítat, že střídání násobitelů  $-1$  a  $+1$  je pravidelné:  $-1$  pro sudý počet vektorů,  $+1$  pro lichý. U úplného faktorového plánu s  $m = 8$  platilo:

$$v_5 = v_2 \cdot v_3, \quad v_6 = v_2 \cdot v_4, \quad v_7 = v_3 \cdot v_4 \quad \text{a} \quad v_8 = v_2 \cdot v_3 \cdot v_4$$

a šlo o výsledek vzájemného ovlivnění proměnných. Tady nemohlo jít o mylné přiřazení, protože takto byly sloupce matice  $X$  konstruovány úmyslně. Při sestavování Plackettovy-Burmanovy matice se vzájemným ovlivňováním proměnných nepočítáme, ale pokud tam je, projeví se jako confounding. Toto srovnání úplného plánu a plánu Plackettova-Burmanova napovídá, že confounding bude existovat pro takový počet experimentů  $m$ , pro který lze sestavit úplný faktorový plán, tj. obecně pro  $m = 2^k$ , kde  $k = 2, 3, 4, 5, \dots$ . Protože se Plackettův-Burmanův plán dá sestavit pro  $m = 4k$ , kde  $k = 1, 2, 3, \dots$ , snadno zjistíme, že existují Plackettovy-Burmanovy plány, u nichž není confounding přítomen. Jsou to plány pro  $m = 12, 20, 24$  atd. Proto se doporučuje, máme-li 7 a méně proměnných, nepoužívat nejblíže možný plán, tj. pro  $m = 8$ , ale raději přidat více fiktivních proměnných a pracovat podle plánu pro  $m = 12$ .

## 7. Víceúrovňové plány

Plackett a Burman popsali<sup>9</sup> velmi stručně i plány pro případ, kdy nechceme mít experimenty jen na dvou úrovních

( $L = 2$ ), ale na třech, pěti a sedmi. V praxi se tento přístup prakticky nepoužívá. Je to proto, že se velmi zvyšuje počet potřebných experimentů; ten musí být totiž dělitelný  $L^2$ . Přitom počet proměnných je omezen počtem možných cyklických záměn základních sloupců (nikoliv řádků jako u  $L = 2$ ), který je  $(L^2-1)/(L-1)-1$ . Pro  $L = 3$  je tento počet 3, tj. celkový počet sloupců základní matice a tedy i proměnných je 4. V následující tabulce VII je základní Plackettův-Burmanův sloupec<sup>9</sup> uveden tučně; v posledním experimentu jsou opět všechny proměnné v nominální hodnotě (tj. 0).

Tabulka VII  
Plackettův-Burmanův plán pro  $L = 3$

Experiment	Proměnná			
	<i>m</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
1	<b>0</b>	1	2	2
2	<b>1</b>	2	2	0
3	<b>2</b>	2	0	2
4	<b>2</b>	0	2	1
5	<b>0</b>	2	1	1
6	<b>2</b>	1	1	0
7	<b>1</b>	1	0	1
8	<b>1</b>	0	1	2
9	<b>0</b>	0	0	0

Z hlediska správnosti výpočtu směrnice pro jednotlivé proměnné  $A, B, C$  a  $D$  je opět jedno, zda se jako úrovně proměnných použijí 0, 1 a 2 nebo  $-1, 0$  a  $+1$ . Pouze druhý způsob však poskytne též správnou hodnotu lokačního parametru jako průměr všech hodnot výsledků  $y$ . V osmdesátých letech se snažil K. Jones<sup>14,15</sup> využít tento plán k zpřesnění výsledků při optimalizaci silanizace chromatografických materiálů. Bohužel nepostřehl, že tentokrát jde v Plackettově-Burmanově plánu o cyklickou záměnu sloupců a ne řádků. Pro matici  $9 \times 8$ , kterou dostal analogicky jako pro dvouúrovňový plán, se pak potýkal s vysvětlením opakovaných hodnot směrnice, navíc poněkud divně počítaných. Vyvážený tříúrovňový plán publikovali Massart a spol.<sup>16</sup>

Domnívám se, že nemá smysl snažit se zpřesňovat směrnice získané pomocí dvouúrovňového plánu. Ten slouží především k tomu, abychom si z velkého množství podezřelých proměnných vybrali ty, které skutečně významně ovlivňují studovaný proces. Zpřesnění, případně dokončení optimalizace navrhovaného postupu, je pak třeba provést jinou metodou, jako je třeba vícerozměrná regrese nebo během optimalizace simplexovou metodou<sup>17</sup>.

## LITERATURA

1. Dean W. K., Heald J., Deming S. N.: *Science* 189, 805 (1975).

2. Vanko I., Komora L., Sakáloš Š.: Chem. Prum. 39/64, 245 (1989).
3. Vanko I., Komora L., Sakáloš Š.: Chem. Prum. 40/65, 175 (1990).
4. Polakovič M., Štefuca V., Báleš V., Michalková E., Welward L.: Chem. Prum. 40/65, 184 (1990).
5. Doerffel K., Eckschlager K.: *Optimální postup chemické analýzy*. SNTL, Praha 1985.
6. Doerffel K., Eckschlager K.: *Optimale Strategien in der Analytik*. VEB Deutscher Verlag fuer Grundstoffindustrie, Leipzig 1981.
7. Suchánek M., Šůcha L., Urner Z.: Chem. Listy 72, 1037 (1978).
8. Bennett C. A., Franklin H. L.: *Statistical Analysis in Chemistry and the Chemical Industry*. Wiley, New York 1954.
9. Plackett R. L., Burman J. P.: Biometrika 33, 305 (1946).
10. Jones K.: J. Chromatogr. 392, 1 (1987).
11. Stowe R. A., Mayer R. P.: Ind. Eng. Chem. 58, 36 (1966).
12. Abel M.: Trends Anal. Chem. 3, VII (1984).
13. Vindevogel J., Sandra P.: Anal. Chem. 63, 1530 (1991).
14. Jones K.: Int. Lab., 16, 32 (1986).
15. Jones K.: J. Chromatogr. 392, 11 (1987).
16. Van der Hayden Y., Khots M.S., Massart D.L.: Anal. Chim. Acta 276, 189 (1993).
17. Routh M. W., Swartz P. A., Denton M. B.: Anal. Chem. 49, 1422 (1977).

**M. Holík** (*Department of Theoretical and Physical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*):  
**Optimization of Analytical Procedures with Plackett-Burman Design**

Reduced factorial design invented by Plackett and Burman in 1946, which reduces the number of experiments necessary for the determination of important variables in regression, is compared with the corresponding full factorial design. The calculation procedure is explained in detail using published data; some errors in literature are pointed out. Problems with confounding and how to avoid them are presented.

## HANS HELLMANN: ŽIVOTNÍ PŘÍBĚH VĚDCE VE 20. STOLETÍ\*

**RUDOLF ZAHRADNÍK**

*Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8  
Rudolf.Zahradnik@jh-inst.cas.cz*

Došlo 20.8.03, přepracováno 25.8.03.

Věnováno prof. Helmutu Schwarzovi (Berlín), velmistru chemie, k jeho šedesátému narozeninám.

V nedávno skončeném století se udál bezpočet dobrých a povzbudivých příběhů, ale též hrozivé množství příběhů, jež představují monokrystaly hrůzy. Příběh Hellmannův patří do druhé kategorie: fenomenální učenec byl zavražděn ve svých 35 letech v rámci čehosi, co lze nazvat neformální spoluprací nacismu a komunismu.

Pro přehlednost je toto sdělení rozděleno do tří částí. Nejprve zmíním *Curriculum vitae* skutečného a velkého pionýra kvantové chemie. Potom v obrysu popíši ty jeho badatelské výsledky, jichž si nejvíce cením. A konečně příběh fenomenálnosti a tragedie začleněním do sevřeného obrázku o osudu lidstva ve 20. století.

Nedávno, 14. října 2003, si kvantověchemická komunita připomínala sté výročí jeho narození; narodil se v německém Wilhelmshavenu v rodině vojáka z povolání. Středoškolské vzdělání ukončil maturitou na gymnáziu v r. 1922 a pak následovalo sedm let studia fyziky; diplomu dosáhl v r. 1927 a doktorátu v r. 1929. Počátkem téhož roku se v rodině svého učitele seznámil s půvabnou dívkou, Ukrajinou Viktorií Bernsteinovou, jež pocházela ze židovské rodiny. Záhy nato následoval sňatek a koncem téhož roku se manželé stali rodiči chlapce, kterému dali jméno Hans. Hellmann i jeho učitel byli na tom stejně, pokud šlo o původ jejich manželek: pro oba to mělo po nástupu nacistů k moci zlé následky a Hellmanna to dokonce stálo život.

Po nástupu nacistů bylo Hellmannovi zřejmé, že s rodinou zůstat v Německu nelze. Manželé uvažovali o více možnostech emigrace, ale posléze zvítězilo přání paní Hellmannové vrátit se na Ukrajinu. Sovětské autority řekly ano, ale Ukrajinu zamítly. Alternativa, kterou nabídly, nebyla špatná: pozice vedoucího teoretické skupiny a profesora Karpovova ústavu v Moskvě. Mimořádné kvality Hellmannovy byly v odborném světě dobře známy. Nedlouho po emigraci, v r. 1934, byla tato nabídka realizována. Hellmann se dal do práce s ohromným nasazením a horlivě publikoval v Moskvě i v zahraničí. Cítil se dobře a v červnu r. 1936 dostal sovětské občanství. Učenci, přesněji řečeno vybraní učenci, se v Moskvě těšili vážností a přízni, a tak život Hellmannových nebyl špatný. Na sklonku r. 1937 si

všiml, že atmosféra prostředí, kde už několik let žil a pracoval, se podivně změnila. Nepříznivá atmosféra se prohlubovala a v březnu 1938 hrozivá historka zaznamenala prvou kulminaci: Hans Hellmann byl zatčen. Když mu bylo 34 let 7 měsíců a 15 dní, dne 29. května 1938, byl NKVD zavražděn. Když si šla vdova za dva týdny do ústavu pro poslední plat, nedostala ho. Zato si na „stěngazetě“ přečetla denunciaci o svém muži; zpráva byla podepsána dvěma Hellmannovými kolegy, Dr. Zhukhovitským a Dr. Tjomkinem, kteří byli pokládáni za jeho udavače. Prvz z nich byl sekretářem stranické organizace v ústavu. Vdova s devítiletým synem byla záhy vystěhována z bytu a zanedlouho zatčena. Hans Hellmann, Jr. se setkal se svou matkou za 15 let. To bylo v době, kdy už byl vystudovaným elektroinženýrem. Jeho žádostem o vystěhování s rodinou vyhověly úřady teprve jako dvašedesátiletému v r. 1991.

Hellmann byl učenec skutečně nevšední: byl nejen vynikajícím teoretickým fyzikem, ale též velice zdatným experimentátorem a navíc přírodovědcem s hlubokým porozuměním chemii. Zbývá dodat, že byl učenecem, který měl jedinečnou způsobilost vystihnout témata, jež budou hrát za pár let či desetiletí klíčovou roli v rozvoji teorie v chemii. To vše bych chtěl doložit pomocí výběru Hellmannových objevů a děl, které, po složení v koláž, by byly působivou dekorací pro (virtuální) síň slávy. Nepůjde o pouhé vyjmenování objevů, jež (jistě nejen já) pokládám za díla klíčové důležitosti, ale též o uvedení, k čemu dnes slouží a kdo přispěl významně k jejich využívání.

Domnívám se, že kdyby Hellmann žil ve šťastnější době, byl by vynikajícím kandidátem na Nobelovu cenu. Ve skutečnosti mě udivuje, že jeho dílo je zmíněno snad jen ve 40 % učebnic kvantové chemie. Samozřejmě v zemi, která mu poskytla azyl a pak ho připravila o život, neměla oficiální místa zájem připomínat jeho dílo. A v jeho rodné zemi začali usilovat o nápravu teprve v 90. letech, o čemž se krátce zmíním v závěru tohoto článku.

Onu zmíněnou virtuální koláž vytvořím ze šestice výrazných výsledků; prvz z nich nese v označení jeho jméno. Jde o Hellmannův-Feynmanův teorém. Přispěl k tomu, že aplikovaná kvantová chemie prodělala v 70. letech ohromnou proměnu. Dnes je už obecně známo, že ze Schrödingery rovnic plyne předpis pro výpočet celkové energie,  $E$ , systému popsaneho vlnovou funkcí  $\Psi$  a hamiltoniánem  $H$ :

$$E = \langle \Psi | H | \Psi \rangle \quad (1)$$

Tento výraz dovoľoval už ve 30. letech pomocí trpělivého měnění vazebných délek a úhlů dospět u dvou- a tříatomových molekul ke struktuře, jež odpovídala minimu energie. Avšak nutno dodat, že pátrání po optimální struktuře u pouhé čtyřatomové molekuly je velice pracné a u větších molekul prakticky neproveditelné. A tak celá oblast

\* Zkrácená verze přednášky proslouvená na Hellmannově workshopu v rámci 11. Mezinárodního kongresu kvantové chemie v Bonnu, dne 26.7.2003.



studia hyperploch potenciální energie stagnovala. Ke dramatické změně došlo až v 70. letech, kdy se pro optimalizaci geometrie molekul začalo používat vedle výpočtu energie také výpočtu gradientů energie<sup>1-3</sup>, tedy derivací celkové energie podle vnitřních souřadnic molekuly  $x_i$ . Hellmann ukázal, že platí<sup>4</sup>

$$\frac{\partial E}{\partial x_i} = \left\langle \psi \left| \frac{\partial H}{\partial x_i} \right| \psi \right\rangle \quad (2)$$

což znamená, že hodnoty změny energie se změnou (zvětšením či zmenšením) souřadnice vypočítáme ze Schrödingerovy rovnice, v níž hamiltonián je nahrazen jeho derivací podle souřadnice. Optimalizace geometrie molekul pomocí energie a gradientu energie způsobila – spolu s kvalitními počítačovými programy – ohromný rozmach teorie v chemii. Ve většině laboratoří se kvantová chemie stala neodmyslitelnou složkou experimentální práce. Sluší se ještě poznamenat, že derivace energie podle souřadnice má srozumitelný fyzikální význam. Udává totiž velikost a směr síly, jež působí na jádra jednotlivých atomů v molekule, a tudíž představuje pokyn, o kolik a v jakém směru změnit polohu toho kterého jádra, abychom se přiblížili k optimální struktuře, tedy k té, jíž přísluší nejnižší energie. Rozumí se samo sebou, že v této struktuře jsou všechny dílčí hodnoty gradientu energie rovny nule.

Další políčko v naší koláži je spjato s tím, co se dnes nejčastěji nazývá pseudopotenciál. Název to není nejpodarenější, idea je to však velice užitečná. Mnoho pokusných i teoretických studií je spjato se systémy, obsahujícími atomy 1. a 2. řady periodického systému. Přejít k teoretickému popisu těžších atomů je svízelný proto, že s rostoucím počtem elektronů se stává výpočet na kvalitní úrovni pro velký rozsah nevládnutelný i v případě velmi výkonného počítače. Hellmann navrhl už v r. 1934, jak překonat tuto svízeľ<sup>5</sup>. Doporučil uvažovat ve výpočtu explicitě pouze elektrony vnější slupky, tedy elektrony valenční. Elektrony vnitřních slupek (kterých je u těžších atomů velká většina), zvané též elektrony „core“, vytvářejí spolu s jádrem atomu útvar, který se zpracovává jako celek. Tento postup umožňuje kvalitní popis systémů obsahujících těžké atomy. Sluší se dodat, že tutéž ideu popsal téměř současně Gombas<sup>6</sup>. V minulých desetiletích byly navrženy pseudopotenciály pro všechny těžké atomy, pseudopotenciály, které berou náležitě v úvahu potřebu respektovat relativistické efekty, jež se pronikavě uplatňují u elektronů těchto atomů ve slupkách, situovaných nejbližší atomovému jádru<sup>7-9</sup>. Je tedy zřejmé, že dnes už v periodickém systému neexistují výpočtově nedostupná zátíží. Je však pravdou, že mezi těžkými atomy existují takové, jejichž zpracování není snadné, ale to je už případ přesahující zaměření tohoto článku.

Další bod je (a bude!) perlou v naší koláži. Týká se van der Waalových (zkráceně vdW) interakcí, které se v literatuře označují též jako slabé či nekovalentní. Jde o interakce mezi permanentními, indukovanými a časově proměnnými elektrickými multipóly, jež jsou spjaty s interagujícími molekulami; interakce dipól-dipól často představuje největší stabi-

zační příspěvek. Sluší se dodat, že časově proměnné dipóly se uplatňují např. u atomů vzácných plynů; jsou způsobeny tím, že těžká atomová jádra nestačí sledovat velmi rychlý pohyb elektronových oblaků. Tyto interakce mají zásadní význam pro chemii v kondenzované fázi a jsou naprosto nezastupitelné v celé oblasti biodisciplín. K jejich náležitému docenění nepochybně dojde v nedaleké budoucnosti.

Ultrapiónem v této oblasti byl pět let před Hellmannem Fritz London<sup>10</sup>, ale Hellmannův příspěvek<sup>11</sup> je originální a velice přínosný. Je nejvyšší čas, aby mladí adepti biodisciplín (chemici ovšem též) věnovali náležitou pozornost popisu a interpretaci těchto interakcí; bez toho by neměli možnost porozumět průběhu fungování elementárních procesů v živé hmotě. Soustavné poučení o těchto interakcích lze nalézt na více místech v literatuře, např. v pracích<sup>12-14</sup>.

Jen krátce se mohu zmínit o viriálovém teorému, který ukazuje, že mezi potenciální ( $V$ ), kinetickou ( $T$ ) a celkovou ( $E$ ) energií u atomů a molekul existuje podivuhodně jednoduchý vztah:

$$T = -\frac{V}{2} = -E \quad (3)$$

Tento vztah přesně platí v případě, že máme k dispozici přesnou vlnovou funkci<sup>4,15</sup>. U výpočtů s funkcemi přibližnými lze podle míry nesplnění vztahu (3) usuzovat na kvalitu použité přibližné vlnové funkce. Zbývá dodat, že ke vztahu (3) dospěli nezávisle Hellmann<sup>4</sup> a Slater<sup>15</sup>, a proto bývá označován jako Hellmannův-Slaterův teorém. Jednoduchost vztahu (3) může svádět k domněnce, že pozadí tohoto vztahu je stejně prosté. Avšak není tomu tak; ve skutečnosti i v literatuře nepochybně dobré kvality bývá sepětí potenciální, kinetické a celkové energie interpretováno zmateně a ne zcela korektně. Jasně lze získat např. trpělivým prostudováním prací Ruedenberga<sup>16</sup> a Kutzelnigga<sup>17</sup>.

Páté místo v naší koláži právem náleží Hellmannovým experimentálním pracím. I v tomto směru byl skutečným mistrem, jakým byl v oblasti teorie. Pro ilustraci lze uvést měření frekvenčně závislých dielektrických konstant<sup>18</sup>, jež bylo součástí jeho dizertace, jakož i dnes vskutku aktuální téma, týkající se rozkladu ozonu ve stratosféře<sup>19</sup>. Jeho studie chemické reaktivity<sup>20</sup> předběhla dobu. Ve všech svých pracích vždy kladl důraz na zkoumání toho, jak nepřesnosti jednotlivých proměnných ovlivňují přesnost stanovené veličiny. S politováním lze dodat, že tomu trvale významnému bodu se dnes věnuje jen malá pozornost.

Jako poslední bod do koláže z Hellmannova díla vybírám jeho monografii, která vyšla v r. 1937 v Moskvě pod názvem „Kvantovaja chimija“<sup>21</sup>. To bylo prvé dílo tohoto druhu, tedy počín průkopnický. Je ovšem pravda, že už v r. 1935 vyšlo známé dílo Paulinga a Wilsona nadepsané „Introduction to Quantum Mechanics“ s podtitulem „With Application to Chemistry“. To, co je na Hellmannově díle zvláště oceněníhodné, je to, že po téměř 70 letech je pořád svěží a použitelné jako učebnice! Ostatně totéž platí o díle o sedm let mladším, o „Quantum Chemistry“ Eyringa, Waltera a Kimballa, které má už mnoho desetiletí charakter ja-

kési „bible“ pro začínající kvantové chemiky. Pokud jde o Hellmannovu monografii, nutno dodat, že v r. 1937 neměla naději na vydání v nacistickém Německu. Německou verzi se však podařilo uplatnit ve Vídni<sup>22</sup> v té době ještě neobsazené.

Dříve než umístíme celou koláž do virtuální síně slávy, je na místě pokus o zařazení Hellmannova příběhu do kontextu 20. století. Od doby osvícenství v 18. století lze sledovat cestu rozmachu k politickým, hospodářským a sociálním rysům demokracie 20. století. Všichni ovšem víme, že na odvrácené straně tohoto století jsou dvě války, války hrůzného rozsahem a brutalitou. A letitá válka studená. A dvě surové a bestiální diktatury, jež své metazločiny páchaly v rámci hnědé a rudé verze socialismu: dohromady to stálo život okolo 80 miliónů lidí. Vynikající učenec Hans Hellmann byl jedním z oněch 80 milionů. Bylo to navíc také století emigrací a emigrantů.

Ve 20. století došlo také k dřívě netušenému rozmachu vědy a vyspělého průmyslu. Došlo k objevům, jež změnily náš pohled na vesmír a na svět, v němž žijeme. Role fyziky, chemie, biologie (v širokém slova smyslu) a lékařství byla převratná. Pokud bych směl zmínit jen jeden jediný z těch velkých objevů, tak bych uvedl kvantovou mechaniku; je to nejen pro mne jeden z největších triumfů lidského ducha<sup>23</sup> s důsledky pro fundamentální teorii fyziky (hluboký průnik do světa elementárních částic a současné úsilí o spojení s obecnou teorií relativity) a pro vznik molekulových věd (je jejich společným teoretickým jmenovatelem). Konečně myslím, že by bylo škoda neupozornit na vliv kvantové teorie na výtvarné umění 20. století<sup>24</sup>.

Před uzavřením svého krátkého příspěvku rád konstatuji, že v posledních letech vzrostl pronikavě v odborných kruzích zájem o Hellmannovo dílo i o jeho osud jak v Německu, tak v Rusku. V Německu je v čele těchto snah prof. W. H. Eugen Schwarz na univerzitě v Siegeniu. On také významně přispěl ke vzniku dvou vynikajících příspěvků o H. Hellmannovi<sup>25,26</sup>.

Svým dílem si Hellmann vytvořil pomník, kterému nehrozí zvětrávání a koroze. Mysle na velkého učence, jednoho z 80 milionů lidí, jejichž životy byly zmařeny, přeji si, aby mladá generace nebyla lhostejná k minulosti a historii vůbec, nejen k historii vědy. Pokud by tomu tak nebylo, hrozila by totiž recidiva. Na to nás už před lety upozornil americký filozof španělského původu, George Santayana (1863–1952): „Who does not remember the past, is condemned to repeat it“. Na nás seniorech je, abychom na to taktně, avšak houževnatě upozorňovali mladší generace.

#### LITERATURA

1. Pulay P.: *Mol. Phys.* 18, 473 (1970).
2. McIver J. W., Jr., Komornicki A.: *Chem. Phys. Lett.* 10, 303 (1971).
3. Pancíř J.: *Theor. Chim. Acta* 29, 21 (1973).
4. Hellmann H.: *Z. Phys.* 85, 180 (1933).
5. Hellmann H.: *Acta Physicochim. U.S.S.R.* 1, 913 (1934/1935); 4, 225 (1936).
6. Gombas P.: *Z. Phys.* 94, 473 (1935).
7. Presuß H.: *Z. Naturforsch. A10*, 365 (1965).
8. Kutzelnigg W., Koch R., Bingel W. A.: *Chem. Phys. Lett.* 2, 197 (1968).
9. Frenking G. et al.: *Rev. Comput. Chem.* 8, 63 (1996).
10. London F.: *Z. Phys. Chem. B11*, 222 (1930).
11. Hellmann H.: *Acta Physicochim. U.S.S.R.* 2, 273 (1935).
12. Hirschfelder J. O., Curtiss C. F., Bird R. B.: *Molecular Theory of Gases and Liquids*. Wiley, New York 1954.
13. Hobza P., Zahradník R.: *Weak Intermolecular Interaction*. Elsevier, Amsterdam 1980.
14. Hobza P., Zahradník R.: *Chem. Rev.* 88, 871 (1988).
15. Slater J. C.: *Phys. Rev.* 1, 687, 1933.
16. Ruedenberg K.: *Rev. Mod. Phys.* 39, 326 (1962).
17. Kutzelnigg W.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 12, 546 (1972).
18. Hellmann H., Zahn H.: *Phys. Z.* 26, 680 (1925).
19. Hellmann H.: *Ann. Phys. (Leipzig)* 2, 707 (1929).
20. Hellmann H., Syrkin J. K.: *Acta Physicochim. U.S.S.R.* 2, 433 (1935).
21. Hellmann H.: *Kvantovaja chimija*. ONTI, Moskva 1937.
22. Hellmann H.: *Einführung in die Quantenchemie*. F. Deuticke, Leipzig 1937.
23. Weinberg S.: *Fascing Up (Science and Its Cultural Adversaries)*. Harvard University Press, Cambridge, London 2001.
24. Waddington C. H.: *Behind Appearance (A Study of the relations between painting and the natural sciences in this century)*. MIT Press, Cambridge, London 1968.
25. Schwarz W. H. E., Andrae D., Arnold S. R., Heidberg J., Hellmann H. jr., Hinze J., Karachalios A., Kovner M. A., Schmidt P. C., Zülicke L.: *Bunsen-Magazin* 1999 (1), 10.
26. Schwarz W. H. E., Karachalios A., Arnold S. R., Zülicke L., Schmidt P. C., Kovner M. A., Hinze H., Hellmann H. jr., Heidberg J., Andrae D.: *Bunsen-Magazin* 1999 (2), 60.

**R. Zahradník** (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Hans Hellmann: Life Story of a Scientist in the 20th Century**

This communication consists of three parts: (i) biography of Hans Hellmann, a real pioneer in quantum chemistry, (ii) Hellmann's achievements, and (iii) reflections on the mankind destiny in the 20th century. When the Nazis seized power in Germany in 1933, Hellmann realized that emigration became a necessity for his family. In 1934–1937 he worked at the Karpov Institute in Moscow; he was imprisoned in 1938 and a few weeks later executed by the Soviet secret service.

Hans Hellmann (1903–1938) was not only a brilliant theoretical physicist but also a man who was able to perfectly define experiments and carry them out, a physicist with real and deep feeling for chemistry and, particularly,

a man with a remarkable vision. Hellmann's notable achievements are briefly reviewed and their impact on contemporary chemistry is emphasized. Attempt has been made to create a collage on the basis of six Hellmann's scientific masterpieces which could be suitable for inclusion in a Hall of Fame. The first deals with the Hellmann-Feynman theorem that has played a prominent role in molecular geometry gradient optimization. The next one is associated with pseudopotentials, which have made possible the entry of quantum chemical treatment into the area of heavier atoms. The third achievement concerns non-covalent bonds, which assume a key position in the description of condensed matter and are essential in the whole realm of biosciences. The virial theorem, the fourth success, has played a great role in understanding the nature of the chemical bond. Hellmann's experimental abilities have been docu-

mented by his measurements of frequency-dependent dielectric permittivity, ozone decomposition in stratosphere, and chemical reactivity. The last achievement is his extensive work *Quantum Chemistry* (in Russian), published in 1937, which is still an impressive textbook.

In the final section, the transitions of the mankind from the Age of Reason to democracies and also extremely brutal dictatorships of the 20th century are briefly outlined; this is a good frame of the Hellmann's life story. Another feature of that century is unparalleled expansion and development of science and technology, quantum mechanics being the greatest scientific achievement of that century. The paper is closed by a quotation from G. Santayana: „Who does not remember the past, is condemned to repeat it“. The author believes that it is the moral obligation of seniors in science to regularly remind junior scientists of this sage observation.

## PYRIDOXALFOSFÁT – KATALYZÁTOR PŘEMĚN AMINOKYSELIN

MICHAELA MARKOVÁ a BLANKA KRÁLOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3, 166  
28 Praha 6

michaela.markova@vscht.cz

Došlo 25.4.02, přepracováno 16.4.03, přijato 27.4.03.

Klíčová slova: pyridoxalfosfát, pyridoxaminfosfát, enzymové reakce

### Obsah

1. Úvod
2. Pyridoxalfosfát jako katalyzátor neenzymových reakcí
3. Pyridoxalfosfát v enzymových reakcích
4. Prostorové struktury PLP-dependentních enzymů
  - 4.1. Aspartátaminotransferasová rodina
  - 4.2. Tryptofansynthasová rodina
  - 4.3. Rodina aminotransferasy D-aminokyseliny
  - 4.4. Alaninracemasová rodina
5. Závěr

### 1. Úvod

Pyridoxal-5'-fosfát (PLP) a pyridoxamin-5'-fosfát (PMP) jsou formy vitamínu B<sub>6</sub>, které se mohou jako kofaktor účastnit metabolických pochodů spojených s přeměnami aminokyselin. Struktura PLP umožňuje jeho využití jako katalyzátoru velmi rozmanitých reakcí, zahrnujících například transaminaci, racemizaci,  $\alpha$ -dekarboxylaci, aldolové štěpení a  $\beta$ - a  $\gamma$ -eliminaci<sup>1</sup>. Taková univerzálnost není u organických sloučenin využívaných jako kofaktory enzymů příliš běžná. Ve všech výše zmíněných případech je pro katalýzu využívána aldehydová skupina PLP. Pyridinový kruh usnadňuje průběh reakcí díky aromatickému charakteru a schopnosti odtahovat elektrony z C $\alpha$  uhlíku substrátu a stabilizovat Schiffovu bázi vzniklou po navázání substrátu. Tím dojde k nezbytné labilizaci vazeb vycházejících z C $\alpha$  uhlíku.

### 2. Pyridoxalfosfát jako katalyzátor neenzymových reakcí

Bylo prokázáno, že samotný PLP je schopen katalyzovat některé reakce ve vodných roztocích, například konverzi některých aminokyselin na příslušné oxokyseliny, racemizaci některých aminokyselin<sup>2</sup>, dekarboxylaci aminokyselin nebo eliminační<sup>3,4</sup> reakce (serin  $\rightarrow$  pyruvát + amo-

niak, serin  $\rightarrow$  glycin + formaldehyd). Jako katalyzátory těchto reakcí mohou kromě PLP působit i další sloučeniny obsahující dusíkatý heterocyklus, volnou fenolovou a formylou skupinu<sup>1</sup>, jako například 3-hydroxypyridin-4-aldehyd nebo 3-hydroxypyridin-2-aldehyd. Obdobné sloučeniny bez heterocyklu, jako například salicylaldehyd nebo *m*-nitrosalicylaldehyd, nejsou schopné uvést reakce katalyzovat.

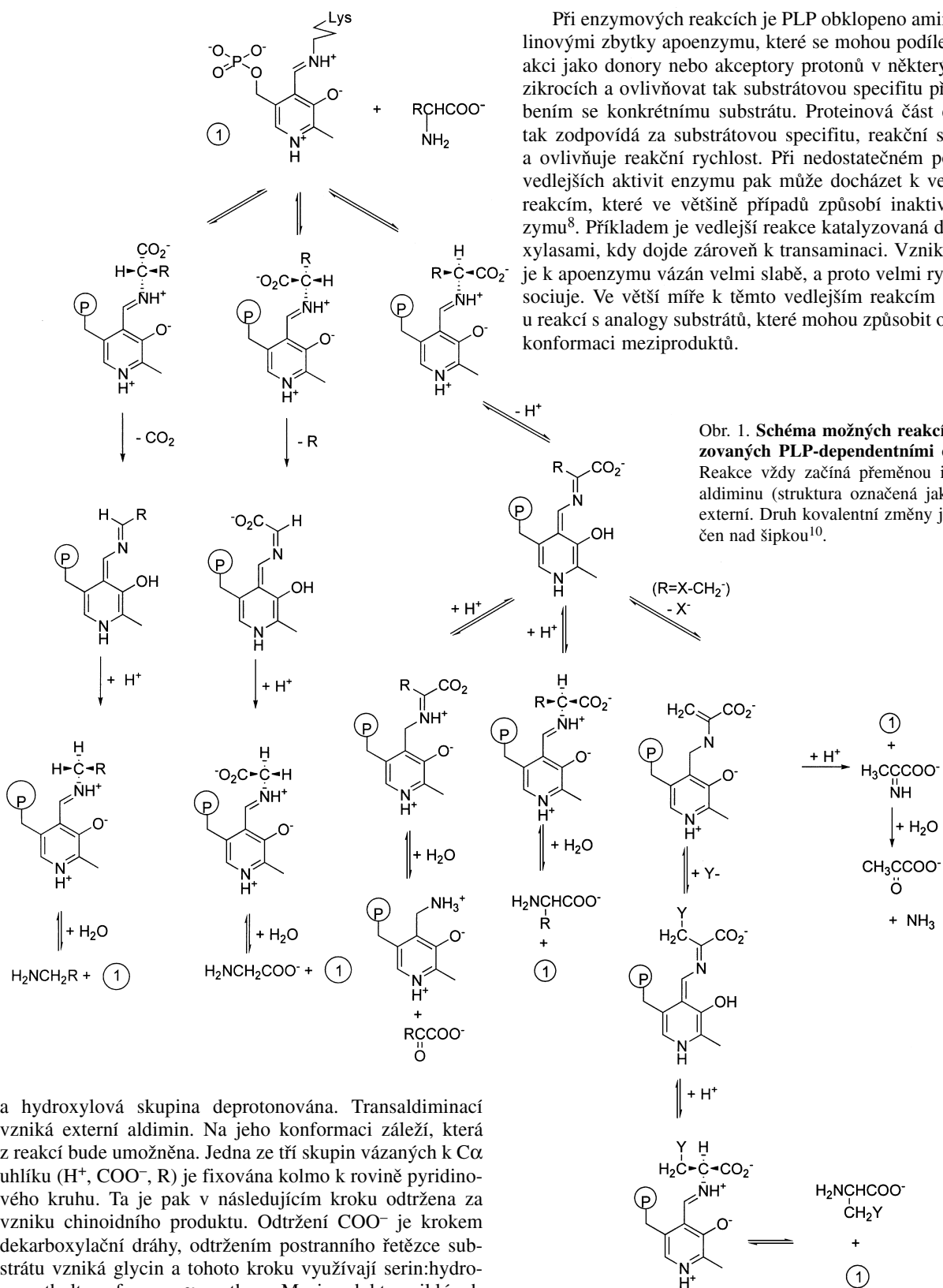
Průběh reakcí katalyzovaných volným PLP je významně ovlivněn teplotou a pH a přítomností některých iontů<sup>5</sup>, jako například Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, které zde mohou mít několik funkcí. Mohou napomáhat vzniku komplexu PLP a aminokyseliny ve vodných roztocích, depolarizovat nabitou karboxylovou skupinu nebo se mohou podílet na odtahování elektronu z C $\alpha$  uhlíku aminokyseliny tvorbou chelátů, které podporují vznik planární konformace aldiminového komplexu. Všechny tyto funkce jsou při enzymové katalýze zajišťovány aminokyselinovými zbytky proteinu.

Již v padesátých letech byl pro reakce katalyzované volným PLP navržen základní mechanismus vzniku komplexu PLP-aminokyselina<sup>6</sup>, jeho stabilizace kovovými ionty a byly objasněny jednotlivé kroky vedoucí k racemizaci, transaminaci, dekarboxylaci a vzniku glycinu, acetaldehydu a threoninu. Později se ukázalo, že enzymově katalyzované reakce probíhají shodnými mechanismy (obr.1 na následující straně). Je zajímavé a celkem očekávatelné, že reakce katalyzované „neenzymovým“ PLP mají nízkou reakční specifitu, a může tedy současně probíhat několik typů reakcí.

### 3. Pyridoxalfosfát v enzymových reakcích

V šedesátých letech bylo objeveno a izolováno množství enzymů obsahujících PLP jako kofaktor. Porovnáním meziproductů reakcí byl prokázán shodný mechanismus u enzymových i neenzymových reakcí<sup>1</sup>. Při enzymové katalýze se vliv vnějších podmínek (teplota, pH, přítomnost kovových iontů, koncentrace substrátů aj.) snižuje, zároveň dochází k významnému zvýšení reakční rychlosti a reakční specifity.

Hlavní odlišnost v mechanismu enzymových reakcí je ve tvorbě aldiminového meziproductu. PLP je v enzymech vázáno v aktivním místě k  $\epsilon$ -aminoskupině lysinového zbytku apoenzymu jako Schiffova báze (interní aldimin), 5'-fosfátová skupina je fixována až devíti vodíkovými vazbami. PMP je v aktivním místě ukotven zejména pomocí 5'-fosfátové skupiny. Tvorba externího aldiminu se substrátem pak probíhá transaldiminací za vzniku aldaminu jako meziproductu, namísto karbinolaminu při neenzymových reakcích<sup>7</sup>. Schéma klíčových meziproductů v reakcích katalyzovaných PLP-dependentními enzymy je na obr. 1. Všechny reakce vychází z protonovaného interního aldiminu mezi PLP a lysinem z aktivního místa enzymu. Ve většině případů je dusíkový atom pyridinu protonován



Při enzymových reakcích je PLP obklopeno aminokyselinovými zbytky apoenzymu, které se mohou podílet na reakci jako donory nebo akceptory protonů v některých mezikrocích a ovlivňovat tak substrátovou specifitu přizpůsobením se konkrétnímu substrátu. Proteinová část enzymu tak zodpovídá za substrátovou specifitu, reakční specifitu a ovlivňuje reakční rychlost. Při nedostatečném potlačení vedlejších aktivit enzymu pak může docházet k vedlejší reakci, které ve většině případů způsobí inaktivaci enzymu<sup>8</sup>. Příkladem je vedlejší reakce katalyzovaná dekarboxylasami, kdy dojde zároveň k transaminaci. Vzniklý PMP je k apoenzymu vázán velmi slabě, a proto velmi rychle disociuje. Ve větší míře k těmto vedlejším reakcím dochází u reakcí s analogy substrátů, které mohou způsobit odlišnou konformaci meziproductů.

Obr. 1. Schéma možných reakcí katalyzovaných PLP-dependentními enzymy. Reakce vždy začíná přeměnou interního aldiminu (struktura označená jako 1) na externí. Druh kovalentní změny je naznačen nad šipkou<sup>10</sup>.

a hydroxylová skupina deprotonována. Transaldiminací vzniká externí aldimin. Na jeho konformaci záleží, která z reakcí bude umožněna. Jedna ze tří skupin vázaných k C $\alpha$  uhlíku (H<sup>+</sup>, COO<sup>-</sup>, R) je fixována kolmo k rovině pyridinového kruhu. Ta je pak v následujícím kroku odtržena za vzniku chinoidního produktu. Odtržení COO<sup>-</sup> je krokem dekarboxylační dráhy, odtržením postranního řetězce substrátu vzniká glycin a tohoto kroku využívají serin:hydroxymethyltransferasa a  $\alpha$ -synthasy. Meziproduct vzniklý odtržením protonu je typický pro racemasy, aminotransferasy,  $\beta$ - a  $\gamma$ -synthasy a pro enzymy katalyzující  $\beta$ -eliminaci.

#### 4. Prostorové struktury PLP-dependentních enzymů

Vztah prostorové struktury a funkce je v současné době jednou z priorit výzkumu pyridoxalfosfátových enzymů. Přestože první struktura PLP-dependentního enzymu<sup>9</sup> byla publikována již v roce 1980, větší množství prostorových struktur bylo vyřešeno až v posledních osmi letech<sup>10</sup> díky moderním krystalografickým metodám, které umožnily určit strukturu i pro molekuly větší než 90 kDa, mezi které PLP-enzymy ve většině případů patří. Pro známé enzymy je pomocí substrátových analogů a cílené mutagenese sledován vliv jednotlivých aminokyselinových zbytků na mechanismus reakce. U publikovaných struktur byly nalezeny mnohé podobné strukturální znaky. V současné době je obecně přijímáno rozdělení PLP-enzymů do čtyř základních rodin nazvaných podle jejich charakteristických zástupců jako aspartátaminotransferasová, tryptofansynthasová, alaninracemasová a rodina aminotransferasy d-aminokyselin<sup>10,11</sup>.

##### 4.1. Aspartátaminotransferasová rodina

Aspartátaminotransferasa (AAT) je nejvíce prostudovanou aminotransferasou<sup>1,12</sup>, její vlastnosti i struktura byly podrobně popsány. Přestože nejvíce pozornosti bylo věnováno prasečí mitochondriální AAT, struktura byla určena i pro enzymy z jiných organismů<sup>13-16</sup>, obratlovců i bakterií. Shoda ve strukturách je natolik velká, že je možné poznatky o vlivu jednotlivých aminokyselinových zbytků na mechanismus prasečího enzymu aplikovat i na AAT z prokaryotních zdrojů.

Aspartátaminotransferasa je kompaktně uspořádaný homodimer s dvoučetnou osou symetrie, podjednotky o molekulové hmotnosti přibližně 45 kDa obsahují tři domény (centrální vážící PLP, C-koncovou a N-koncovou). Centrální doména je tvořena otevřenou  $\alpha/\beta$  strukturou s jedinečným uspořádáním sedmiřetězcového  $\beta$ -sheetu *agfedbc*, ve kterém jsou kromě *g* všechny řetězce paralelní. Lysin vážící PLP se nachází ve smyčce mezi řetězci *f* a *g*. Aktivní místa se nacházejí na rozhraní podjednotek a domén a podílejí se na nich aminokyselinové zbytky z obou podjednotek. Vazba substrátu vyvolává v enzymu významné strukturální změny, které v obdobném rozsahu nebyly pozorovány u žádného dalšího PLP-enzymu.

Do této rodiny enzymů patří i ornithinaminotransferasa,  $\gamma$ -aminobutyrylaminotransferasa, glutamát-1-semialdehydaminomutasa,  $\omega$ -aminokyseliny:pyruvát-aminotransferasa, ornithindekarboxylasa, dialkylglycindekarboxylasa, tyrosin:fenollyasa, tryptofan:indollyasa a cystathionin  $\beta$ -lyasa<sup>10</sup>. První dva jmenované enzymy jsou homodimery se strukturou velmi blízkou AAT a dialkylglycindekarboxylase. Glutamát-1-semialdehydaminomutasa<sup>17</sup> (GSAT) se skládá ze dvou podjednotek o shodném aminokyselinovém složení, ale rozdílné prostorové struktury podjednotek, jedna z nich obsahuje PMP namísto obvyklého PLP vázaného přes lysin a vstup do aktivního místa je blokován tři-

cet aminokyselin dlouhou smyčkou. Tyrosin:fenollyasa<sup>18</sup> a tryptofan:indollyasa<sup>19</sup> jsou vzájemně velmi podobné tetramerní enzymy (50% identita sekvencí). V obou dvou hrají významnou roli při katalýze draselné ionty, pokud se nahradí sodnými ionty, enzym ztrácí aktivitu. Cystathionin  $\beta$ -lyasa<sup>20</sup> je také homotetramer a je ze všech enzymů této rodiny nejméně podobná AAT. Přestože PLP-vazebná i C-koncová doména jsou podobné AAT, N-koncová se liší jak ve své struktuře, tak i v poloze vůči ostatním doménám. Vstup substrátu do aktivního místa vyvolává podobné konformační změny jako u AAT, avšak v menším rozsahu, studované inhibitory nejsou schopné tuto změnu vyvolat.

##### 4.2. Tryptofansynthasová rodina

Tryptofansynthasa<sup>21</sup> je enzym o podjednotkovém složení ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>, kde dimery  $\alpha\beta$  jsou schopné katalyzovat reakci, avšak vazbou na druhý dimer se zvyšuje molární aktivita komplexu. Enzym katalyzuje syntézu L-tryptofanu z indolylglycerolfosfátu a L-serinu, kde  $\alpha$ -podjednotka katalyzuje vznik indolu a glyceraldehyd-3-fosfátu z indolylglycerolfosfátu a  $\beta$ -podjednotka vznik tryptofanu z indolu a serinu. Pouze  $\beta$ -podjednotka obsahuje PLP. Aktivní místa jsou spojena 2,5 nm dlouhým hydrofobním tunelem, který se vytvoří pouze za přítomnosti substrátů a draselného iontu, sodný iont tvorbu kanálu blokuje.

Kromě tryptofansynthasy patří do této rodiny ještě threonindeaminasa a O-acetylserinsulfhydrilasa. Podobnost mezi enzymy v této rodině je významně menší než u aspartátaminotransferasové rodiny. Threonindeaminasa<sup>22</sup> je homotetramer, jehož podjednotky se skládají z katalytické N-koncové a regulační C-koncové domény. Katalytická doména obsahuje PLP a je podobná  $\beta$ -podjednotce tryptofansynthasy, regulační doména je strukturou podobná fosfoglycerát dehydrogenase.

O-Acetylserinsulfhydrilasa<sup>23</sup> je dimer s vysokou strukturální, avšak nízkou sekvenční homologií i s  $\beta$ -podjednotkou tryptofansynthasy, oproti které je významně zkrácena v N-koncové oblasti.

##### 4.3. Rodina aminotransferasy d-aminokyselin

DAAT (cit.<sup>24</sup>) je homodimer, který se od AAT liší velikostí a orientací PLP v enzymu. Oproti AAT je kratší o zhruba 100 aminokyselin, na tvorbě aktivního místa se podílejí opět aminokyselinové zbytky z obou podjednotek a PLP je vázán k proteinu shodnými vodíkovými vazbami. Na rozdíl od AAT je rozpouštědlo vystavena A-strana kofaktoru (v ostatních rodinách to je většinou B-strana<sup>9</sup>), díky tomu se při vzniku externího aldiminu dostane C $\alpha$  vodík do blízkosti aminoskupiny lysinového zbytku zodpovědného za deprotonaci C $\alpha$  aldiminu a protonaci C4' chinoidního meziprojektu. Karboxylová skupina aminokyselinového substrátu je fixována tvorbou iontového páru s argininovým zbytkem. Tím je zaručena specifita pro D-aminokyseliny. Velikost aktivního místa umožňuje vstup i relativně větších

Tabulka I

Přehled reakcí katalyzovaných PLP-enzymy se známou strukturou

Název enzymu	Substráty	Produkty
<i>Aspartátaminotransferasová rodina</i>		
Aspartátaminotransferasa	L-aspartát	oxalacetát
	$\alpha$ -ketoglutarát	L-glutamát
Ornithinaminotransferasa	L-ornithin	L-glutamát-5-semialdehyd
	$\alpha$ -ketoglutarát	glutamát
$\gamma$ -Aminobutyrylaminotransferasa	$\gamma$ -aminobutyrát	sukcinát semialdehyd
	$\alpha$ -ketoglutarát	L-glutamát
Glutamát-1-semialdehydaminomutasa	glutamát-1-semialdehyd	5-aminolevulinát
$\omega$ -Aminokyseliny:pyruvát-aminotransferasa	$\beta$ -alanin	2-oxopropanoát
	pyruvát	alanin
Ornithindekarboxylasa	L-ornithin	putrescin
		CO <sub>2</sub>
Dialkylglycindekarboxylasa	2,2-dialkylglycin	dialkylketon
	pyruvát	CO <sub>2</sub>
		L-alanin
Tyrosin:fenollyasa	L-tyrosin	fenol
	H <sub>2</sub> O	pyruvát
		NH <sub>3</sub>
Tryptofan:indollyasa	tryptofan	indol
	H <sub>2</sub> O	pyruvát
		NH <sub>3</sub>
Cystathionin $\beta$ -lyasa	cystathionin	L-homocystein
	H <sub>2</sub> O	pyruvát
		NH <sub>3</sub>
<i>Tryptofansynthasová rodina</i>		
Tryptofansynthasa	L-serin	L-tryptofan
	1-(indol-3-yl)glycerol 3-fosfát	glyceraldehyd-3-fosfát
		H <sub>2</sub> O
Threonideaminasa	L-threonin	2-oxobutanoát
	H <sub>2</sub> O	NH <sub>3</sub>
		H <sub>2</sub> O
<i>O</i> -Acetylserinsulphydrylase	<i>O</i> -acetyl-L-serin	L-cystein
	H <sub>2</sub> S	acetát
<i>Rodina aminotransferasy D-aminokyselin</i>		
Aminotransferasa D-aminokyselin	D-alanin	pyruvát
	$\alpha$ -ketoglutarát	D-glutamát
Aminotransferasa větvených aminokyselin	L-leucin	4-methyl-2-oxopentanoát
	$\alpha$ -ketoglutarát	L-glutamát
<i>Alaninracemasová rodina</i>		
Alaninracemasa	L-alanin	D-alanin

substrátů a vysvětluje poměrně malou substrátovou specifitu enzymu.

Kromě DAAT je do této rodiny řazena i aminotransferasa větvených aminokyselin<sup>25</sup>. Je to homohehexamer složený ze tří katalytických dimerů uspořádaných do tvaru trojbokého hranolu. Přestože i tento enzym má u kofaktoru odhalenou A-stranu, je specifický pro L-aminokyseliny. To je zajištěno poměrně malou změnou v aktivním místě, kdy karboxylová skupina aminokyselinového substrátu interaguje s NH-skupinami peptidového řetězce na opačné straně aktivního místa.

#### 4.4. Alaninracemasová rodina

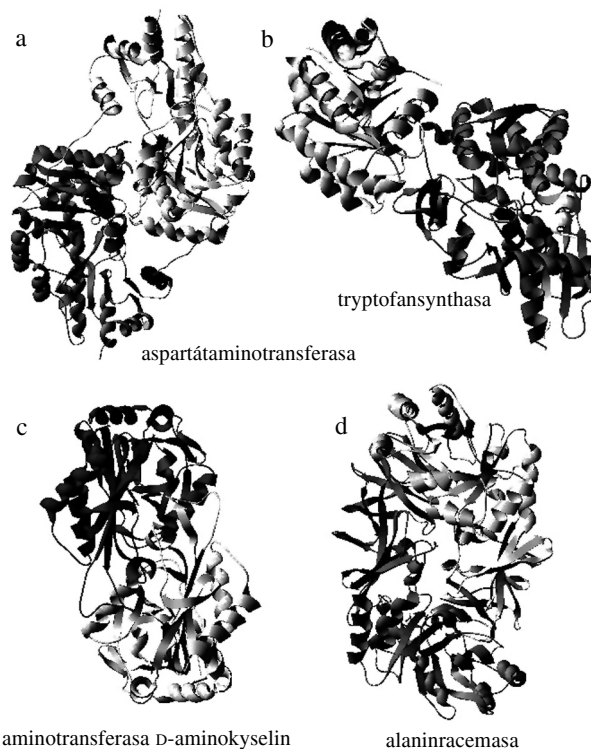
Alaninracemasa<sup>26</sup> se vyskytuje jako homodimer, na každou podjednotku se váže jedno PLP. Monomer se skládá ze dvou domén, N-koncové tvořené  $\beta$ -soudkem a C-koncové tvořené převážně  $\beta$ -strukturami. Podjednotky jsou ve velmi těsném uspořádání a smyčka z druhé podjednotky se podílí na tvorbě aktivního místa první podjednotky. PLP je vázán na rozhraní domén a podobně jako u DAAT má obnaženou A-stranu. Ze získané struktury samotného enzymu však zatím nebylo možné určit, které aminokyselinové zbytky se podílejí na reakci, ani jeden z dosud vytvořených modelů plně nevyhovuje sterickým a kinetickým požadavkům.

Vedle alaninracemasy lze do této skupiny zařadit i ornithindekarboxylasu, diaminopimelátdekarboxylasu a arginindekarboxylasu; přestože u těchto enzymů nebyla doposud experimentálně určena prostorová struktura, jejich modely vykazují shodné znaky s alaninracemasou<sup>10</sup>.

## 5. Závěr

PLP je schopný katalyzovat mnohé reakce i samotný ve vodném prostředí, avšak bez zásadního praktického využití. V živých systémech je to však nezastupitelná složka, která se podílí na katalýze mnoha zásadních reakcí v buňce. Přestože je schopný katalyzovat přeměnu jednoho substrátu na několik různých produktů, peptidová část enzymů zaručí, že bude probíhat téměř výhradně reakce jediná. Zároveň je tato část zodpovědná i za substrátovou specifitu, která je ve většině případů poměrně úzká.

V současné době již bylo určeno značné množství prostorových struktur PLP-enzymů a u většiny z nich byl navržen a později i potvrzen vliv jednotlivých aminokyselinových zbytků na mechanismus reakce. Přestože PLP-enzymy jsou schopné katalyzovat širokou škálu reakcí, rozdíly v jejich struktuře jsou relativně malé. Všechny mají jako základní katalytickou jednotku dimer (i když se některé vyskytují jako tetra- nebo hexamery) o molekulové hmotnosti kolem 90 kDa (obr. 2) a všechny mají velmi kompaktní strukturu, aktivní místa se pak ve většině případů vyskytují na rozhraní podjednotek. Do jedné rodiny pak mohou patřit enzymy schopné využívat jak D-, tak L-aminokyseliny a přitom jsou jejich aktivní místa velmi podobná. U mnoha enzymů s poměrně malou sekvenční homologií je až překva-



Obr. 2. Stužkové diagramy zástupců jednotlivých strukturálních typů; podjednotky jsou rozlišeny odstíny šedi, (a) aspartátaminotransferasa (PDB číslo 7AAT), (b) tryptofansynthasa (PDB číslo 1TTQ), (c) aminotransferasa D-aminokyselin (PDB číslo 1DAA), (d) alaninracemasa (PDB číslo 1SFT)

pující shoda ve struktuře nejen enzymu jako celku, ale i v umístění a struktuře aktivního místa.

Studium vztahu struktury a funkce PLP-enzymů vyvolává v současnosti i řadu dalších otázek. Proč například existují významné rozdíly v interakcích apoenzymu s PLP, když cíl – fixace PLP v aktivním místě – je shodný. Další neznámou je příčina odlišných nároků na uzavření aktivního místa při reakci a fixaci substrátu; byly popsány enzymy vyžadující úplné uzavření aktivního místa a zabránění vstupu vody, ale i enzymy, kdy se vstup do aktivního místa po vstupu substrátu nezmění a molekuly vody mohou i nadále do aktivního místa vstupovat. Stejně tak jsou známy enzymy, které pro zdárný průběh reakce vyžadují zcela rigidně fixovaný substrát a naopak enzymy, u kterých je substrát v aktivním místě držen pouze velmi volně. Zcela neznámý je důvod, proč se od sebe strukturou liší sekvenčně shodné podjednotky dimeru GSAT a proč je v tomto případě vázáno na jednu podjednotku PLP a na druhou PMP.

Odpovědi na tyto otázky mohou být odhaleny pomocí současných molekulárně biologických metod umožňujících cílené mutace v enzymových strukturách a sledování jejich vlivu na prostorovou strukturu a funkci enzymů. Také vyřešení dalších struktur příbuzných enzymů a identifikace nových, dosud neznámých PLP-enzymů, může přinést mnohé překvapující odpovědi, které by mohly být zajímavé i z obecně enzymologického hlediska.



## LITERATURA

1. Christen P., Metzler D. E.: *Transaminases*. Wiley, New York 1985.
2. Olivard J., Metzler D. E., Snell E. E.: *J. Biol. Chem.* 169, 643 (1952).
3. Metzler D. E., Snell E. E.: *J. Biol. Chem.* 198, 353 (1952).
4. Metzler D. E., Longenecker J. B., Snell E. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 630 (1954).
5. Metzler D. E., Snell E. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 979 (1952).
6. Metzler D. E., Ikawa M., Snell E. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 648 (1954).
7. Snell E. E.: *Brookhaven Symp. Biol.* 15, 32 (1962).
8. John R. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1248, 81 (1995).
9. Ford G. C., Eichele G., Jansonius J. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2559 (1980).
10. Jansonius J. N.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 759 (1998).
11. Grishin N. V., Phillips M. A., Goldsmith E. J.: *Protein Sci.* 4, 1291 (1995).
12. Mehta P. K., Hale T. I., Christen P.: *Eur. J. Biochem.* 186, 249 (1989).
13. Jeffery C. J., Barry T., Doonan S., Petsko G. A., Ringe D.: *Protein Sci.* 7, 1380 (1998).
14. Okamoto A., Higuchi T., Hirotsu K., Kuramitsu S., Kagamiyama H.: *J. Biochem.* 116, 95 (1994).
15. Malshkevich V. N., Strokopytov B. V., Borisov V. V., Dauter Z., Wilson K. S., Torchinsky Y. M.: *J. Mol. Biol.* 247, 111 (1995).
16. McPhalen C. A., Vincent M. G., Jansonius J. N.: *J. Mol. Biol.* 225, 495 (1992).
17. Hennig M., Grimm B., Contestabile R., John R. A., Jansonius J. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4866 (1997).
18. Sundararaju B., Antson A. A., Phillips R. S., Demidkina T. V., Barbolina M. V., Gollnick P., Dodson G. G., Wilson K. S.: *Biochemistry* 36, 6502 (1997).
19. Isupov M. N., Antson A. A., Dodson E. J., Dodson G. G., Dementieva I. S., Zakomirdina L. N., Wilson K. S., Dauter Z., Lebedev A. A., Harutyunyan E. H.: *J. Mol. Biol.* 276, 603 (1998).
20. Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.-D., Messerschmidt A.: *J. Mol. Biol.* 262, 202 (1996).
21. Hyde C. C., Ahmed S. A., Padlan E. A., Wilson Miles E., Davies D. R.: *J. Biol. Chem.* 263, 17857 (1988).
22. Gallagher D. T., Gilliland G. L., Xiao G., Zondlo J., Fisher K. E., Chinchilla D., Eisenstein E.: *Structure* 6, 465 (1998).
23. Burkhard P., Rao G. S. J., Hohenester E., Schnackerz K. D., Cook P. F., Jansonius J. N.: *J. Mol. Biol.* 283, 121 (1998).
24. Sugio S., Petsko G. A., Manning J. M., Soda K., Ringe D.: *Biochemistry* 34, 9661 (1995).
25. Okada K., Hirotsu K., Sato M., Hayashi H., Kagamiyama H.: *J. Biochem.* 121, 637 (1997).
26. Shaw J. P., Petsko G. A., Ringe D.: *Biochemistry* 36, 1329 (1997).

## Seznam zkratek

PLP	pyridoxal-5'-fosfát
PMP	pyridoxamin-5'-fosfát
AAT	aspartátaminotransferasa
DAAT	aminotransferasa D-aminokyseliny
GSAT	glutamát-1-semialdehydaminomutasa

**M. Marková and B. Králová** (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Pyridoxal Phosphate in Enzymatic and Non-Enzymatic Catalysis**

This review covers recent results on the ability of pyridoxal phosphate, either alone or as an enzyme cofactor of enzymes, to catalyze reactions with amino acids. Although pyridoxal phosphate catalyzes many different reactions in water solutions, its reaction specificity is quite poor. In biological systems, both reaction and substrate specificity is determined by apoenzymes. So far, more than twenty structures of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes have been solved. Most of them are evolutionarily related to aspartate aminotransferase. On the basis of structure motifs, they have been divided into four families with aspartate aminotransferase, tryptophan synthase, D-amino acid transferase and alanine racemase as representatives. A remarkable convergent evolution is observed in two fold types with a similar cofactor binding and reaction mechanism.

## CHEMICKÝ PRŮMYSL

### HODNOCENÍ POPÍLKU POMOCÍ VYLUHOVACÍHO TESTU „TOXICITY CHARACTERISTIC LEACHING PROCEDURE“

JANA SEIDLEROVÁ, MARTINA NOVÁČKOVÁ  
a ZDENĚK WEISS

*Ústav chemie materiálů, Vysoká škola báňská – Technická  
univerzita Ostrava,  
Tř. 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava – Poruba  
jana.seidlerova@vsb.cz, martina.novackova@vsb.cz,  
zdenek.weiss@vsb.cz*

Došlo 9.12.02, přepracováno 24.4.03, přijato 4.9.03.

Klíčová slova: hodnocení popílků, TCLP, vyluhovací test

#### Úvod

Ke zlepšení životního prostředí přispívá i hodnocení odpadů všech kategorií, zejména mají-li být ukládány na skládkách. V současné době se stále pracuje na normalizaci postupů pro stanovení charakteristik odpadů a to nejen v České republice, ale i v celoevropském měřítku. Obecně jednou z nejvýznamnějších charakteristik odpadu je vyluhovatelnost toxických složek. Kromě sledování toxických prvků a dalších parametrů ve vodných výluzích, přípravných různým postupem, se často studuje vyluhovatelnost i v jiných činidlech za účelem zjištění způsobu vazby určitého polutantu v odpadu. Nejznámější postupy jsou popsány např. v praxech<sup>1-3</sup>. Přehled publikací popisujících vyluhování polutantů z popílků je např. v práci Jaroš, Hodslavská a Ditz<sup>4</sup>. V České republice se několik let používala pro hodnocení odpadů vyhláška MŽP č. 338/1997 Sb. jako příloha k Zákonu o odpadech č. 125/1997 Sb.<sup>5</sup> Po vydání metodické příručky se postupy přípravy vodného výluhu i metody stanovení sledovaných parametrů sjednotily podle požadavků zmíněné vyhlášky. Jak ukázala práce Jaroše a Hamalové<sup>6</sup>, při stanovení některých parametrů se však výrazněji projevuje vliv mezilaboratorní variability. Novelizovaná vyhláška 383/2001 Sb.<sup>7</sup> přinesla změny především v hodnocení organických polutantů, nikoli v metodě přípravy výluhu pro stanovení kovů.

V r. 1986 byl v USA rozpracován test pro hodnocení rizikových materiálů, který byl posléze zahrnut do metodik US EPA pod označením „Toxicity characteristic leaching procedure“, zkracováno TCLP (metoda US EPA 1311, cit.<sup>8</sup>). Jde o speciální proceduru, která slouží nejen k získávání vy-

luhů stabilních složek, ale také těkavých látek. Pro realizaci testu je požadována speciální tlaková nádoba označovaná ZHE (zero headspace extractor). V této nádobě je prováděno vyluhování pod tlakem. ZHE umožňuje primární separaci kapaliny od tuhé fáze, extrakci a finální filtraci extraktu bez toho, aby byla nádoba otevírána. Je-li odpad hodnocen z hlediska jiných než těkavých kontaminantů, může se k přípravě extraktu použít libovolná extrakční nádoba, u níž je volný prostor nad extraktem. Pro analýzu anorganických látek je doporučována nádoba z plastu nebo borosilikátového skla. Podle postupu uvedeného v tomto předpisu se zkoumaný vzorek materiálu extrahuje v jednom ze dvou extrakčních roztoků po dobu 24 hodin. Po 18 hodinách míchání uvedeným způsobem se směs nechá 6 hodin sedimentovat. Míchání se provádí na rotačním zařízení rychlostí 24 otáček za minutu. K přípravě extraktu se použije vzorek odpadu s velikostí částic menší než 1 cm nebo s velikostí povrchu nižší než 3,1 cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>. Obsahuje-li odpad kapalnou fázi, provede se před vlastní přípravou extraktu separace kapalně tlakovou filtrací. Z tuhé fáze se připraví extrakt smícháním vzorku s dvaceti násobkem sušiny tuhé fáze. U odpadů neobsahujících žádnou kapalnou fázi se rovnou přidá dvaceti násobek extrakčního činidla. Po extrakci se k filtraci netěkavých kontaminantů využívá tlakové filtrační zařízení, do kterého se vkládají filtry z borosilikátových skleněných vláken bez vazebního materiálu o efektivní velikosti pórů 0,6–0,08 μm nebo 0,7 μm (např. firmy Whatman). Nedoporučuje se použít předfiltrace. Při hodnocení mobility kovů se filtr před použitím opláchne kyselinou dusičnou o koncentraci 1mol.l<sup>-1</sup> a třikrát redestilovanou vodou.

V této práci je provedeno srovnání vylouženého množství vybraných polutantů z elektrárenských popílků vzniklých spalováním různého uhlí v klasických roštových kotlích v prostředí vody a extrakčních činidel podle vyluhovací procedury TCLP.

#### Experimentální část

##### Použité materiály

K experimentálním pracem bylo použito 6 vzorků popílků. Jde o průměrné roční sesypy vzorků popílků z elektráren, které spalují různé typy uhlí. Vzorek č. 1 je popílek vznikající při spalování lignitu v elektrárně Hodonín, vzorky č. 2 až 4 jsou popílků z elektráren spalujících různé druhy hnědého uhlí (vzorek č. 2 pochází z elektrárny Mělník spalující směs hnědého uhlí, vzorek č. 3 z elektrárny Chvalatice spalující hnědé uhlí z Mosteckého revíru, vzorek č. 4 z elektrárny Tisová spalující hnědé uhlí ze Sokolovského revíru s vyšším obsahem titanu a berylia), vzorky č. 5 a 6 pocházejí z elektráren spalujících černé uhlí (vzorek č. 5 pochází z elektrárny Poříčí spalující černé uhlí z kladenského revíru a z Polska, vzorek č. 6 z elektrárny Dětmorovice spalující černé uhlí z OKD a Polska).

Tabulka I

Chemické složení vzorků popílků

Analyt	Jednotka	Koncentrace analytu ve vzorku popílku č.					
		1	2	3	4	5	6
Ca	hm. %	7,48	1,62	1,83	2,36	1,36	2,57
Na	hm. %	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Mg	hm. %	1,87	0,54	0,61	0,55	0,74	1,18
Al	hm. %	12,1	15,9	15,0	14,6	14,0	14,2
Si	hm. %	22,1	23,8	24,9	20,9	23,9	24,5
P	hm. %	0,05	0,08	0,06	0,13	0,06	0,19
S	hm. %	1,15	0,38	0,38	0,48	0,26	0,26
K	hm. %	0,95	1,22	1,32	0,83	2,11	2,54
Ti	hm. %	0,44	1,47	1,04	5,09	0,56	0,67
Fe	hm. %	5,47	5,48	6,05	5,18	4,04	5,49
Mn	hm. %	0,05	0,04	0,04	0,08	0,06	0,09
Cl	mg.kg <sup>-1</sup>	107	28,8	167	54,3	187	86,1
V	mg.kg <sup>-1</sup>	253	354	347	431	194	238
Cr	mg.kg <sup>-1</sup>	209	175	175	273	128	224
Co	mg.kg <sup>-1</sup>	<25	<25	<27	<28	24,2	28,7
Ni	mg.kg <sup>-1</sup>	131	121	124	117	88,1	121
Cu	mg.kg <sup>-1</sup>	132	129	108	193	107	136
Zn	mg.kg <sup>-1</sup>	150	225	209	163	327	184
Cd	mg.kg <sup>-1</sup>	<0,1	1,4	1,2	1,0	2,5	1,4
Ba	mg.kg <sup>-1</sup>	900	730	794	1220	743	1140
Pb	mg.kg <sup>-1</sup>	31,0	50,0	44,0	94,0	210	92,6

Všechna uhlí byla spalována klasickým granulačním postupem a popílek byl odebírán z elektrofiltrů. Chemické složení, které bylo stanoveno rentgenovou fluorescenční analýzou (přístroj Spectro X-Lab), je uvedeno v tabulce I. Vlhkost stanovená gravimetricky byla u všech vzorků nižší než 0,5 %.

K přípravě extraktů podle výše uvedené metodiky byly připraveny dva typy extrakčních roztoků. Extrakční roztok I (pH 4,93 ± 0,05) byl připraven rozpuštěním 5,7 ml bezvodé kyseliny octové v 500 ml demineralizované vody a přidáním 64,3 ml hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol.l<sup>-1</sup>. Získaná směs se naředila demineralizovanou vodou na objem 1 litr. Extrakční roztok II (pH 2,88 ± 0,05) byl připraven rozpuštěním 5,7 ml bezvodé kyseliny octové v litru demineralizované vody. K přípravě vodných výluhů a extrakčních roztoků byla použita demineralizovaná voda a chemikálie čistoty p. a.

#### Určení extrakčního roztoku

Podle metodiky TCLP se před vlastní extrakcí určí vhodný extrakční roztok, ve kterém se provede extrakce podle následujícího postupu: 5 g vzorku, u kterého byla zredukována velikost částic pod 1 mm, se přeneso do Erlen-

Tabulka II

pH extraktů při určení vhodného extrakčního činidla pro proceduru TCLP

Číslo vzorku	pH	
	po prvním stupni (vodný extrakt po 5 min)	po druhém stupni (po přidavku HCl)
1	11,2	1,8
2	5,3	1,2
3	11,4	2,3
4	6,3	1,6
5	11,7	3,8
6	7,5	1,9

mayerovy baňky o objemu 500 ml. Přidá se 96,5 ml demineralizované vody, přikryje se hodinovým sklíčkem a míchá se po dobu 5 minut magnetickým míchadlem. Po 5 minutách se změří pH. Je-li pH menší než 5,0 použije se k extrakci netěkavých složek z odpadu extrakční roztok I. Je-li pH větší než 5 přidá se ke směsi 3,5 ml roztoku kyseliny

chlorovodíkové o koncentraci  $1 \text{ mol.l}^{-1}$ . Směs se protřepe, přikryje hodinovým sklíčkem, zahřeje na teplotu  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , na které se směs udržuje 10 minut. Je-li pH tohoto roztoku po ochlazení na laboratorní teplotu nižší než 5,0, použije se extrakční roztok I, je-li pH větší než 5, použije se extrakční roztok II.

#### Příprava extraktů a jejich analýza

Výsledky měření pH při určování typu extrakčního činidla jsou uvedeny v tabulce II.

Z tabulky II vyplývá, že k posouzení škodlivosti všech zvolených vzorků popílků se podle metodiky TCLP připraví extrakt v extrakčním činidle I (pH  $4,93 \pm 0,05$ ). Pro srovnání vlivu pH na vyluhování vybraných prvků z elektrárenských popílků bylo provedeno vyluhování v obou extrakčních činidlech. Z jednotlivých vzorků byly pak připraveny čtyři typy extraktů:

A) Vodný výluh připravený podle postupu uvedeného ve vyhlášce MŽP č. 338/1997 Sb. o podrobnostech s nakládání s odpady, příloha č. 4.

B) Vodný výluh připravený postupem podle TCLP. Poměr tuhé a kapalné fáze byl 1 : 20. Směs byla míchána po dobu 18 hodin otáčením o  $360^\circ$  rychlostí 24 otáček za minutu a 6 hodin sedimentovala. Následně byla filtrována.

C) Extrakt připravený postupem podle TCLP v extrakčním činidle I.

D) Extrakt připravený postupem podle TCLP v extrakčním činidle II.

Po ukončení doby styku kapalné a tuhé fáze byla provedena separace extraktu. Filtrace výluhu A byla provedena membránovými filtry o velikosti pórů filtry  $0,40 \text{ } \mu\text{m}$  (Pragochema, s.r.o.). Extrakty B – D byly filtrovány tlakovou filtrační filtry s velikostí pórů  $0,6\text{--}0,8 \text{ } \mu\text{m}$  (Millipore). Získané filtráty byly konzervovány koncentrovanou kyselinou

Tabulka III

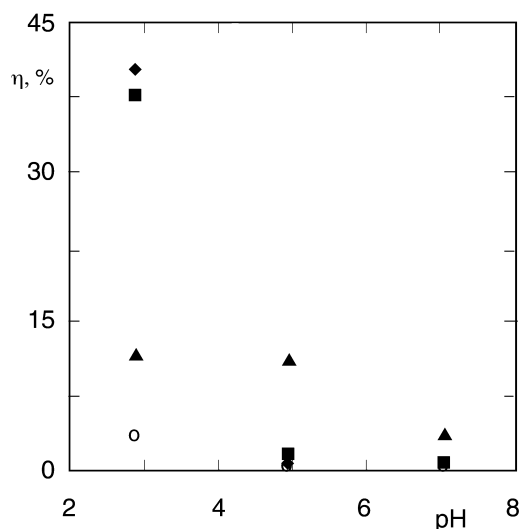
Parametry pH a konduktivita ( $\text{mS.m}^{-1}$ ) vodných extraktů A a B

Číslo vzorku	pH		Konduktivita	
	A	B	A	B
1	11,2	11,5	78	96
2	5,1	6,3	94	61
3	11,7	11,8	164	175
4	6,4	7,7	96	63
5	11,5	11,6	156	143
6	7,0	7,5	125	80

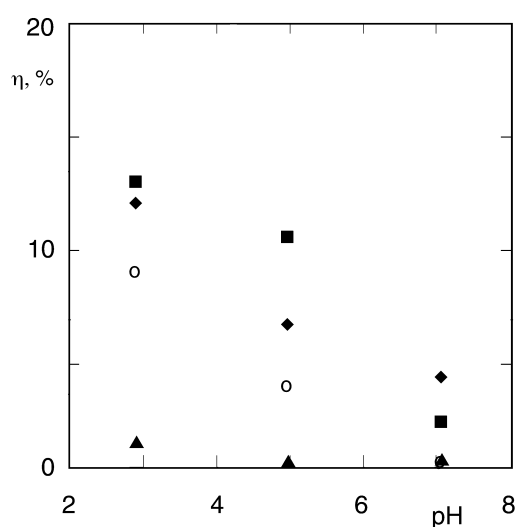
dusičnou o čistotě p.p. Každý vyluhovací test byl proveden minimálně dvakrát vedle sebe. Stanovení vybraných kovů bylo provedeno metodou atomové emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (přístroj JY 24, fy Jobin Yvon). V extraktu typu A byly stanoveny všechny prvky definované třídou vyluhovatelnosti I vyhlášky č. 338/1997 Sb. Pro další studium byly vybrány pouze Fe, Mn, Zn, Cu a V, u kterých chyba stanovení použitou technikou je menší než předpokládaná změna v důsledku rozdílného postupu přípravy extraktu. Uvedené prvky byly stanoveny v připravených extraktech i slepých vzorcích. V extraktech A a B bylo sledováno také pH a vodivost.

#### Výsledky a diskuse

pH a konduktivitu vodných extraktů A a B uvádí tabulka III, koncentrace sledovaných prvků v jednotlivých extraktech vzorků jsou uvedeny v tabulce IV.



Obr. 1: Vyloužený podíl sledovaných prvků z popílku po spálení lignitu (vzorek č. 1),  $\blacklozenge$  Mn,  $\blacksquare$  Zn,  $\blacktriangle$  V,  $\circ$  Cu



Obr. 2: Vyloužený podíl sledovaných prvků z popílku po spálení hnědého uhlí (vzorek č. 2),  $\blacklozenge$  Mn,  $\blacksquare$  Zn,  $\blacktriangle$  V,  $\circ$  Cu

Tabulka IV

Koncentrace sledovaných prvků v připravených extraktech popílků

Analyt	Limitní konc. tř. I	Číslo vzorku	Koncentrace analytu [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ] v extraktu typu			
			A	B	C	D
Mn	1000	1	< 20	50	30	3700
		2	569	341	531	980
		3	475	275	531	1070
		4	282	178	1330	2640
		5	83	< 20	1750	2600
		6	46	< 20	198	2060
Fe	5000	1	< 20	< 20	54	34300
		2	133	< 20	383	10200
		3	119	< 20	248	11700
		4	< 20	< 20	297	16400
		5	161	< 20	< 20	291
		6	< 30	< 30	< 20	< 20
Zn	5000	1	< 20	20	43	1130
		2	150	95	473	583
		3	85	53	588	788
		4	81	23	331	399
		5	22	31	442	617
		6	29	< 20	66	288
V	200	1	210	183	563	595
		2	< 30	< 30	< 30	90
		3	< 30	< 30	< 30	118
		4	41	45	< 30	< 30
		5	246	240	214	378
		6	32	61	1080	1240
Cu	500	1	< 20	< 20	< 20	93
		2	< 20	< 20	169	401
		3	< 20	< 20	96	262
		4	< 20	< 20	88	347
		5	< 20	< 20	< 20	83
		6	< 20	< 20	< 20	167

Srovnání sledovaných parametrů u výluhu typu A s limitními hodnotami podle vyhlášky č. 383/2001 Sb. vede k závěru, že ve všech sledovaných parametrech vzorky vyhovují třídě vyluhovatelnosti I. Těmto limitním koncentracím vyhovují i koncentrace sledovaných analytů ve výluhu typu B. Pokud se zohlední nejistota stanovení jednotlivých prvků a příspěvek celého postupu přípravy výluhu k celkovému rozptylu experimentálních dat, znamená to, že změna postupu přípravy výluhu při zachování stejného činidla

– vody – nemá na množství prvku přecházejícího do extraktu u sledovaných vzorků rozhodující vliv. Závěr potvrzují také hodnoty pH a konduktivity výluhů typu A a B. Ze srovnání výluhu připraveného podle vyhlášky 338/1997 Sb. (výluh A) a postupu TCLP s odpovídajícím extrakčním činidlem (výluh C) vyplývá, že u všech prvků a typů popílků nedošlo k výraznějšímu vyluhování v extraktu podle TCLP.

Z koncentrací sledovaných prvků v extraktu byl vypočten vyloužený podíl polutantu podle vztahu:

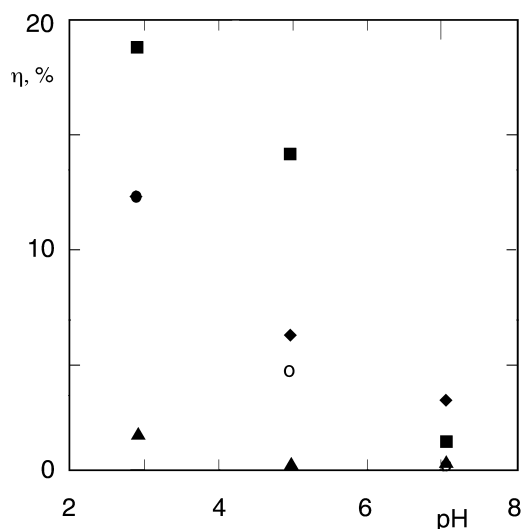
$$\eta = \frac{w_1}{w_s} [\%] \quad (1)$$

kde  $w_1$  [hm.%] je koncentrace vylouženého polutantu do roztoku po přepočtu na tuhou fázi,  $w_s$  [hm.%] původní koncentrace polutantu v sušině vzorku. Srovnání vylouženého podílu Mn, Zn, V a Cu z jednotlivých vzorků připravených postupem popsaným v metodice TCLP (výluhy B, C a D) na pH extrakčního činidla uvádějí obr. 1 až 6. Na grafických závislostech není uveden vyloužený podíl Fe, protože se ve všech případech blíží nule. Rovněž vyluhování V ze vzorků popílků vzniklých spálením hnědého uhlí (vzorky 2-4) není výrazné u žádného z použitých extrakčních činidel. U vzorků popílků vzniklých spálením černého uhlí vyloužený podíl V dosahoval až 20 % v případě použití extrak-

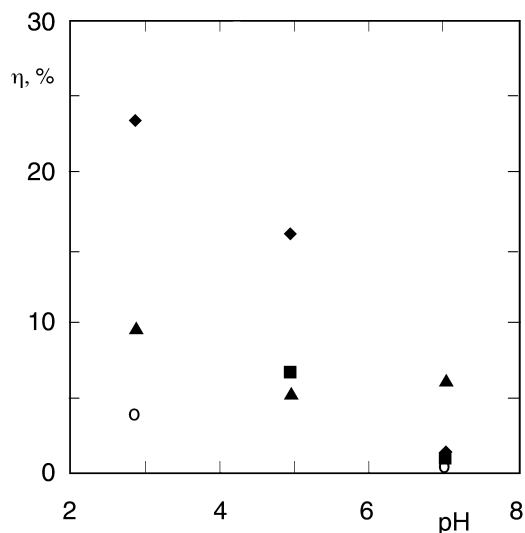
čního činidla o pH 2,88. Vyluhování zinku a manganu jednoznačně u všech typů popílků závisí na pH extrakčního činidla a vyloužený podíl výrazně vzrostl s použitím kyselějšího extrakčního činidla. Vliv pH extrakčního činidla na vyluhování mědi se výrazněji projevil jen u vzorků popílků z hnědého uhlí.

### Závěr

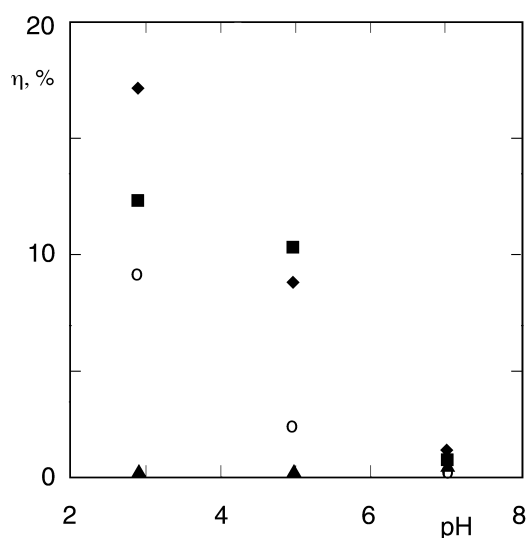
V předložené práci bylo porovnáno množství vyloužených vybraných anorganických polutantů z elektrárenských popílků zachycených na elektrofiltrech. Popílků vznikly spálením lignitu, různého hnědého a černého uhlí v elekt-



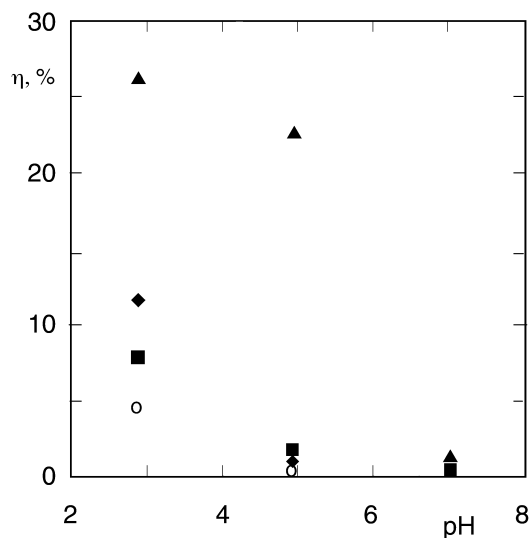
Obr. 3: Vyloužený podíl sledovaných prvků z popílku po spálení hnědého uhlí (vzorek č. 3), ◆Mn, ■Zn, ▲V, ○Cu



Obr. 5: Vyloužený podíl sledovaných prvků z popílku po spálení černého uhlí (vzorek č. 5), ◆Mn, ■Zn, ▲V, ○Cu



Obr. 4: Vyloužený podíl sledovaných prvků z popílku po spálení hnědého uhlí (vzorek č. 4), ◆Mn, ■Zn, ▲V, ○Cu



Obr. 6: Vyloužený podíl sledovaných prvků z popílku po spálení černého uhlí (vzorek č. 6), ◆Mn, ■Zn, ▲V, ○Cu

rárnách vybavených roštovým způsobem spalování. Popílkby byly louženy podle předpisu 338/1997 Sb. a metodikou popsanou v předpisu TCLP. Podle postupu předpisu TCLP byly připraveny vodné extrakty a extrakty s výchozím pH 2,88 a pH 4,93. Bylo sledováno vyluhování Fe, Mn, Zn, V a Cu. Z provedených experimentů vyplývá:

- srovnáním postupu přípravy vyluhu podle vyhlášky 383/2001 a metodiky TCLP, kdy byla použita voda jako extrakční činidlo, nebyla prokázána závislost mezi vylouženým množstvím prvku a metodou přípravy,
- aplikací vyluhovací procedury TCLP nebylo u žádného typu popílku a sledovaných prvků dosaženo výraznějišího vylouženého podílu, což svědčí o existenci stabilních sloučenin sledovaných prvků,
- množství sledovaných polutantů uvolněných do extrakčního činidla určuje typ popílku a tedy i uhelné hmoty, jehož spálením popílek vznikl.

*Autoři práce děkují grantové agentuře (grant č. CEZ 279 000017) za finanční podporu.*

#### LITERATURA

1. Tessier A., Campbell P. G. C., Bisson M.: *Anal. Chem.* 51, 844 (1979).
2. Kirby C. S., Rimstidt D. J.: *Environ. Sci. Technol.* 27, 652 (1993).
3. Calvet R., Burgeois S., Msaky J. J.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 39, 3 (1990).
4. Jaroš P., Hodslavská J., Dirz J.: *Chem. Listy* 93, 639 (1999).
5. *Metodický pokyn pro stanovení vyluhovatelnosti odpadů*. Příloha zpravodaje MŽP ČR, č. 9, str. 1 (1998).
6. Jaroš P., Hamalová M.: *Chem. Listy* 93, 806 (1999).
7. *Příloha č. 4 k vyhlášce č. 383/2001 Sb. Hodnocení vyluhovatelnosti odpadů*. Vyhláška Ministerstva životního prostředí o podrobnostech nakládání s odpady. MŽP, Praha 2001.
8. *Vyluhovací procedura TCLP (toxicity characteristic leaching procedure) pro charakteristiku odpadních materiálů*. Manuál podle US EPA 1311 a materiálů firmy Millipore. CAL VŠB-TUO, Ostrava 1994.

**J. Seidlerová, M. Nováčková, and Z. Weiss** (*Institute of Materials Chemistry, Technical University, Ostrava*):  
**Assessment of Fly Ashes by TCLP Leaching Test**

Leaching of iron, manganese, zinc, vanadium and copper from fly ashes from lignite, black and brown coal in power stations with grate combustion was compared. The ashes were leached according to the regulation 338/1997 by the method described in a US EPA directive, with aqueous and reagent extracts at pH 2.9 and 4.9. The performed experiments proved that the method of preparation of aqueous extracts has no influence on the amount of a leached metal. The amounts of a metal leached by the toxicity characteristic leaching procedure (TCLP) in dependence on pH of the extraction reagent differ for the studied metals and fly ashes types.

## ZPRÁVY

### BŘEZNOVÝ NORIMBERK VE ZNAMENÍ CHEMICKÝCH VELETRHŮ

Ve dnech 16. – 18.3. 2004 se konají v Norimberku významné odborné veletrhy a mezinárodní kongresy. Bude se jednat o tři dny hektického veletržního dění. Současně bude totiž probíhat mezinárodní veletrh pro mechanické procesní technologie a analytiku POWTECH 2004 spolu s mezinárodním odborným veletrhem pro vývoj, výrobu a analýzu farmaceutických, kosmetických a dietetických výrobků i produktů pro zdravou výživu TechnoPharm 2004 a mezinárodním odborným veletrhem pro tematiku zabezpečení proti explozím a bezpečnost zařízení ExploRisk 2004. Veletrh POWTECH má již po léta vedoucí postavení pro tematiku technologií sypkých, práškových a granulátových materiálů a poskytne aktuální přehled o vývoji oboru, ve kterém se výroba, zpracování a testování mikro-, submikro- a nanočástic vyznačuje krátkými inovačními cykly. Na tomto veletrhu se očekává účast více než 500 vystavovatelů. TechnoPharm je označován jako nejdůležitější evropský veletrh pro pracovníky vývoje, výroby a analytiky kosmetických a dietetických produktů. Kromě odborného veletrhu s více než 200 vystavovateli se současně koná mezinárodní kongres International

Meeting of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 2004. Veletrh ExploRisk nabízí výrobky a služby pro zabezpečení proti explozím a doplňuje vhodně nabídku ostatních dvou veletrhů.

Souběžně s těmito veletrhy se koná světová konference s tematikou úzce navazující na veletržní program. Kongres PARTEC 2004 je již dlouhá desetiletí světovým setkáním pro všechny, kteří se zabývají problematikou technologie částic. Jsou to nejen badatelé a experti na částice, ale především uživatelé pigmentů, moderních filtrů, multifunkčních částic, katalyzátorů, farmak či keramických a biotechnologických výrobků. Nedílnou součástí tematického spektra kongresu PARTEC jsou i nanotechnologie. Právě těmto technologiím je vymezen na kongresu značný prostor a budou obsahem hlavních přednášek, více než dvou set posterů a dalších četných odborných přednášek. Podrobnější informace o jednotlivých akcích lze nalézt na internetových stránkách [www.powtech.de](http://www.powtech.de), [www.technopharm.de](http://www.technopharm.de), [www.explorisk.de](http://www.explorisk.de) a [www.partec2004.de](http://www.partec2004.de).

*Pavel Chuchvalec*

**OBSAH**

<b>ÚVODNÍK</b>	67
<b>REFERÁTY</b>	
<b>Kde roste adamantan</b>	68
R. Vícha a M. Potáček	
<b>Unikátní lipidy a struktury membrán archaeobaktérií</b>	75
L. Čuboňová a P. Šmigáň	
<b>Postupy izolace polyaromatických uhlovodíků a polychlorovaných bifenylů při jejich stanovení</b>	80
J. Mikošková, L. Čáp a K. Lemr	
<b>Hodnotenie úspešnosti laboratorných metód</b>	86
B. Balla, J. Mocák, E. Varmusová, D. Kavková a I. Tudík	
<b>Optimalizace analytických postupů pomocí Plackettova-Burmanova plánu</b>	92
M. Holík	
<b>Hans Hellmann: životní příběh vědce ve 20. století</b>	98
R. Zahradník	
<b>Pyridoxalfosfát - katalyzátor přeměny aminokyseliny</b>	102
M. Marková a B. Králová	
<b>CHEMICKÝ PRŮMYSL</b>	
<b>Hodnocení popílku pomocí vyluhovacího testu „Toxicity characteristic leaching procedure“</b>	108
J. Seidlerová, M. Nováčková a Z. Weiss	
<b>ZPRÁVY</b>	113

**CONTENTS**

<b>EDITORIAL</b>	67
<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Where Adamantane Grows</b>	68
R. Vícha and M. Potáček	
<b>Unique Lipids and Structures of Membranes in Archaeobacteria</b>	75
L. Čuboňová and P. Šmigáň	
<b>Isolation Procedures for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls</b>	80
J. Mikošková, L. Čáp, and K. Lemr	
<b>Assessment of Outcome of Laboratory Methods</b>	86
B. Balla, J. Mocák, E. Varmusová, D. Kavková, and I. Tudík	
<b>Optimization of Analytical Procedures with Plackett-Burman Design</b>	92
M. Holík	
<b>Hans Hellmann: Life Story of a Scientist in the 20th Century</b>	98
R. Zahradník	
<b>Pyridoxal Phosphate in Enzymatic and Non-Enzymatic Catalysis</b>	102
M. Marková and B. Králová	
<b>CHEMICAL INDUSTRY</b>	
<b>Assessment of Fly Ashes by TCLP Leaching Test</b>	108
J. Seidlerová, M. Nováčková, and Z. Weiss	
<b>NEWS</b>	113

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 98 (2004), čís./no. 2 • 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 • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Heflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: M. Bláhová, M. Ferles, B. Valter, I. Valterová, Webové stránky: R. Liboska, P. Zámotný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (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, J. Churáček, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžicka, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZAŠÍLÁNÍ 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 OPŘEDPLATNĚM, 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 A REPRO: Petr Martin - AGEMA, Lípová 4, 120 00 Praha 2, • 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 zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností.