

**Chemie?!?**

*I v takovém malém státečku, jakým bezpochyby Česká republika je, naleznete stovky gymnázií a podobných středních škol se všeobecným zaměřením. Jejich cíl je jediný – připravit své studenty pro studium na vysokých školách. Z nejruznějších průzkumů a statistik je patrné, že absolventi gymnázií jsou opravdu u přijímacích řízení úspěšnější. Ale má to jeden háček – čtyři roky studujete, složíte maturitu – a jste nic. Nenajdete uplatnění, hodíte se maximálně pro podřadné pomocné práce, všichni od vás očekávají diplom.*

*Také já patřím mezi studenty gymnázia. Proplouvám jím se slušnými výsledky, ale stále častěji si kladu stejnou otázku jako stovky mých vrstevníků – co dál? Od začátku tihnu spíše k přírodním vědám, zejména k chemii. Podle mého názoru se na tento obor často zapomíná, což je velká škoda. Zkuste se zeptat deseti středoškoláků na to, co se jim vybaví, když se řekne chemie. Dám krk za to, že minimálně devět z nich si představí jeden z nejnenaviděnějších předmětů, jímž každý opovrhne a který si nezaslouží více pozornosti než dvě vyučovací hodiny týdně. A přesto – znám řadu lidí, kteří chemii doslova žijí, podřizují jí celý svůj život a vidí v ní víc než jen pouhou vědu – nacházejí hluboký a ušlechtilý kontáček. Já mám to štěstí, že patřím mezi ně.*

*Všechno to začalo poměrně jednoduše. V tercii mi chemička nabídlá k nahlédnutí olympiádu. Od malička ráda zkouším všechno nové, a tak jsem se pustila do řešení. Moc se mi to sice nezdařilo, přeci jen se projevila konkurence o rok starších devátáků, ale už v kvartě jsem se dokázala probít do krajského kola a obsadit jedenáctou příčku. O rok později jsem se vyšvihla až na třetí místo a to pro mě znamenalo zásadní zvrat. Získala jsem totiž přihlášku na prázdninové odborné soustředění pro nejlepší řešitele oblastních kol chemické olympiády. Koná se už přes dvacet let v Běstvině mezi Golčovým Jeníkovem a Sečí – v podhůří CHKO Železné hory. Vždy na čtrnáct dní se sem sjíždějí chemičtí nadšenci z celé republiky. Jako ostatní nováčci, držela jsem se i já zpočátku trochu stranou, všichni se totiž shlukli do skupinek a začali rokovat o organických syntézách, komplexometrických titracích a enzymových katalýzách jako by se nechumelilo. Brzy jsem se však adaptovala a poznala, že k sobě máme všichni velmi blízko, spojuje nás totiž společný zájem – chemie. Kdo jiný by vydržel osm hodin denně na přednáškách z organické, anorganické, fyzikální či analytické chemie? Kdo jiný by se v největším červencovém vedru navlékl do pláště a vařil komplex stříbra v oxidačním stavu dvě? Kdo jiný by po tom všem nadšeně utíkal každou volnou chvíli strávit do laboratoře? Opravdu, laboratoř stála v centru veškerého dění. Tady se vařilo a vařilo, diskutovalo či jen tak posedávalo.*

*Těch čtrnáct dní mě naplnilo něčím dosud nepoznaným. Našla jsem zde spoustu opravdových přátel, kteří by za mě dali ruku do ohně. Pochopila jsem, že chemie má mnoho tváří a že*

*i tříhodinová přednáška dokáže být zajímavá od začátku do konce. Po návratu domů se najednou v mém nitru rozprostřel pocit prázdnoty a nevyužití. Chodila jsem od ničeho k ničemu, v každé činnosti viděla marnost. Jedinou útěchou byly dopisy a pohledy ze všech koutů republiky, které svědčily o tom, že noví kamarádi na tom byli podobně. Přesto jsme se dokázali vzchopit a od září zahájili novou velkou aktivitu, jež nás všechny spojuje. Ta věcíčka má zcela nepoetický název Ksicht. Bystřejším z vás možná dojde, že se jedná o zkratku. Ale dám hlavu za to, že ji nikdo nerozluštíte. KSICHT totiž znamená Korespondenční Seminář Inspirovaný Chemickou Tematikou. Organizují ho studenti VŠCHT, bývalí řešitelé chemické olympiády a absolventi Běstviny. Během letošního roku jsme řešili čtyři série po pěti úlohách, které byly naprosto odlišné od tradičních školních příkladů typu „vypočítej molární koncentraci roztoku...“. Mezi nejzajímavější úlohy patřila genetická šifra, výpočty s výbušninami, určování stáří archeologického nálezu pomocí radiouhlíkové metody, hledání struktury neznámého alkaloidu či chemická osmisměrka. Pro nejlepší soutěžící je odměnou týdenní soustředění koncem června na VŠCHT v Praze. Seznámí se zde s autory Ksichtu, hlavně ale s prací v laboratořích a se školou vůbec. Od září se rozeběhne nový ročník, opět naplněný báječnými úlohami. Navíc jej bude doprovázet seriál o jedech a omamných látkách k prohloubení znalostí všech řešitelů. Ale také k pobavení. Vždyť koho by nezajímalo, čím byli otráveni dávní vojenští hrdinové, hrabata, političtí vězni? Kdo by si nepřečetl o účinných neznámějších jedů a omamných látek?*

*Jsem spíše introvertní, hodně hloubavý typ, a tak často přemýšlím o své budoucnosti. Nejasně se přede mnou rýsuje, jakoby vyvstává z oblaku mých myšlenek a já se jí snažím dát jasnější a ostřejší tvar. Už vím, že bych ráda studovala nějaký přírodovědný obor související s chemií. V seznamu takto zaměřených vysokých škol mě nejvíce zaujala právě Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Jak jsem již psala, od myšlenky nemám daleko k činu, a tak jsem se vypravila na soukromý den otevřených dveří, abych tuto školu lépe poznala. Vlastně ani nevím, co jsem si od toho představovala, ale skutečnost mě doslova ohromila. Velmi příjemné uvítání, rozhovor s profesorem Červeným, proděkanem Fakulty chemické technologie, který nás seznámil s historií školy, vlastním studiem a možnostmi, jež se před studenty otevírají, a poté prohlídky jednotlivých pracovišť, laboratoří a učeben. Všude na nás byli velmi milí, jednotliví zaměstnanci nám vyprávěli o své práci, případně i ukazovali něco v praxi, od dalších jsme získávali informace o oborech, ve kterých se absolvent může uplatnit. Všichni lidé, se kterými jsme za ten den mluvili, otvírali stále jedno stejné téma – v dnešní době upadá zájem o přírodní a technické disciplíny, společnost je přesycena právníky a ekonomy, přesto se další tisíce novopečených ma-*

*turantů hrnou na tyto posty. Chemie stojí daleko vzadu, opovrhovaná a odstrčená. Studentů je málo, a ti, kteří přijdou, sem často ani nechtějí, ale na jinou školu se nedostali. Málokdo si ale umí představit, co znamená studovat chemii na vysoké škole. Asi se nedá srovnat s tím středoškolským předmětem, kde se probírají základy obecné, anorganické, organické chemie a biochemie. Na vysoké škole poznáte chemii v naprosto odlišném světle. VŠCHT nabízí takové spektrum studijních oborů, že si může každý vybrat, co je pro něj zajímavé, a navíc i moderní knihovnu, počítačové učebny, mineralogickou sbírku, útulné koleje... Zvláště lákavá je možnost studia na zahraničních univerzitách spolupracujících s VŠCHT (namátkou např. v USA, Kanadě, Velké Británii, Holandsku, Francii, Norsku, Německu, Rakousku nebo Slovensku). Nejlepší stu-*

*denti mají možnost získat stipendium, řada z nich pak pokračuje tříletým doktorským studiem a ti, kteří se ani poté se školou nechtějí rozloučit, se mohou ucházet o kariéru vysokoškolského pedagoga. Nám, Běstviňákům, se podařilo dosáhnout toho, že škola od září otevře kroužky pro středoškoláky, plné zajímavých informací a laboratorních cvičení, během kterých jistě pronikneme ještě hloub do nitra školy a hlavně do nitra toho, čemu se říká chemie.*

*Já už mám o své budoucnosti jasno, a co vy? Nezkusíte se v listopadu podívat na den otevřených dveří VŠCHT? Na náš kroužek? Nebo alespoň na zadání Ksichtu či chemické olympiády???*

*Petra Měnová*

# STEROIDY NA ZAČÁTKU JEDENADVACÁTÉHO STOLETÍ\*

ALEXANDER KASAL

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
e-mail: kasal@uochb.cas.cz

Došlo 2.4.02, přepracováno 30.12.02, přijato 15.5.03.

Klíčová slova: steroidy, přírodní látky, parciální syntéza, biologická aktivita, enantiomery

## Obsah

1. Úvod
2. Nomenklatura a způsob zobrazování struktur
3. Steroidy jako součást oboru přírodních látek
4. Steroidní evergreeny (estrogeny, „DHEA“, feromony)
5. Syntéza přírodních látek steroidní řady (skvalamin, 2-methoxyestradiol, cefalostatin a ritterostatin)
6. Syntéza analogů biologicky aktivních steroidů (cíle: separace aktivit, zvýšení biologické aktivity, potřeba většího množství látky)
7. Syntéza sloučenin obsahujících steroidní molekulu jako stavební blok
8. Závěr

## 1. Úvod

Tento kurz není určen specialistům v oboru steroidní chemie, ale lidem, kteří mohou na steroidní problematiku narazit zcela náhodně. Takový přístup ke steroidům je poměrně pravděpodobný, když si uvědomíte, kolika třeba fyzikálních oborů se steroidy týkají. Vždyť u nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotové spektroskopie (MS) byly obecně platné zákonitosti poznávány právě na steroidech, které poskytovaly vhodné rigidní modely. Totéž platí o chirálních metodách, optické rotační disperzi (ORD) a cirkulárním dichroismu (CD). A kolik oborů lékařství se steroidy týkají, když mezi nimi nacházíme endogenní látky s aktivitou mužských a ženských pohlavních hormonů, hormonů kůry nadledvinek, vitaminů, důležitých složek buněčných membrán či trávicího systému. A kolik exogenních steroidů, ať už přírodních (kardenolidy, bufadienolidy, alkaloidy) či syntetických (anabolika, abortiva) na zdraví moderního člověka v současné době působí.

Tento postgraduální kurz probíhá na tomto ústavu téměř čtvrt století a přednášku o steroidech tu pronesl Dr. Václav Černý přesně před 20 lety<sup>1</sup>. Měl bych navázat tam, kde on skončil, ale protože vím, že laik si dnes chybějící informace nachází především na internetu, začnu shrnutím současně používané nomenklatury, aby se posluchač byl schopen s in-

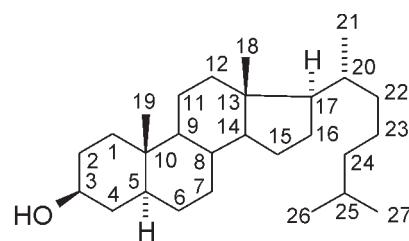
ternetem domluvit. Nomenklatura podle Chemical Abstracts není v současné literatuře používána beze zbytku, proto ji doplním nomenklaturou starou, která přežívá díky pracovníkům příbuzných oborů, jako je medicína a biologie.

## 2. Nomenklatura a způsob zobrazení struktur

Nejprve způsob grafického znázornění: číslování jednotlivých poloh je ukázáno na vzorci 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -olu (obr. 1). Číslování začíná od šestičlenného kruhu vlevo a pokračuje po obvodu. Je-li připojení substituentů ke skeletu vyznačeno plným klínem, směřují tyto substituenty nad rovinu steroidního jádra a v názvu jsou označeny jako  $\beta$ -substituenty, vazba substituentů pod rovinou jádra (tedy s  $\alpha$ -konfigurací) je značena šrafovaně. Většina steroidů je odvozována od těchto několika základních steroidních uhlovodíků (tabulka I).

Substituce v postranním řetězci bývala vyjadřována podle Fischerovy-Plattnerovy notace, v níž byla molekula v uvažovaném místě nazírána tak, jakoby nejdelší řetězec byl natažen vzhůru a prohnut dolů jako luk: na dolním konci zůstával steroidní skelet, na horním konci byl vzdálenější uhlík sousedící s uvažovaným centrem chiralidy. V této konformaci řetězce byly substituenty vpravo (a vlastně nahoru) definovány jako  $\alpha$ -substituenty, substituenty mířící vlevo (také nahoru) jako  $\beta$ -substituenty. Např. cholestanový postranní řetězec byl znázorňován vzorcem A (obr. 2). Mnohem méně místa v tisku zabere cik-cak struktura B, která je také bližší nejpravděpodobnějšímu konformeru tohoto postranního řetězce. Tehdy se  $\beta$ -substituenty značily plnou vazbou. V současnosti ale používáme projekční vzorce zřetelně vyznačující stereochemii, a tak se tato 20R-methylová skupina kreslí čárkovaně (tedy v přehledu uhlovodíků vzorec C). Ale díky tomuto historicky danému dvojímu přístupu (definovaná notace vs. projekční vzorec) se v literatuře vyskytují oba vzorce cholesterolu a jeho derivátů přibližně stejně často, protože autoři většinou staré struktury opisovali ze starých monografií, aniž uvádějí pojmový rámec těchto struktur.

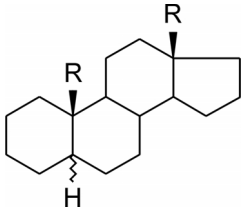
U molekuly, v níž je dalších 8 asymetrických uhlíků, se ujal zvyk vyjadřovat konfiguraci na těchto uhlících jen tehdy, je-li jiná než tzv. přirozená. Mlčky se tedy předpokládá, že každý ví, že  $\beta$ -konfiguraci zaujímá „normálně“ jen vodík H-8,



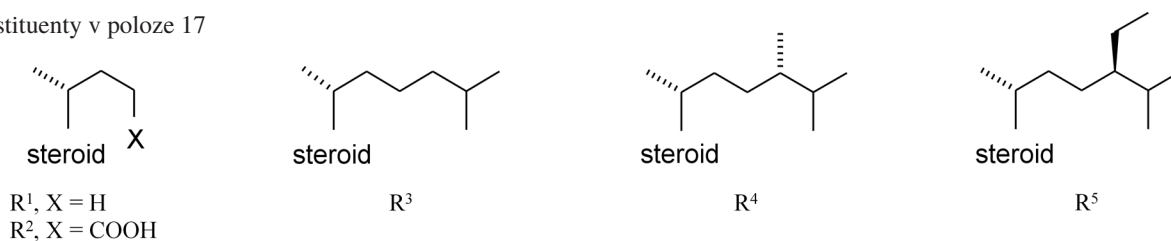
Obr. 1. Strukturální vzorec 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -olu, číslování skeletu

\* Předneseno na postgraduálním kurzu *Chemie a biochemie přírodních látek*, který pořádal ÚOCHB AV ČR v roce 2002.

Tabulka I  
Skelety tvořící názvoslovný základ tetracyklických steroidů

	Substituenty v polohách			Název uhlovodíku (starší název v závorce)
	19	18	17	
	H	H	–	5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -gonan
	H	methyl	–	5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -estran (5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -oestran)
	methyl	methyl	–	5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -androstan (androstan či testan)
	methyl	methyl	ethyl	5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -pregnan (allopregnan či pregnan)
	methyl	methyl	R <sup>1</sup>	5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -cholan (allocholan či cholan)
	methyl	methyl	R <sup>2</sup>	5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -cholanová kyselina (allocholanová či cholanová kyselina)
	methyl	methyl	R <sup>3</sup>	5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -cholestan (cholestan či koprostan)
	methyl	methyl	R <sup>4</sup>	5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -ergostan
	methyl	methyl	R <sup>5</sup>	5 $\alpha$ - či 5 $\beta$ -stigmasteran

Substituenty v poloze 17

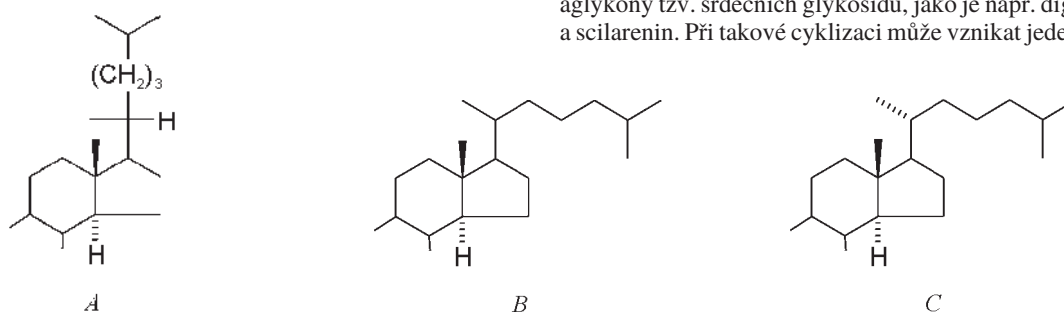


angulární methylové skupiny a eventuelně i uhlíkatý substituent v poloze 17. Tzv. normální je  $\alpha$ -konfigurace u H-9 a H-17. Většina přírodních steroidů má *trans* anelaci kruhů C a D, tedy v poloze 14 je vodík v poloze  $\alpha$ , ale v případě srdečních glykosidů a bufadienolidů se vyskytuje u kruhů C a D *cis* anelace, tedy C14-konfigurace je obrácená (14 $\beta$ -H).

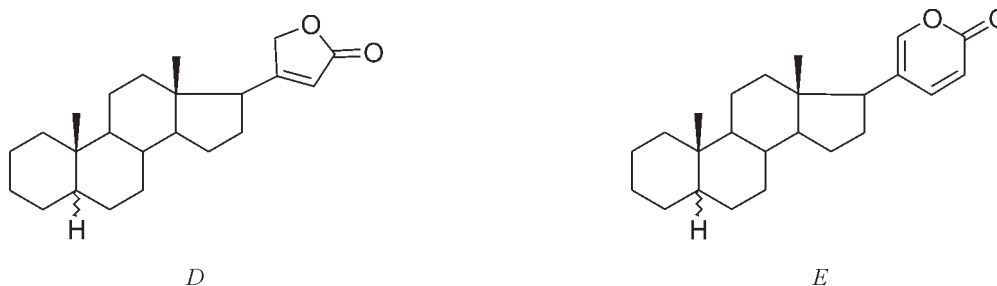
Látky s 5 $\alpha$  i 5 $\beta$ -konfigurací se v přírodě vyskytují s přibližně stejnou četností, a nedá se tedy u polohy 5 obecně

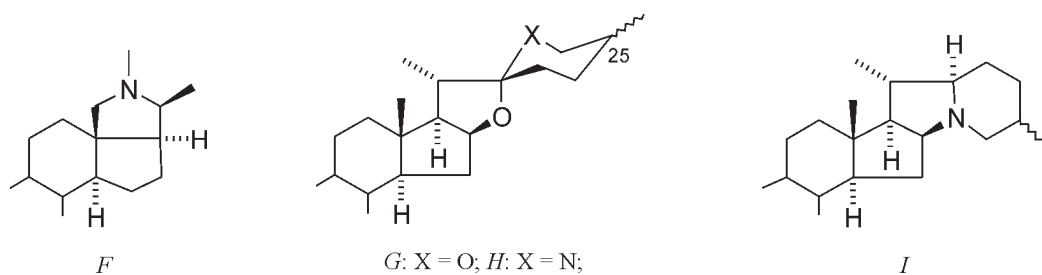
mluvit o „přirozené“ konfiguraci. Proto konfiguraci v této poloze je vždy třeba explicitně vyznačit. Zase se stává, že tento požadavek není vždy splněn, nejčastěji na to zapominají autoři, kteří netuší, že může existovat i diastereomer jejich produktu. Týká-li se určitý výrok obou diastereomerů, kreslíme vazbu vlnitou a používáme další řecké písmeno  $\xi$ .

Postranní řetězec steroidu může být i substituován heterocyklem a cyklizován. 5 $\xi$ -Kard-20(22)-enolid (D, obr. 3) a 5 $\xi$ -bufa-20,22-dienolid (E) jsou nomenklaturním základem pro aglykony tzv. srdečních glykosidů, jako je např. digitoxigenin a scilarenin. Při takové cyklizaci může vznikat jeden nebo dva

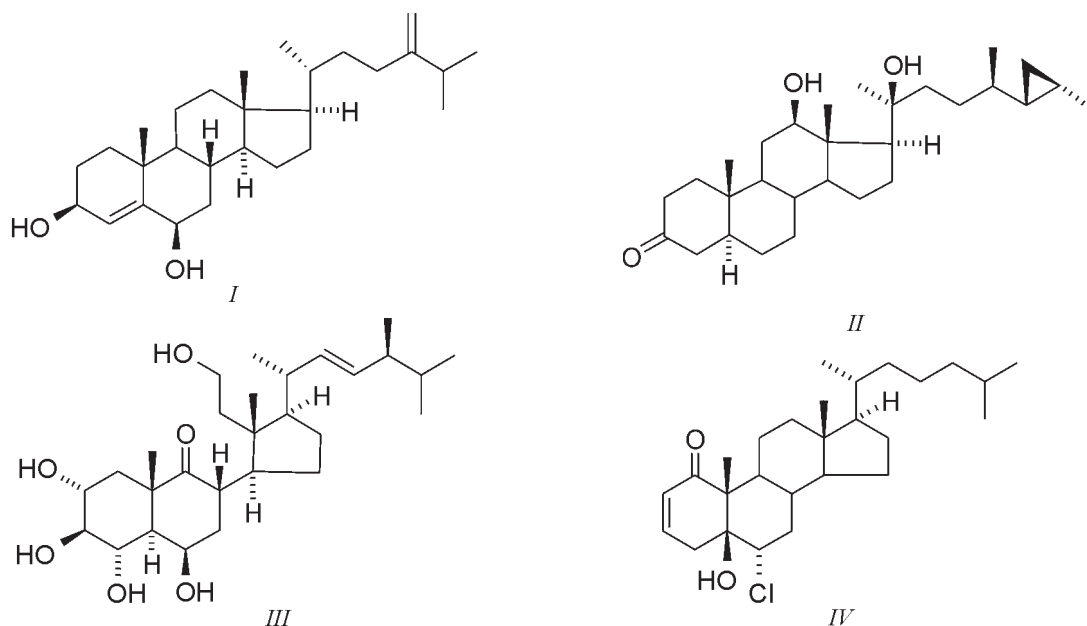


Obr. 2. Kreslení postranního vzorce dříve (A, B) a nyní (C)

Obr. 3. 5 $\xi$ -Kard-20(22)-enolid (D) a 5 $\xi$ -bufa-20,22-dienolid (E)



Obr. 4. 5ξ-Konan (F), 5ξ,25ξ-spirostan (G), 5ξ-spirosolan (H) a 5ξ,25ξ-solanidan (I)



Obr. 5. Nové typy sterolů

anelované heterocykly. Tak např. 5ξ-konan (F, obr. 4) je základem konesinu a jemu blízkých alkaloidů. Spirocyclické skelety – 5ξ-spirostan (G) a 5ξ-spirosolan (H) příroda používá dosti často: typ G se vyskytuje v nejdůležitějším aglykonu, z něhož se ve světě vyrábí většina steroidních léčiv. – diosgenin; dva kruhy jsou anelovány v 5ξ-solanidanu (I), od něhož je odvozena např. struktura solanidinu – alkaloidu vyskytujícího se ve formě glykosidů v různých druzích lilku, např. v bramboru<sup>2</sup>.

Ještě jedno nomenklaturní překvapení Vás může potkat v literatuře: tvůrci některých monografií a databází nebo jejich nakladatelé odmítají znát řecká písmena, takže místo α a β použijí prostě α nebo β. Jejich počítačům to svědčí, uživatelům už méně.

### 3. Steroidy jako součást oboru přírodních látek

Řazení steroidů mezi přírodní látky je věcí historickou, protože dnes už je přírodních steroidů izolovaných z přírody méně než steroidů připravených v laboratořích parciální či totální syntézou. Badatelé zabývající se v první půli minulého století izolací přírodních látek steroidní povahy byli při výběru přírodniny často ovlivněni pouhou náhodou, v závěru století

ale již byli většinou vedeni záměrnou snahou nalézt aktivní princip té či oné léčivé rostliny. I dnes přitom mnohdy obdivujeme intuíci starých kořenářek, které dokázaly odhalit použitelnost těch kterých rostlin.

Profesionálně tento přístup funguje dodnes v zemích třetího světa, kam pronikli agenti farmaceutických firem a zahrnují domorodé odborníky vším možným, jen aby od nich dostávali extrakty co nejširšího spektra produktů z domorodých léčivek. Tito badatelé pak touží po nalezení nové látky, která by byla jen mírně biologicky aktivní: jen tehdy si zajistí pokračování podpory ze strany farmaceutického průmyslu a svůj objev budou moci po nepřilíš dlouhé době publikovat. Nález vysoce aktivní látky se badateli nijak zvlášť nevyplatí, navíc musí slíbit firmě, že látku nebude publikovat po značně dlouhou dobu. Toto je jedním z příkladů toho, jak byly steroidy ze základního výzkumu vytlačovány právě penězi, resp. vidinou zisku z komercializace steroidních výrob. Farmaceutické firmy vyhledávají přírodní látky proto, aby získaly novou inspiraci pro své vlastní nové produkty. *Drug Discovery Today* cituje údaj<sup>3</sup>, že ze všech nových produktů, které byly v letech 1983 až 1994 uvedeny na trh (520), bylo 39 % přírodních látek nebo látek od nich odvozených.

Nově objevené přírodní látky steroidní řady zahrnují větší deriváty cholesterolu, jejichž strukturní proměnlivost je

značná, často zahrnuje např. cytotoxické exomethylenoderiváty (např. látka *I*, obr. 5), antibakteriální cyklopropanoderiváty (jako látka *II*) nebo antifungální sekosteroidy typu *III*. Je známa i řada chlorem substituovaných přírodních látek typu *IV*. Zobrazeny jsou jen některé typy látek, které byly v nedávné době izolovány. Zvláště v poslední době jsou publikovány látky, které pocházejí z cytotoxicky působících materiálů a samy cytotoxicitu vykazují už proto, že postup separace byl řízen podle výsledků biotestů. Např. některé látky z rodiny uvedených 9,11-sekosteroidů typu *III* inhibují aktivitu protein C-kinasy<sup>4</sup>.

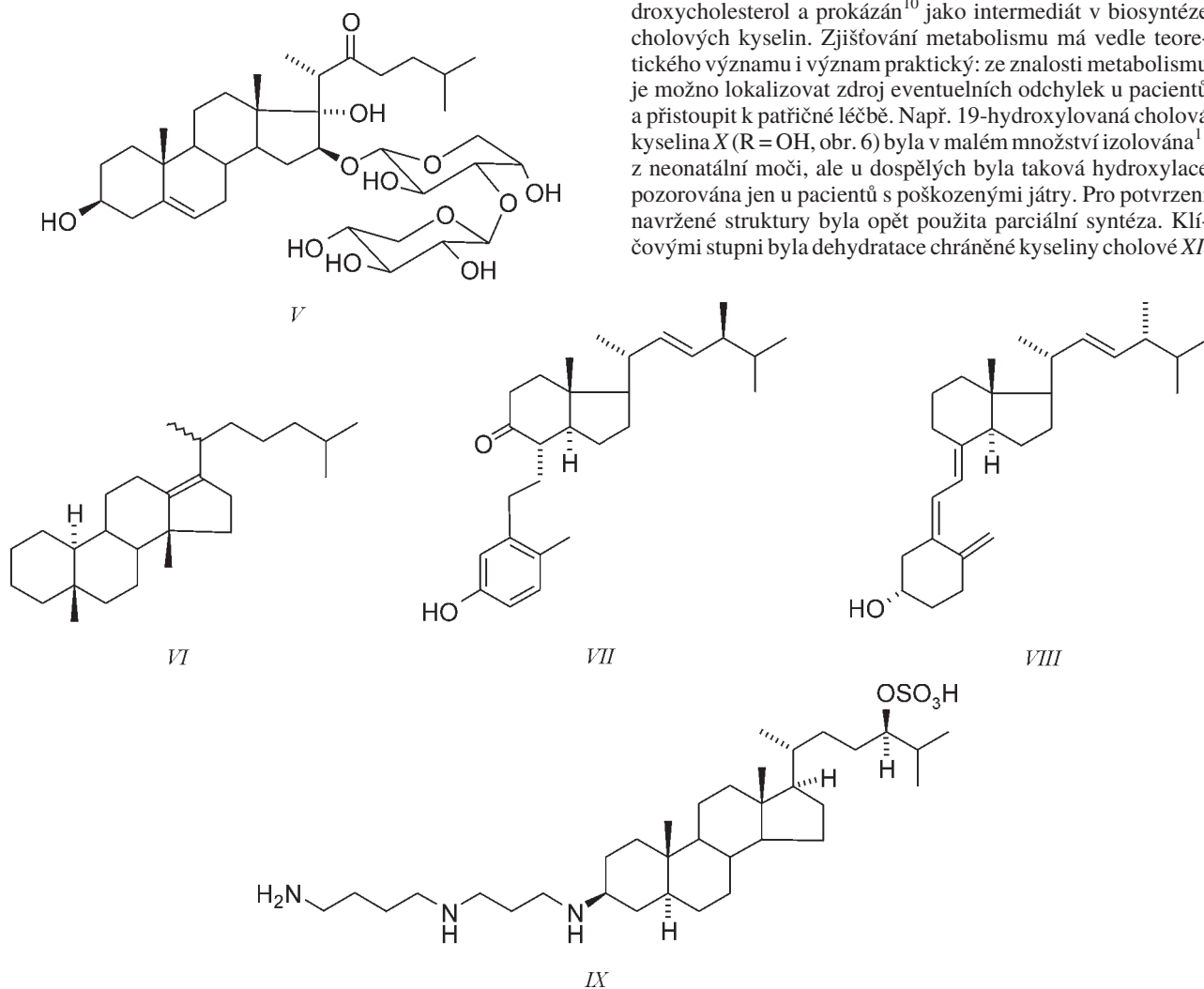
Díky biologickému sledování průběhu dělení bývají teď přírodní látky izolovány v nativní formě (dříve byly hlavně z technických důvodů získávány pouze jejich aglykony). Jednou z takto izolovaných látek s kancerostatickou aktivitou je OSW1 (*V*), derivát cholesterolu s cukerným zbytkem v poloze 16 $\alpha$  a oxoskupinu v poloze 22. Látka byla izolována z cibulek africké rostliny druhu *Ornithogalum* a objev její struktury ihned vyvolal odezvu mezi synthetiky, kteří připravili<sup>5</sup> její aglykon metodou parciální syntézy.

Přírodními látkami jsou vlastně i diacholesteny typu *VI*, protože i ty byly izolovány<sup>6</sup> z materiálů nacházejících se

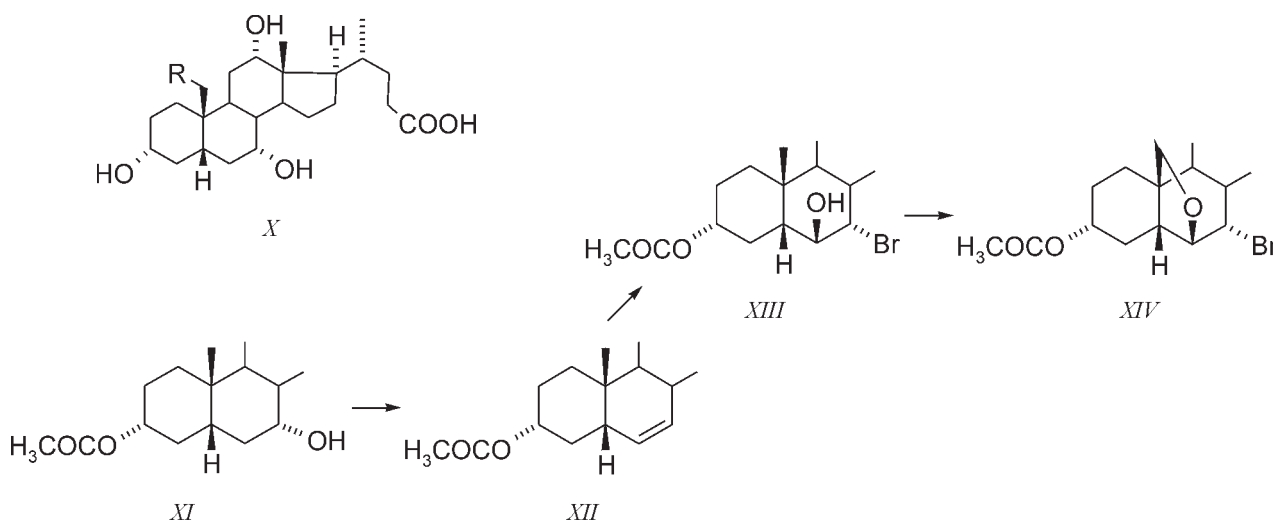
v přírodě (uhlí, ropa a ropné sedimenty). Jsou to produkty transformace sterolů prehistorických organismů na hlinkách za vysokých teplot. Jsou charakterizovány přesunem methylových skupin z poloh 10 a 13 do poloh 5 a 14, což dokážeme napodobit v laboratoři, když generujeme karboniový ion v poloze 5. Vynalézavost i úspornost přírody v tomto smyslu je obdivuhodná. Např. kalikoferol D – látka *VII*, izolovaná z korejské gorgonie<sup>7</sup> rodu *Muricell*, je jen mírně modifikovaným vitamínem D (*VIII*), a přesto působí proti virům Herpes simplex I a II a proti viru dětské obrny.

Pojem přírodní látky často implikoval rostlinný původ těchto látek, což nebylo zcela přesné. Je pravdou, že extrahovat plevel rostoucí na zahradě bylo kdysi jednodušší než izolovat vysoce polární látky ze zvířecích tkání, ale se vzrůstající kvalitou separačních technik rostly i ambice přírodovědců. Izolace<sup>8,9</sup> steroidního triaminu – skvalaminu (*IX*) vyžadovala techniky vzdálené tradiční steroidní chemii, která většinou pracuje s látkami lipofilními. Práce byla stimulována její aktivitou: skvalamin je totiž širokopásmové antibiotikum s kancerostatickou a antivirovou aktivitou (působí i na herpesvir a vir HIV).

Dalším motivem izolace přírodních látek bylo ověřování metabolismu jiných přírodních látek. Tak byl izolován 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol a prokázán<sup>10</sup> jako intermediát v biosyntéze cholových kyselin. Zjišťování metabolismu má vedle teoretického významu i význam praktický: ze znalosti metabolismu je možno lokalizovat zdroj eventuelních odchylek u pacientů a přistoupit k patřičné léčbě. Např. 19-hydroxylovaná cholová kyselina *X* (R = OH, obr. 6) byla v malém množství izolována<sup>11</sup> z neonatální moči, ale u dospělých byla taková hydroxylace pozorována jen u pacientů s poškozenými játry. Pro potvrzení navržené struktury byla opět použita parciální syntéza. Klíčovými stupni byla dehydratace chráněné kyseliny cholové *XI*,







Obr. 6. Funkcionalizace polohy 19 (Ac = acetyl)

adice kyseliny bromné na  $\Delta^6$ -olefin *XII* a fotochemicky katalyzovaná oxidace angulární methylové skupiny v bromhydrinu *XIII* octanem olovičitým, následovaná redukcí bromepoxidu *XIV* zinkem a pak hydrogenací.

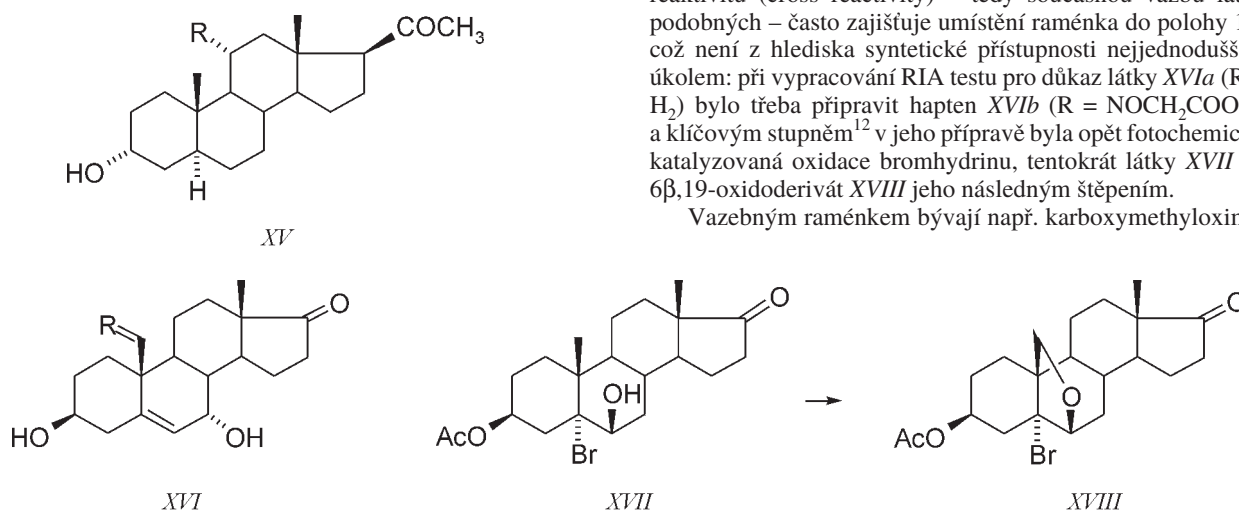
Pro studium osudu biologicky aktivních steroidů v organismu je často potřeba kvalitativní a kvantitativní důkaz přítomnosti nepatrných množství těchto látek v biologickém materiálu. Imunologické metody (např. radioimunologická analýza, RIA) může tyto služby poskytnout. Příklad zředění, s nímž RIA pracuje, byl publikován před letními olympijskými hrami: citlivost metody je taková, že by dokázala přítomnost kostky cukru ve velkém olympijském plaveckém bazénu.

Steroidy ale reprezentují příliš malou molekulu v těle, aby samy byly imunogenní. Proto se při vývoji testů pro imunitní stanovení steroidní látky funkcionalizují (např. zavedením vhodného „raménka“, anglicky „spacer“) na deriváty (tzv. hapteny), které se pak kovalentní vazbou naváží na molekulu vhodné bílkoviny (např. na hovězí imunoglobulin). Vzniklý

produkt (imunogen) slouží k vyvolání imunitní reakce v pokusném zvířeti, z jehož krve jsou pak příslušné protilátky získávány a diagnosticky využívány. Celosvětově rozšířené používání imunoanalýzy ve sportu i v lékařské diagnostice je tak zcela závislé na produkci vhodných haptenu.

Raménkem, které pak zprostředkuje kovalentní vazbu mezi analytem a bílkovinou, je např. volný karboxyl. Umístění tohoto raménka v molekule steroidu je kompromisem mezi chemickou dostupností takové funkcionalizace a požadavkem specificitu protilátky. Má-li protilátka reagovat pokud možno pouze na hledaný analyt, musí být v haptenu zachovány všechny funkční skupiny esenciální pro danou aktivitu a raménko musí být umístěno co nejdále od těchto esenciálních skupin. Polohy 7 a 11 jsou vzdáleny od funkčních skupin A i D-kruhu, a tak jsou často využívány pro zakončení takového raménka. Např. pro stanovení allopregnanolonu (*XVa*, R = H, obr. 7) bylo nutno připravit haptenu *XVb* (R = CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH), ale cesta k němu musela být zahájena mikrobiální hydroxylací vhodného intermediátu do polohy 11 $\alpha$ . Minimální zkříženou reaktivitu (cross reactivity) – tedy současnou vazbu látek podobných – často zajišťuje umístění raménka do polohy 19, což není z hlediska syntetické přístupnosti nejjednodušším úkolem: při vypracování RIA testu pro důkaz látky *XVIa* (R = H<sub>2</sub>) bylo třeba připravit haptenu *XVib* (R = NOCH<sub>2</sub>COOH) a klíčovým stupněm<sup>12</sup> v jeho přípravě byla opět fotochemicky katalyzovaná oxidace bromhydrinu, tentokrát látky *XVII* na 6 $\beta$ ,19-oxidoderivát *XVIII* jeho následným štěpením.

Vazebným raménkem bývají např. karboxymethyloximi-



Obr. 7. Příprava haptenu s raménkem v poloze 19

no- (CMO), karboxymethoxyloxy- (CME), hemisukcinyloxy- (HMSO) a podobné skupiny. U každého analytu je žádoucí připravit odlišné hapteny pro imunizaci zvířete a pro přípravu radioligandu, aby se potlačila možnost, že by nalezená protilátka byla specifická spíše pro ono raménko než pro vlastní analyt. Hapteny jsou využívány i v afinitní chromatografii. Tak při pátrání po receptoru přírodního brassinolidu byl příslušný brassinosteroid připojen k bílkovině T-aminoalkyl-esterovým raménkem.

#### 4. Steroidní evergreeny

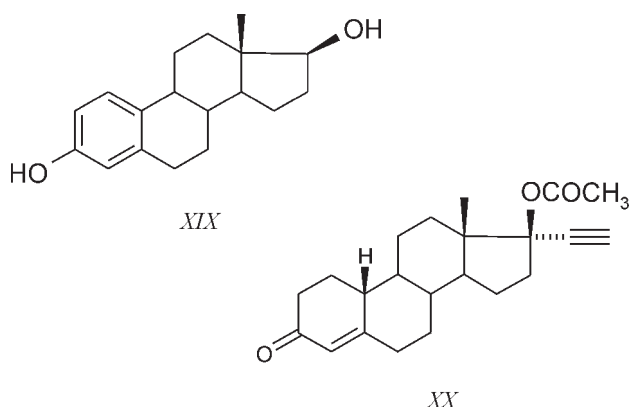
Písne věčně zelené jsou ty, které zazáří, po čase omrzí a pak v nových podmínkách jsou každou novou generací nově objevovány. Jsou to např.:

##### Estrogeny

Jednou z aktuálně sledovaných, ale dávno známých látek je estradiol (estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol, XIX). U fertálních žen je skoro výhradně produkován ve vaječnicích řízených tzv. folikuly stimulujícím hormonem (FSH) a jeho funkce v reprodukčním cyklu je dobře známa. Poměrně nedávno se ale ukázalo, že estradiol hraje významnou roli v metabolismu lipidů (a tím i ve výskytu kardiovaskulárních chorob), v metabolismu kosti (estradiol stimuluje činnost osteoblastů a inhibuje aktivitu osteoklastů, čímž chrání kost před osteoporózou), ve výživě sliznic (s důsledky gynekologickými, urologickými, dermatologickými a otorhinolaryngologickými) a ve funkci mozku. Dlouho jsou známy psychické důsledky nadprodukce estrogenů (náladovost, deprese, nespavost, předrážděnost, nesoustředěnost), nově byla poznána neuroprotektivní<sup>13</sup> role estrogenů v mozku: klinická zkušenost ukazuje, že vyšší hladina estrogenů chrání před nástupem i postupem Alzheimerovy choroby a obecně před poškozením mozku. Mozek dokonce sám v případě určitého poškození zvyšuje jak produkci estrogenů, tak produkci estrogenních receptorů v místě poranění. Mechanismus tohoto ochranného působení není zatím znám, někteří autoři<sup>14</sup> spekulují o tom, že estradiol modifikuje strukturu buněčných membrán.

Všechny tyto oblasti jsou zasaženy při menopauze, při níž dochází k definitivnímu přerušení cyklických interakcí mezi vaječníky, hypothalamem a hypofýzou, při níž už vaječníky nereagují na gonadotropní stimulaci, neprodukují estrogeny ani progesteron a negativní zpětná vazba k hypofýze je zrušena, což vede k vysoké hladině LH a FSH hormonů. Estrogeny pak s nízkým výtěžkem produkují jen nadledvinky, a to aromatizací androstendionu.

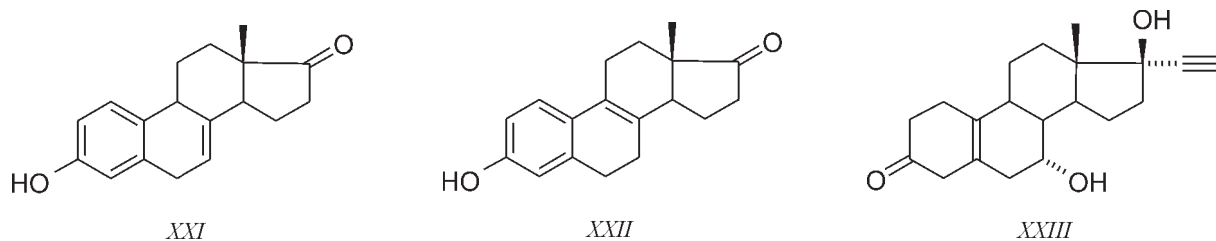
Přehledně články popisují účinky suplementace estradiolu



při zkouškách na mnoha tisících pacientek, kde vedle příznivých kosmetických účinků, vlivu na kardiovaskulární soustavu a úlevu všech postmenopauzálních příznaků (proměnlivé nálady, návaly a bolestivost styku) byly diskutovány i další pozitivní účinky. Nově byl prokázán účinek estrogenů na prevenci osteoporózy: kost je živou soustavou, v níž se znova a znova ustavuje dynamická rovnováha mezi tvorbou nových buněk a resorpcí buněk starých. U žen ve fertálním období je takto “remodelováno,, 10 až 25 % kostní hmoty ročně<sup>15</sup>. Pokud nejsou receptory estrogenů v těchto buňkách syceny estradiolem – ať už vlastním nebo medikovaným, proces resorpce starých buněk probíhá rychleji než tvorba buněk nových.

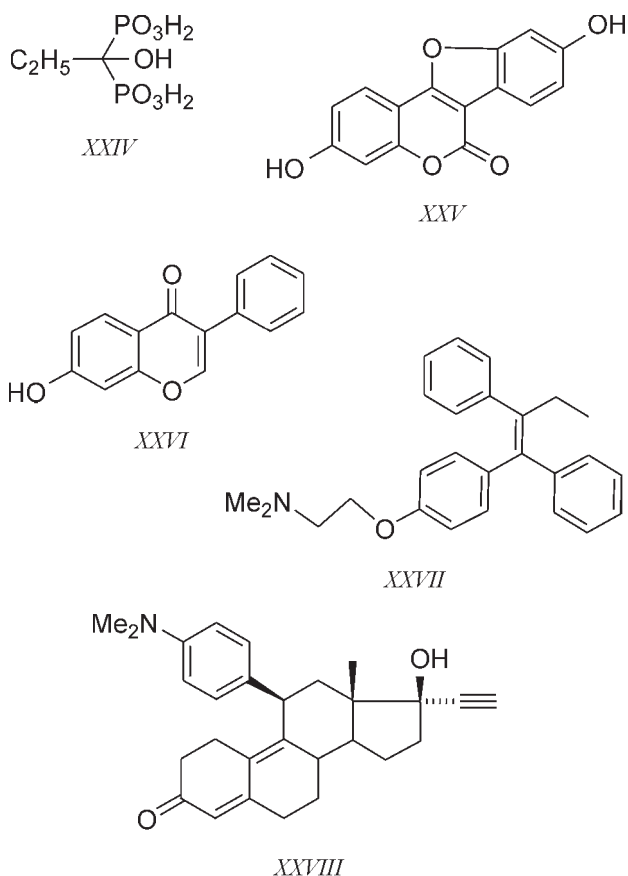
Zásah do hormonální rovnováhy bývá vždy riskantní. Nežádoucím vedlejším účinkem podávání estradiolu po menopauze je zvýšené riziko výskytu rakoviny dělohy. V současné praxi se už podává samotný estradiol jen pacientkám bez dělohy. Ostatní pacientky dostávají s estradiolem i subfyziologické množství gestagenu (např. 17 $\beta$ -acetoxy-17 $\alpha$ -ethinyl-19-norandrost-4-en-3-on, „norethisteronacetát“, XX), který riziko rakoviny dělohy výrazně omezuje. Tato terapie byla ověřována řadou studií na mnoha desítkách tisíc pacientek a ukazuje se, že bonus kardiovaskulární ochrany a snížení rizika rakoviny tlustého střeva je mnohem významnější, než je riziko rakoviny dělohy. I když odhlédneme od zlepšené kvality života uživatelé hormonální substituční léčby (HRT), ukazuje se, že v dlouhodobém pohledu je přežívání těchto pacientek významně vyšší než u žen hormonální substituci neužívajících<sup>16</sup>.

Steroidní chemie reagovala na zvýšenou poptávku po antiosteoporotických léčích syntézou a testováním řady analogů estrogenů. Dobré renomé si v tomto směru získal Premarin, což je estrogenně působící směs získávaná z moči březích kobyli. Převážnou většinu tvoří dehydroestron a dehydroestra-



Obr. 8. Antiosteoporoticky působící steroidy





Obr. 9. Další látky použitelné v boji proti osteoporóze

dioly s jednou dvojnou vazbou v poloze 7 (ekvilin *XXI* a příslušné 17-alkoholy, obr. 8), nebo dvěma dvojnými vazbami v B-kruhu (ekvilenin a příslušné 17-alkoholy). Nově se tvrdí<sup>17</sup>, že isomer ekvilinu s dvojnou vazbu v poloze 8 (9) (*XXII*, „8-dehydroestron“) je sice řádově méně účinný v děložce a v prsu, ale zato 10× účinnější v kosti. Jinak převládá názor, že nejučinnějším estrogenem v tomto směru je ekvilin (*XXI*), který má u člověka menší hormonální aktivitu než estradiol, a tím vyšší terapeutickou účinnost na kost.

Farmaceutický průmysl zatím reagoval po svém na potenciál estrogenů snížit riziko osteoporózy u postmenopauzálních žen. Vedle pilulek, gelu a různých náplastí obsahujících řádově miligramová množství klasického estradiolu a syntetického gestagenu na den, byly vyvíjeny nové analogy. Za všechny uvedu  $7\alpha,17\beta$ -dihydroxy-19-norpregn-5(10)-en-20-in-3-on (*XXIII*, Livial<sup>18</sup>). Měření ukazuje žádoucí nárůst kostní hmoty během jednoho roku léčení. Látka přitom stimuluje hypothalamo-hypofyzární systém tak, že vasomotorické poruchy (návaly, pocení) jsou potlačeny, hladina endorfinů je obnovena, ale endometrium (tedy nechtěné krvácení) stimulovalo není.

Steroidní chemici byli jen jednou částí týmů, které osteoporózu nazíraly z mnoha různých úhlů, aby bylo možno intervenovat při vzniku choroby v různých stádiích vzájemně souvisejících procesů. Tak např. zvýšení dodávky vápenatých solí do kosti zaručovala zvýšená resorpce vápníku ze střev,

kteří bylo dosahováno podáváním peptidického hormonu kalcitoninu. Podobný efekt, byť dosahovaný jiným mechanismem, měly kalcium chelatující bifosfonáty jako etidronát (*XXIV*, obr. 9) a jeho analogy. Jejich dlouhodobé používání přináší však jiná rizika: tyto látky jsou současně inhibitory biosyntézy steroidů<sup>19</sup>.

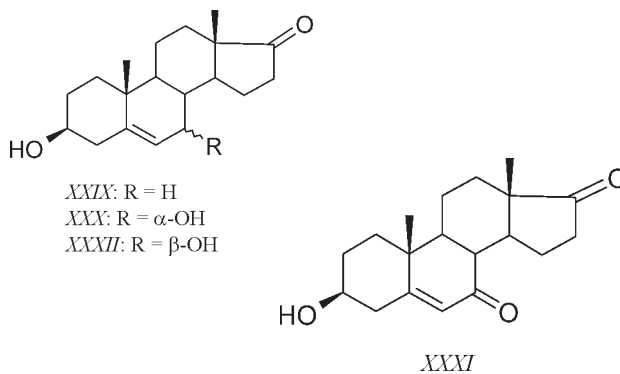
V rostlinné říši byla poznána řada fytoestrogenů, jejichž estrogení aktivita nebyla vždy zcela žádoucí<sup>20,21</sup>. Jedním z fytoestrogenů je kumestrol (*XXV*), je tak strukturně podobný estradiolu, že ho můžeme pojmenovat steroidní nomenklaturou. I u ipriflavonu (*XXVI*) jsou popisovány<sup>22</sup> protektivní účinky vůči kosti. Pěstitelé stád si ovšem kvality kostí svých jatečných zvířat příliš necení, zato ztrátu jejich plodnosti způsobovanou fytoestrogeny nesou nelibě.

Při testování vlivu všech možných kombinací známých látek na kost bylo zjištěno, že tzv. tamoxifen (*XXVII*), který v prsu funguje jako antiestrogen (tedy inhibuje růst estrogen-dependentních nádorů), v kosti působí jako estrogen, tedy udržuje vysokou kostní hmotu. Tamoxifen vzdáleně připomíná estradiol, jeho modernější verzi je ve vodě rozpustnější derivát raloxifen, který zase má nepříznivé účinky na centrální nervovou soustavu. V kosti ale působí příznivě, tlumí činnost osteoklastů, má tedy anti-resorptivní účinky.

Je třeba říci, že na rozdíl od receptorů jiných hormonů jsou estrogení receptory nejméně náročné na přesné dodržení struktury (teprve nedávno byla pomocí rentgenografické analýzy studována struktura komplexu estradiolu a jeho receptoru<sup>23</sup>). Antiosteoporotická aktivita byla nakonec nalezena i u estradiolu nepříliš podobného antigestagenního preparátu RU486 (*XXVIII*, „mifepristone“), který je jinak používán jako abortivum.

## D H E A

Jinou látkou, které se v nedávné době dostalo obrovské pozornosti, je DHEA (dehydroepiandrosteron, tj.  $3\beta$ -hydroxyandrost-5-en-17-on, *XXIX*, obr. 10). O té se napsalo několik knih např. *Unlocking the Secrets to the Fountain of Youth* nebo materiály z konference newyorské akademie věd věnované této látce<sup>24</sup>. V souvislosti s ní se objevují epiteta jako „pramen mládí“, „matka všech hormonů“ apod. Tato látka patří mezi tzv. „orphan drugs“, tedy látky, které svého času nebyly komerčně využity jen proto, že se staly veřejným majetkem, a žádná firma tedy neinvestovala do jejich vývoje, protože neměla zaručenu návratnost svých investic. Nedávno ale byl



Obr. 10. DHEA a jeho deriváty

vývoj těchto „sirotčích“ látek podpořen z federálních zdrojů a to mohl být impuls k novému zájmu.

DHEA byla poprvé izolována v roce 1934 a její strukturu vyřešil ve stejném roce Růžička. Po mnoho dekad byla průmyslovou surovinou pro výrobu steroidních hormonů a jejich syntetických ekvivalentů. V těle byl tento metabolit cholesterolu považován za rezervní stavební materiál, z něhož si tělo v případě potřeby vybudovalo jiné potřebné látky, např. testosteron nebo estradiol. Mimochodem, DHEA je vedle cholesterolu nejrozšířenějším steroidem v lidském těle.

Žádná vlastní fyziologická funkce nebyla u DHEA předpokládána ani později, kdy bylo zjištěno, že např. její nedostatek DHEA v plazmě těsně koreluje s atherosklerosou<sup>25</sup>. Hvězdná dráha této látky začala studiem steroidního metabolismu krysy, při němž se ukázalo, že třebaže krysy nadledvinky tuto látku vůbec neprodukují, v jejich mozku se vyskytovala ve velkém množství. Radioaktivní DHEA, vpravená do krysího mozku, byla vyplavena během 20 hodin, takže vysoká hladina DHEA v mozku nemohla být dána selektivním skladováním DHEA produkované v extraadrenálních zdrojích. Tak vznikla představa o neurosteroidech, které si mozek produkuje sám pro svou vlastní potřebu.

Člověk má nejvyšší hladinu DHEA v mládí (mezi 20. a 30. rokem), v 70 letech má už jen 20 % hladiny svého mládí. Plazmatická hladina DHEA byla u obyvatel domovů důchodců nepřímo úměrná přítomnosti mozkových syndromů a stupni jejich závažnosti. DHEA *in vitro* zvyšovala přežívání neuronů a gliových buněk, *in vivo* zlepšovala paměť a retenci starých myší. Snižovala věkem dané důsledky pro imunitní systém a chránila degeneraci hippocampu způsobovanou glukokortikoidy. Mechanismus některých těchto účinků byl tentativně vysvětlován inhibicí pentosového cyklu, který může být zdrojem volných radikálů, a regulací produkce IL6 a IL10, která roste s věkem. Stimulace imunity není pravděpodobně<sup>26</sup> působena přímo DHEA, ale jejími metabolity: DHEA se částečně metabolizuje nejprve na 7 $\alpha$ -hydroxyderivát XXXI, ten se oxiduje na 7-oxoderivát XXXI, a ten se redukuje na 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA (XXXII). Z látek XXXI až XXXII má aktivitu anti-glukokortikoidní jen látka 7 $\beta$ -hydroxyderivát XXXII.

Ve světě nadbytku, kde jednou z civilizačních chorob je obezita, se stal velkým motivem pro studium účinků DHEA její antiobezitní účinek. DHEA totiž patří mezi tzv. ergosteroidy, tedy látky, které stimulují spálení přijaté potravy bez ukládání rezerv. Docilují toho tím, že indukují tvorbu mitochondriální dehydrogenasy glycerol-3-fosfátu a glukoso-6-fosfatasy<sup>27</sup>. Tento efekt nakonec nebyl u lidí tak markantní jako u krysy právě proto, že pro krysu byla DHEA na rozdíl od člověka velmi nedostatkovou komoditou.

Už v kůži dochází k hydroxylaci steroidů do polohy 7 $\alpha$ , proto byl vysloven předpoklad, že transdermální aplikace je účinnější než perorální nejen proto, že tím se vyloučí ztrátová cesta zažívacím ústrojím, ale i proto, že už v procesu resorpce je DHEA částečně konvertována na účinnější metabolit.

Jednou věcí bylo nalezení korelace mezi hladinou DHEA a věkem, jinou věcí je možnost jejího využití v terapii, tedy možnost zpomalit stárnutí mozku dlouhodobou suplementací DHEA. U krysy se tento příznivý efekt potvrdil, třebaže zvýšená kortikální peroxidace signalizovala určitý negativní vedlejší účinek. Otázka zněla, zda tentýž efekt bude fungovat u lidí, jimž v žilách normálně koluje o několik řádů víc DHEA. Pokusy na dobrovolnících<sup>28</sup> (byla to naše DHEA a naši dob-

rovolníci) ukázaly, že DHEA dobře proniká do těla i z emulgelu a už po týdenní aplikaci příznivě ovlivnila řadu endokrinních parametrů: byly sníženy hladiny testosteronu, estradiolu a „celkového cholesterolu“, zvláště LDL, a zvýšeny hladiny LH, HDL-cholesterolu a apolipoproteinů A-I. Celkový atherogenní index prudce klesl. Zdá se, že všechny pozitivní efekty mají dva základní kořeny: schopnost DHEA ovlivnit hospodaření s lipidy (kardiovaskulární efekty, obezita, imunita) a schopnost modifikovat činnost mozku.

Nevýhodou dlouhodobého podávání je skutečnost, že DHEA může být v těle konvertována na testosteron a nakonec na estradiol. Umístění oxoskupiny do allylové polohy za vzniku dionu XXXI (7-oxo-DHEA) zmenšilo možnost konverze na tyto hormony, navíc je 7-oxo-DHEA ve svých nehormonálních účincích ještě silnější<sup>29</sup>. Důvodem vyšší aktivity dionu může být i to, že u 7-ketonu je potlačena aromatizace DHEA, která je z hlediska aktivity ztrátová. Účinek DHEA a její 7-ketonu je v současné době intenzivně studován na různých lékařských – hlavně gerontologických a endokrinních pracovištích.

Dílčí výsledky prokazují, že podávání DHEA způsobuje u experimentálních zvířat a někdy i u lidí zvýšení imunity<sup>30</sup> vůči virové infekci, kardiovaskulárním chorobám a rakovině prsu. Hladina DHEA pozitivně koreluje s hladinou „insulin-like“ růstového hormonu. Někteří účastníci konference o DHEA tvrdili, že DHEA je multifunkční steroidní hormon, ale jiní poukazovali na to, že nemůže být hormonem, když není možno nalézt specifický receptor pro DHEA. Třebaže může být metabolizována na testosteron a estradiol a jejich deriváty, plný účinek DHEA není možno vysvětlit pouhou konverzí na kterýkoliv známý hormon.

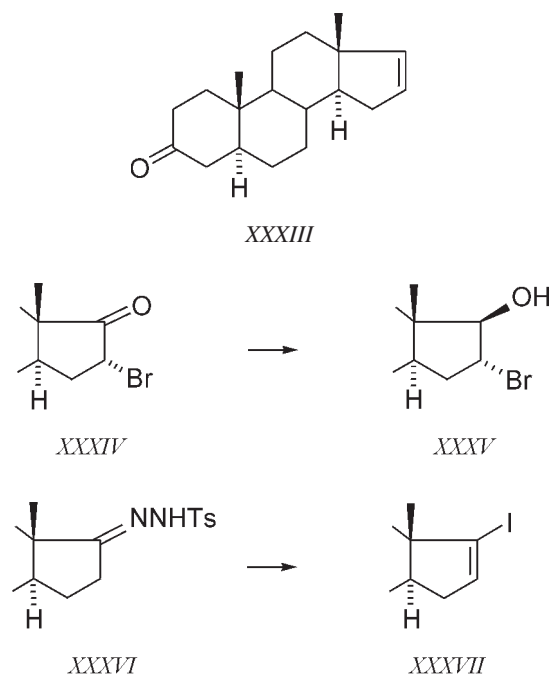
Biologické a elektrofyziologické experimenty prokazovaly, že DHEA je silným allosterickým inhibitorem  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (subtyp A, GABA<sub>A</sub>), a jako takový např. může zlepšit paměť nebo příznivě ovlivnit průběh Alzheimerovy choroby. Přitom bylo zřejmé, že DHEA, resp. její transportní forma – sulfát (v literatuře označovaná jako DHEAS), je nejen po cholesterolu nejčetnějším steroidem v těle, ale že je jako neurosteroid produkována i v mozku.

Zcela nedávno byl nalezen receptor DHEA, jehož neexistence byla dosud argumentem proti tvrzení, že DHEA je opravdu hormonem. Receptor byl nalezen v endotheliální výstelce cév. Tento receptor aktivuje intracelulární G-proteiny a endotheliální syntasu oxidu dusnatého, což přibližuje DHEA účinku známé Viagry<sup>31</sup>.

## F e r o m o n y

Skutečnost, že mezi steroidní látky patří i tzv. feromon kance (XXXIII, boar pheromone), je známa dávno. Byl poznán její efekt, který byl údajně ve světě využíván ve velkých chovech prasat. Ten spočívá v tom, že prasnice zaujme jinou polohu, když ucítí tento feromon a současně ucítí dotyk na zádech v době pro oplodnění optimální a v době mimo estrus. To mělo detegovat říji, a tak zamezit zbytečnému živení neplodících zvířat. Ve velkochovu bylo údajně problémem určení vhodné doby pro připuštění samce. V současné době se tato technika nepoužívá, pro detekci stačí přivést onoho samce na ukázkou a pak se dotknout citlivých míst na zádech, aniž by chemici museli připravovat smrduté látky.

Dvojná vazba do polohy 16 se zavádí buď bromací na



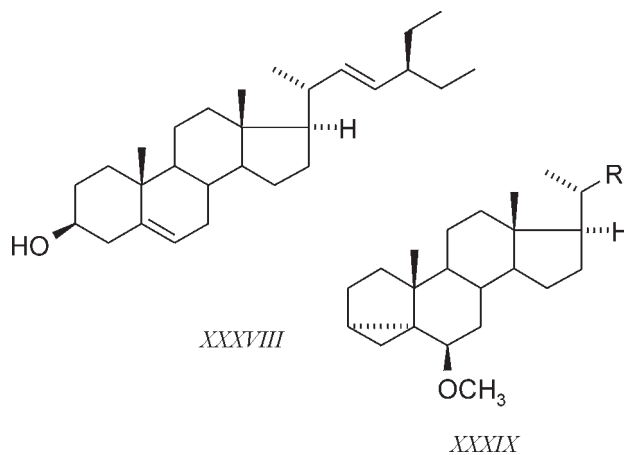
16 $\alpha$ -bromketon, XXXIV, redukcí na bromhydrin XXXV a jeho debromací na olefin XXXIII, nebo Bartonovou metodou převedením ketonu na tosylhydrazon XXXVI, jeho oxidací jodem a halogenolýzou jodu v látce XXXVII. Zmiňují se o této dávno známé látce proto, že se jednak ukazuje, že feromon kance a jeho deriváty neprodukuje jen čtyřnozí samci, jednak proto, že role feromonů je studována ve stále hlubších souvislostech. Údajně ženy cítící androgenní pach aktivují hypothalamus v preoptické oblasti a ve ventromediálním jádru, zatímco muži cítící estrogenní pach aktivují hypothalamus v paraventriculární oblasti a v dorsomediálním jádru<sup>32</sup>.

## 5. Syntéza přírodních látek steroidní řady

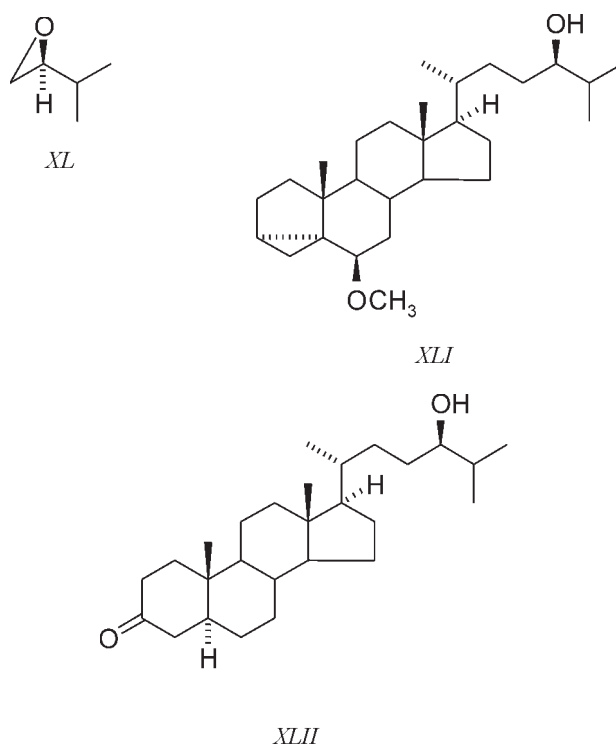
V dobách z hlediska chemie historických bylo běžné, že na základě určitých nalezených dat a analogií s blízkými látkami a často s přihlédnutím k pravděpodobné biogenezi, byla navržena její struktura, která pak musela být potvrzena (či vyvrácena) vstřícnou syntézou. Tento přístup je v současné chemii méně běžný, ale jsou situace, kdy je experimentálně nejjednodušší. Strukturní důkazy pomocí vstřícné syntézy vycházejí z hypoteticky odhadnuté struktury a pak korelací neboli převedením standardními postupy na látku již známou. Tato metoda je poměrně jednoduchá u klasických steroidních skeletů, u produktů komplexních přesmyků.

Příkladem vstřícné syntézy<sup>33</sup> může být potvrzení (24*R*)-konfigurace shora uvedeného skvalaminu (IX). Výchozí látkou byl stigmasterol (XXXVIII, obr. 11), který po ochraně kruhů A a B byl ozonizován na 22-aldehyd (XXXIXa, R = CHO). Aldehydická skupina byla zredukována na hydroxylovou, primární alkohol byl převeden na jodid, který reakcí s fenylsulfínátem poskytl příslušný sulfon (XXXIXb, R = CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

Druhá složka budoucího postranního řetězce skvalaminu



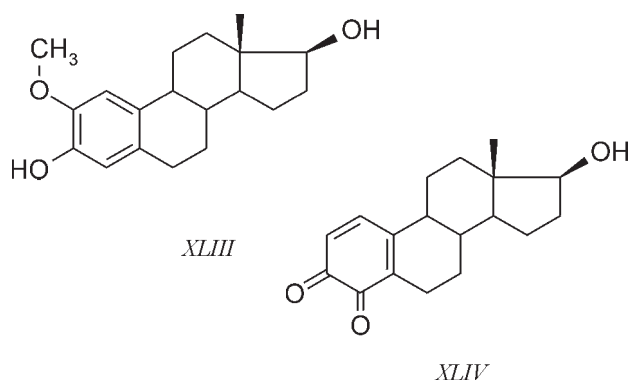
Obr. 11. Stigmasterol a jeho modifikace



Obr. 12. Výstavba postranního řetězce skvalaminu

byla získána z valinu takto: přírodní aminokyselina (tedy L-valin) byla diazotací s inverzí konfigurace převedena na hydroxykyselinu, která byla redukována na diol hydridem lithnolinitým, tosylchloridem dehydratována na (*R*)-epoxid XL (obr. 12). Solvolýza tohoto epoxidu lithnou solí výše uvedeného sulfonu XXXIXb byl epoxidický kruh otevřen na méně substituovaném uhlíku za vzniku příslušného (24*R*)-24-alkoholu XLI.

Aminový řetězec byl ke steroidnímu skeletu připojen ve stadiu ketonu XLII, vzniklá Schiffova báze byla hydrogenována na dva produkty: 3 $\beta$ -aminoderivát (24*R*)-řady byl shledán totožným s nativním skvalaminem, zatímco analogický produkt získaný z enantiomerního epoxidu byl zřetelně odlišný.



### 2-Methoxyestradiol

Jiný metabolit, který byl izolován, a navržená struktura potvrzena syntézou, je 2-methoxyestradiol (XLIII). Větší množství látky, které poskytla nová syntéza<sup>34</sup>, umožnilo podrobné zkoumání aktivit. Tento metabolit vykazuje kancerostatickou aktivitu, zatímco další metabolit estradiolu, 4-hydroxyestradiol, má aktivitu opačnou. Ta se vysvětluje oxidací na 3,4-chinoidní derivát XLIV, který se váže přímo se složkami DNA.

### Cefalostatin

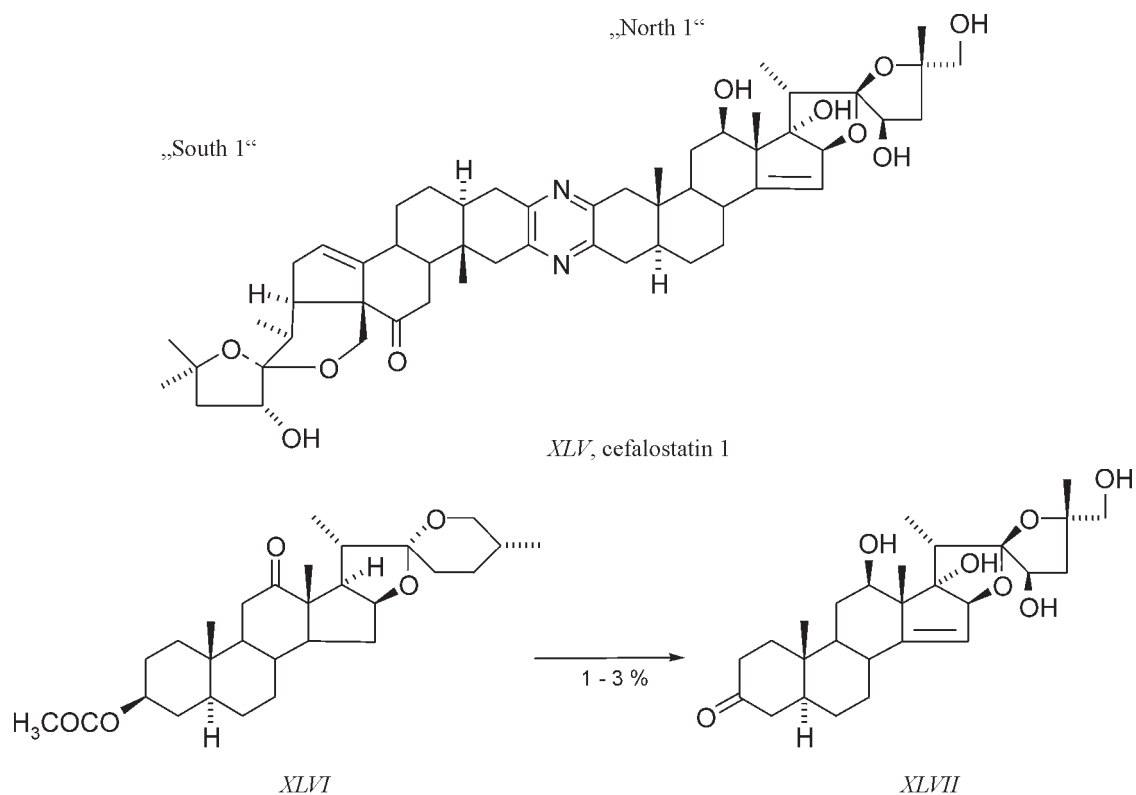
Chemické modifikace steroidního skeletu jsou dnes už propracovány tak, že je možno funkcionalizovat jakoukoliv polohu steroidního skeletu. Vzhledem k tomu, že steroidy jsou tu dnes diskutovány jako přírodní látky, zcela přeskočím

některé čistě syntetické oblasti steroidní chemie, které rovněž byly rozvíjeny v posledních dvaceti letech. Např. o funkcionalizaci neaktivovaných poloh steroidního skeletu se mohou zájemci dočíst v souhrnném článku<sup>35</sup>.

Přetrvávající problémy stále spočívají v neslučitelnosti podmínek potřebných pro zavedení nové funkční skupiny s vlastnostmi či stabilitou přítomných funkčních skupin. I v tom učinila organická syntéza obrovský pokrok, když si uvědomíme, že v původní steroidní chemii existovalo jen pár základních triků, jak separovat reaktivity shodných funkčních skupin: parciální oxidace, parciální redukce, selektivní acylace, selektivní hydrolyza a hydrogenolyza.

Cefalostatin 1 (XLV, obr. 13) byl v roce 1998 uveden<sup>36</sup> jako jedna z „nejmocnějších protirakovinných látek, které kdy testoval americký National Cancer Institute“. ED<sub>50</sub> této látky vůči různým druhům nádorů a leukemií se liší, látka je ale vždy účinná v dávkách nanomolů na ml. Cefalostatiny jsou steroidem substituované pyraziny. Byly izolovány z mnohočetinatých červů druhu *Cephalodiscus gilchristi*, kteří žijí v Indickém oceánu. Strukturálně blízké Ritteraziny byly izolovány z druhu *Ritterella tokioka* žijícího na japonském pobřeží. Celkem bylo izolováno přes 40 různých variací na toto téma.

Klinické zkoušky byly bržděny nedostatkem přírodního materiálu, který je pochopitelný při nízké koncentraci těchto látek v přírodě. Např. pro 100 mg cefalostatinu bylo třeba zpracovat 450 kg červů. Ani sběr těchto živočichů, kteří žijí v hloubce 80 metrů, není jednoduchý, protože v těchto vodách je doma např. žralok bílý. Syntéza těchto látek má velký význam právě pro možnost studia jejich biologických vlastností. Vycházela z acetátu hekogeninu (XLVI), který rovněž



Obr. 13. Cefalostatin 1 (XLV) a výchozí hekogeninacetát (XLVI)

obsahuje zde typickou 12-oxoskupinu, spiroketalový systém anelovaný ke kruhu D a substituci v kruhu A. Ale jen intermediiát s 3-ketoskupinou (XLVII), která byla potřebná ke spojení dvou molekul přes pyrazinový kruh, byl připraven ve 28 až 33 reakčních stupních a výtěžek činil 1 až 3 %.

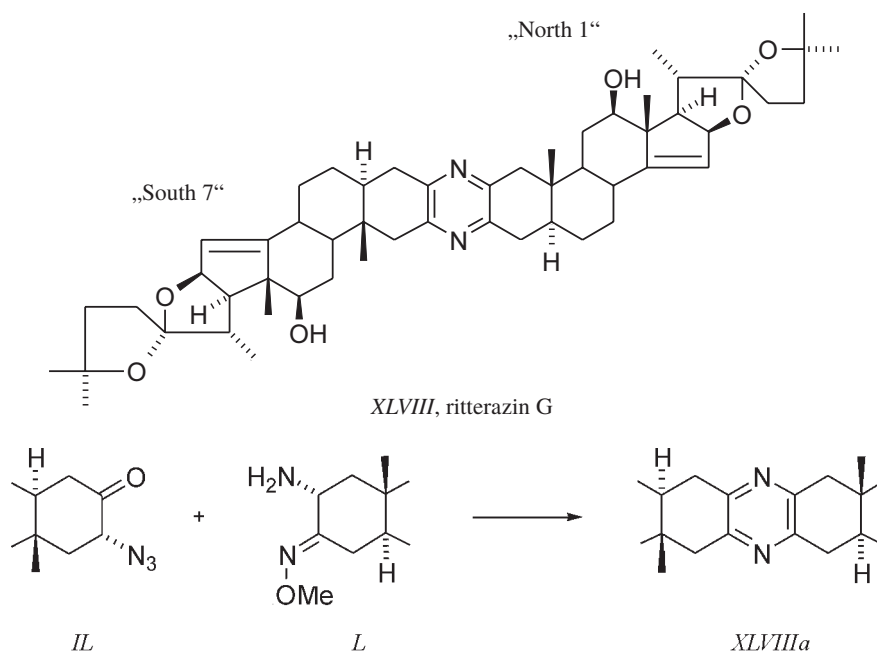
Cefalostatinům jsou strukturně blízké ritteraziny (např. ritterazin G, XLVIII, obr. 14). Díky menšímu počtu kyslíkatých substituentů ve spiroketalovém systému jsou synteticky přístupnější než cefalostatiny, při čemž jejich aktivita je v některých případech téměř stejná.

Strukturní variace se liší strukturou spiroketalových částí. Např. cefalostatin 1 (XLV) je tvořen pravou horní půlkou (tzv. North 1) a levou dolní půlkou molekuly (tzv. South 1). Ukazuje se, že jedenáct nejúčinnějších analogů obehává tyto dvě sho-

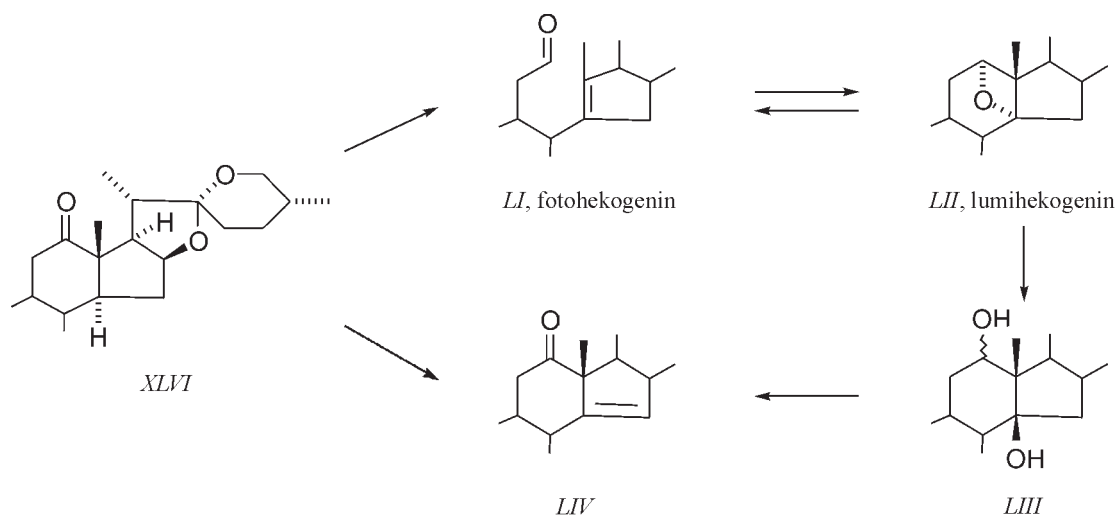
ra uvedené jednotky a ještě další dvě: „North G“ a „South 7“.

Konstrukce centrálního pyrazinového cyklu se provádí různým způsobem. V tomto případě byl výchozí 3-keton budoucí části South 7 převeden na 2 $\alpha$ -azidoketon IL a výchozí 3-keton budoucí části North 1 byl převeden na 2 $\alpha$ -amino-3-methoxyiminoderivát L. Při zvýšené teplotě a za kyselých katalýz pak dochází k žádoucí cyklizaci na pyrazin XLVIIIa (cit.<sup>35</sup>).

Tyto výchozí komponenty zase autoři připravovali takto: z příslušného 3-ketonu bromací získali příslušný 2 $\alpha$ -bromketon, který byl solvolýzován na žádaný 2 $\alpha$ -azidoketon IL. Druhá složka stejným postupem vedla k analogickému azidoketonu, který s reagoval s hydrochloridem N-methylhydroxylaminu.

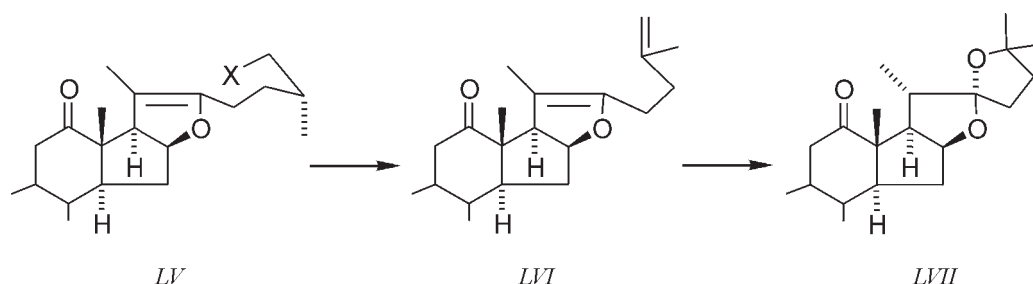


Obr. 14. Ritterazin a způsob přípravy diazinu



Obr. 15. Zavedení dvojné vazby do polohy 14





Obr. 16. Modifikace spirostanové části hecogeninu

Kuriozní byl způsob zavedení dvojné vazby do polohy 14. Fotolýzou hecogeninacetátu (*XLVI*) vznikla rovnovážná směs fotohecogeninu (*LI*, obr. 15) a lumihekonogenu (*LII*), která za podmínek Prinsovy reakce po mnoha pokusech o optimalizaci poskytla  $12\alpha,14\beta$ -diol *LIII*. Oxidace a dehydratace na nenasycený keton *LIV* pak proběhla bez komplikací.

Spirostanový skelet hecogeninu se mírně liší od požadovaného spiroketalového zbytku v cefalostatínu i ritterazínu. Transformace spirostanového derivátu na ritterazinový byla původně zamýšlena na podobném principu, na jakém je založena degradace diosgeninu při výrobě steroidních hormonů: tam se spiroketal štěpí při 200 °C působením anhydridu kyseliny octové. Tato reakce u  $14\beta$ -hydroxyderivátu nevedla k cíli. Proto bylo nutno v hecogeninu nejprve modifikovat onu spiroketalovou strukturu a teprve potom fotolyzovat 12-oxoderivát s cílem zavést požadovanou dvojnou vazbu do polohy 14. Následující schéma popisuje princip této transformace: spiroketalové seskupení výchozího hecogeninacetátu *XLVI* bylo otevřeno dichloroacetanhydridem na nenasycený dichloroacetát *LV* (obr. 16,  $X = \text{Cl}_2\text{HCCOO}$ ), a ten byl sérií standardních reakcí (hydrolyza, tosylnice, solvolýza tosylátu jodidem sodným, dehydrojodace) převeden na olefin *LVI*. K hydrataci tohoto enoletheru za vzniku furostanu *LVII* došlo po mnoha marných pokusech s různými činidly (octan rtuťnatý, trifluoroctová kyselina v acetonitrilu) působením vodné kyseliny octové při vyšší teplotě.

Cefalostatiny obsahují ve svých dvou spiroketalových skupinách ještě další hydroxylové skupiny, metodiku zavedení těchto skupin si může eventuelní zájemce přečíst v originální

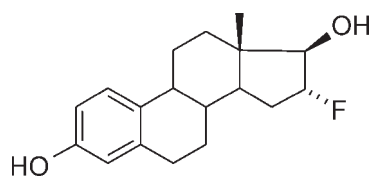
literatuře<sup>37</sup>. Prezentace těchto klíčových stupňů měla jen rádo- vě ukázat složitost syntetických postupů v dané oblasti.

## 6. Syntéza analogů biologicky aktivních steroidů

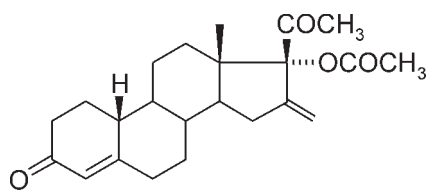
Vedle syntéz přírodních látek jsou v laboratořích často připravovány látky mírně modifikované – např. přítomností radioaktivního prvku. Deriváty značené deuteriem nebo tritiem jsou používány při důkazech metabolismu jednotlivých přírodních látek. Jindy tyto deriváty mají funkci diagnostickou. Je např. známo, že nádory hormon-dependentních tkání jsou v časných stádiích dobře manipulovatelné působením antihormonů, v pozdějších stádiích je již taková terapie neúčelná. Proto byl připraven  $16\alpha$ - $^{18}\text{F}$ fluoroestradiol (*LVIII*) a pacientka, již byl podán, byla sledována pozitronovou emisní tomografií (PET). Ta ukázala, zda ve tkáni jsou ještě funkční estrogení receptory a zda tedy má léčba antihormonem naději na úspěch.

V poslední době se v syntetické steroidní chemii stále víc uplatňuje trend, který Dr. Jaroslav Kalvoda z CIBY formuloval takto: „Dnes už publikace steroidní syntézy bez biologických dat působí skoro neslušně.“ Ubývá čistě metodických prací, v nichž steroidní skelet byl použit jako cvičná loučka pro demonstraci určité nové reakce, na druhé straně přibývá prací, v nichž chemie sice není příliš vzrušující, ale jejichž cenu dělá biologická aktivita takto získaných produktů. Steroidní chemik si už nevystačí sám, stále víc potřebuje spolupracovníky v biologických oborech, kteří dokáží, ale hlavně jsou ochotni naplno spolupracovat.

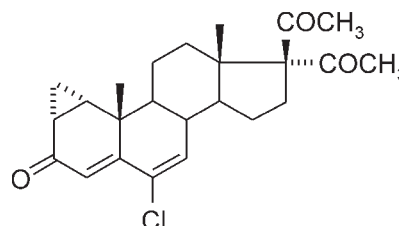
Práce mnoha týmů vede k upřesnění strukturních požadavků té které biologické aktivity. Jeden z mnoha impulzů, které steroidní obec ovlivňovaly ve snaze o zlepšení aktivity přírodních látek, byla potřeba separace aktivit původně spřažených



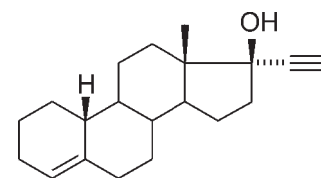
LVIII



LIX

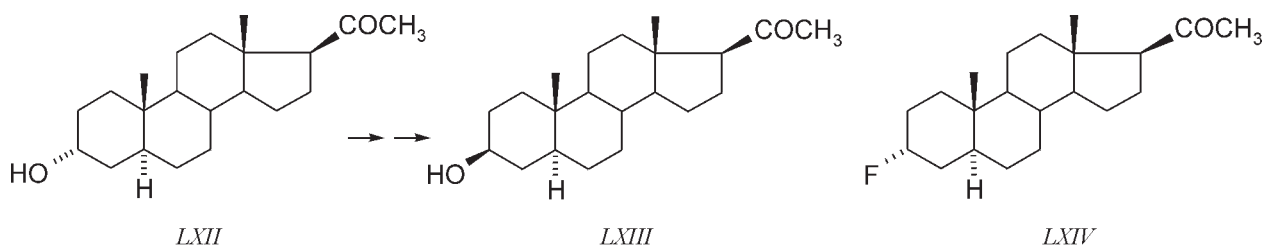


LX



LXI





Obr. 17. Stabilnější analog přírodní látky

dohromady. Nechci jen připomínat historický příklad androgenní aktivity, která byla později separována na tzv. čisté androgenní (rozvoj pohlavních orgánů i sekundárních pohlavních znaků) a anaboličnou aktivitu (ukončování růstu dlouhých kostí, budování svalové hmoty). Máme i příklady novější: nestoron<sup>38</sup> (LIX). Ten pravděpodobně nahradí jiné gestageny v orálních kontraceptivech. Dosud používané gestageny (3-ketodesogestrel, norethindron, levonorgestrel) mají zbytečnou androgenní aktivitu, jíž jsou připisovány změny v hospodaření s lipidy, a v důsledku toho výskytu akné a přírůstků na váze. Nestoron v těchto testech má stejnou gestagenní aktivitu jako ostatní gestageny, ale jeho androgenní aktivita je 300 až 400 krát menší.

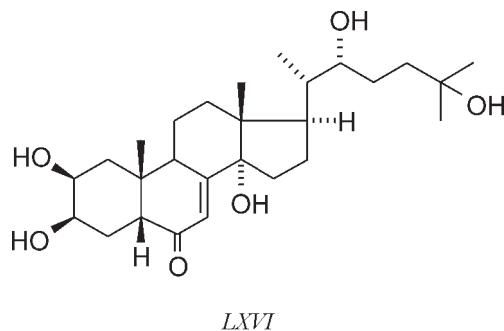
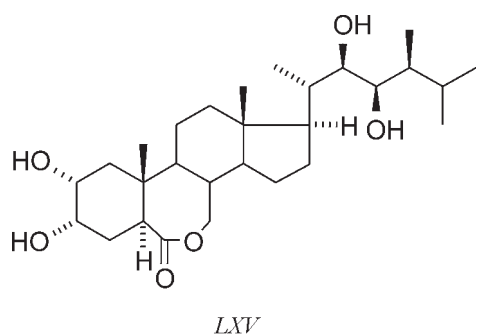
Hledání souvislosti mezi strukturou a aktivitou je cestou pokusu a omylu a pokrok často ovlivnila serendipity: např. pracovníci firmy Schering svého času usilovali o vytvoření gestagenu s co nejmohutnější aktivitou. Tak byl připraven jejich cyproteronacetát (LX), který nakonec v tomto testu propadl. Dóza s tímto preparátem zůstala stát na polici a když byla od stolu s předpokladem jisté symetrie v přírodě koncipována představa antiandrogenní aktivity, byl cyproteronacetát jednou z mnoha testovaných látek. A ukázal se být tak dobrý, že je používán při léčbě chorob androgen-dependentních orgánů dodnes.

Pracovníci farmaceutického průmyslu přitom želi současné praxe, při níž je použití testů na zvířatech silně omezeno. Bez nich by ale nikdy nebyla objevena účinnost např. desogestrelu (LXI), protože do té doby se věřilo, že pro aktivitu je zapotřebí neporušený <sup>4</sup>-3-oxosystém. Desogestrel tedy podle této teorie neměl být jakkoliv účinný. Rutinní testy na zvířatech našťásti tuto teorii vyvrátili, ale sítím dnešních testů by už desogestrel prošel neodhalen.

Dalším důvodem pro syntézu analogů je snaha o zvýšení stability účinné látky v těle. Např. tzv. allopregnanolon (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on, LXII, obr. 17) je jedním z tzv. neurosteroidů. Tento neurosteroid působí v mozku inhibičně: vazbou na receptor  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA<sub>A</sub>) zvyšuje účinek tohoto nervového přenašeče a zvyšuje útlum nervových signálů, jako je třeba signál bolesti. Účinek allopregnanolonu je okamžitý, ale rychle odezní: poločas deaktivace je 16 minut. Takové vlastnosti je možno využít jen pro velice krátkodobé případy, jako je třeba celková anestezie při operaci, která musí nastartovat rychle, ale je žádoucí, aby po skončení aplikace zase rychle odezněla. Protože v mozku je odhadem 40 % synapsí „GABA-ergních“ (jsou ovlivnitelné kyselinou  $\gamma$ -amino-máselnou), je možná použitelnost této skupiny neuroaktivních látek větší než jako pouhé celkové anestetikum. K systematickému použití ale vadí krátkodobost působení. Allopregnanolon je totiž rychle deaktivován oxidací na neak-

tivní 3-oxoderivát a pak redukcí na také neaktivní 3 $\beta$ -hydroxyderivát LXIII. Proto jedna z cest vedoucích k prodlouženému účinku byla náhrada jeho 3 $\alpha$ -hydroxyly atomem fluoru: výsledná látka LXIV se sice váže na receptor asi 4 $\times$  slaběji než původní allopregnanolon, ale její metabolická stabilita je tak vysoká, že celkový *in vivo* účinek je jak mohutnější, tak trvalejší.

Dalším důvodem syntézy přírodních steroidů je potřeba většího množství přírodních látek, než je možno získat izolací. Nalezení určité nové aktivity bývá začátkem dalších otázek, protože bývá nutno potvrdit či vyvrátit možné interakce těchto látek s dalšími systémy. Tehdy opět přichází ke slovu syntéza aktivní látky. Jednou takovou skupinou látek jsou brassinosteroidy, které jsou studovány z hlediska syntézy, analýzy i biologické aktivity. Dnes můžeme říci, že patří mezi rostlinné hormony, které se vyskytují ve všech rostlinách, a to ve všech jejích částech, nejvíce ale v reprodukčních orgánech, jako je pyl a nezralá semena. Stimulují růst buněk i jejich dělení, a tak působí i na celkový růst rostlin. Při externí aplikaci brassinosteroidů dochází hlavně ke stimulaci růstu té části rostliny, která se rozvíjí právě v době aplikace. Efekt externí aplikace je nejvýraznější u rostlin existujících v nepříznivých podmínkách, kdy pomáhá překonat nepříznivé faktory,



jako je sucho, nedostatek vody a živin apod. Z toho důvodu je o jejich možné využití takový zájem, protože jsou schopny dopomoci k optimálnímu růstu i v málo příznivých podmínkách, což by mohlo zamezit dnes tak rozšířenému nadužívání hnojiv.

Nejranější evidence o existenci této nové třídy rostlinných hormonů se objevila v r. 1968, kdy z půl tuny zelených listů *Distylium racemosum* byly izolovány tři frakce (celková váha 1 mg) s mnohem výraznějším účinkem na listy rýže, než vykazoval auxin. Další autoři nazvali podobné extrakty brassiny, poukázali na jejich účinek na více než desateronásobné prodloužení druhého internodu s tím, že účinek se liší od účinku giberelinu; ti také jako první formulovali názor, že jde o nový typ růstového hormonu rostlin. Po dalších deseti letech byly ze 40 kg pylu izolovány 4 mg brassinolidu (LXV) což už

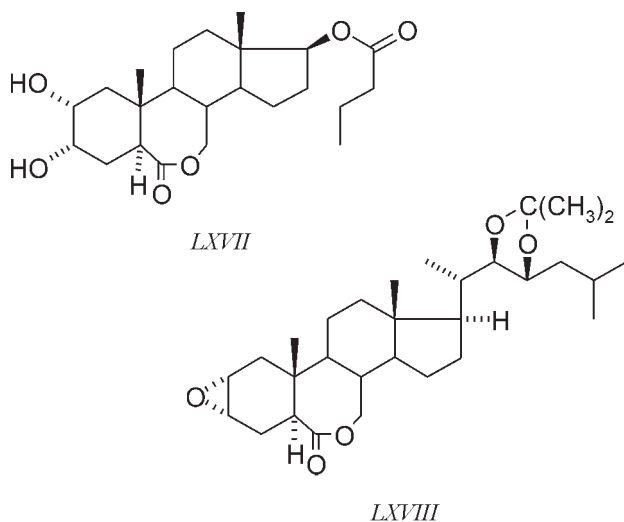
stačilo na prokázání struktury pomocí roentgenové difrakce<sup>39</sup>. Vedle vzorce brassinolidu je pro srovnání uveden strukturálně blízký představitel další skupiny rostlinných přírodních látek – ekdyson (LXVI). Tyto sloučeniny jsou studovány z hlediska interakce mezi rostlinami a hmyzem<sup>40</sup>, jejich aktivita je ale zcela jiná – způsobují ekdyssi, tedy přerod jednoho stadia hmyzu v další stadium.

Do dnešního dne byla izolována dlouhá řada brassinosteroidů, některé postrádají ty či ony strukturální rysy dlouho považované za esenciální pro brassinoidní aktivitu (často je laktonová skupina nahrazena tradičním cyklohexanonovým B-kruhem). Vzhledem k obtížné izolaci brassinosteroidů byla značná pozornost věnována izolaci a syntéze analogů brassinosteroidů. Některé analogy vykazují aktivitu sice slabší než brassinolid, ale zato jsou o několik řádů snáze syntetizovatelné. Studium vztahů mezi strukturou a aktivitou přináší mnohé dílčí poznatky, jejich integrace je však zatím brzděna rozdílností používaných biologických testů, které ne vždy dobře korelují spolu navzájem. Tak např. analog LXVII (obr. 18) je v testu na druhém internodu fazole stejně aktivní jako 24-epimer brassinolidu, zatímco v testu na rýži je jeho aktivita zanedbatelná. Také látka LXVIII se v druhém testu (tj. na rýži) jeví zcela nezajímavá, ale na poli zvyšuje výnos rýže nečekaným způsobem<sup>41</sup>. Takových případů je celá řada.

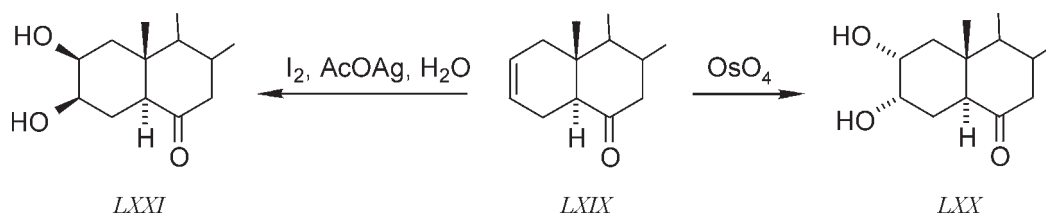
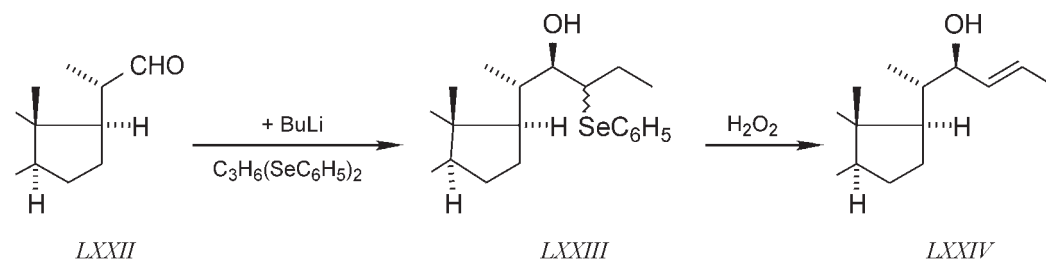
Nás jako chemiky bude nejspíš zajímat způsob zavedení jednotlivých funkčních skupin. Syntetické postupy se liší pořadím kroků, použitými činidly či způsoby ochrany jedné skupiny při obměně současně přítomných funkčních skupin. Na detailní rozbor všech postupů nezbyvá čas, ale jednotlivé dílčí kroky syntézy brassinosteroidů si připomenout můžeme.

Vicinální *cis*-diolové seskupení v A-kruhu je skoro vždy zaváděno oxidací příslušného  $\gamma$ -olefinu (LXIX, obr. 19) ekvivalentním či alespoň katalytickým množstvím kyslíčnicku osmičelého (výjimku tvoří postup V. Černého<sup>42</sup>, který použití tohoto drahého činidla úplně vyloučil). Tým olefin LXIX je výchozí látkou i pro přípravu ekdysteroidů, jen činidlo je v tomto případě jiné.

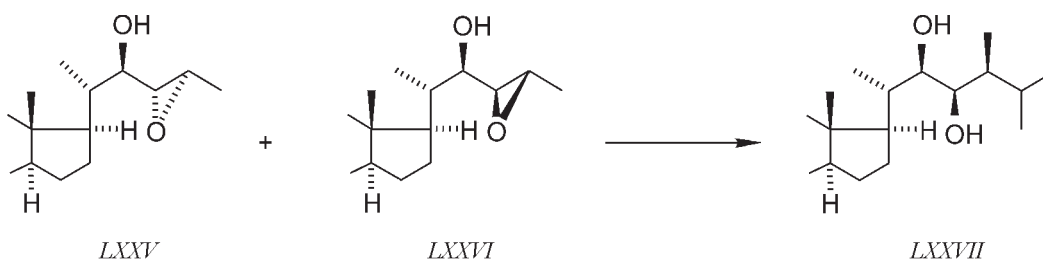
$\epsilon$ -Laktonové seskupení v B-kruhu brassinosteroidů bylo



Obr. 18. Analogy brassinolidu

Obr. 19. *cis*-Hydroxylace v přípravě ekdysonu (LXXI) nebo brassinolidu (LXX)

Obr. 20. Výstavba postranního řetězce brassinolidu

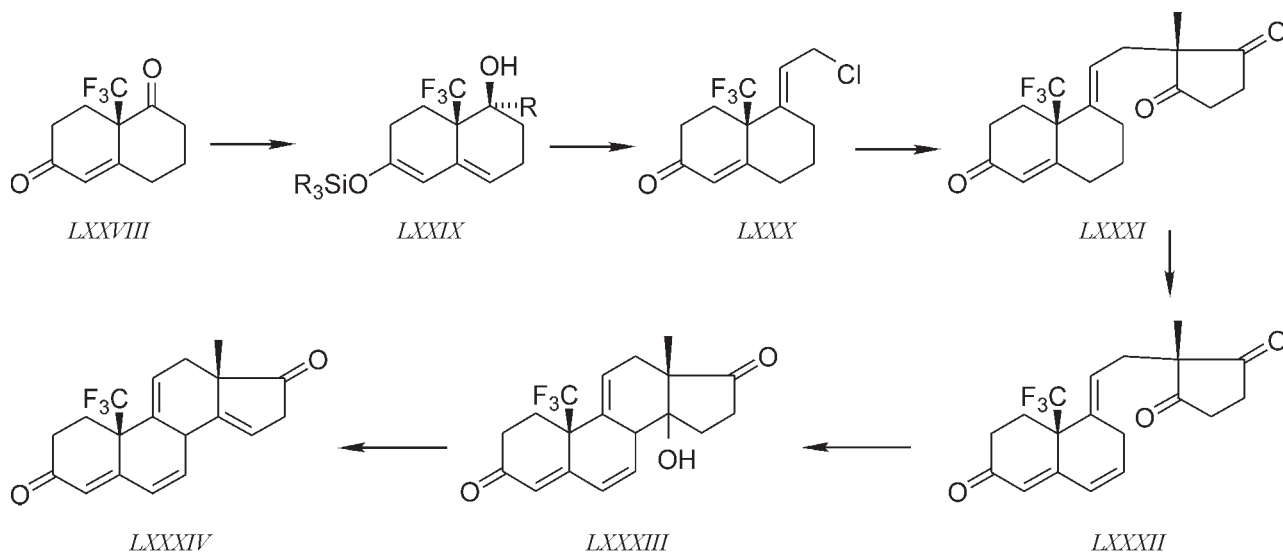
Obr. 21. (22*R*,23*R*,24*S*)-konfigurace postranního řetězce brassinolidu

vždy připravováno Baeyerovou-Villigerovou oxidací příslušného 6-ketonu typu *LXX*. Tato oxidace u těchto 3 $\alpha$ -hydroxy-6-ketonů typu *LXX* probíhá tedy s opačnou preferencí než u 3 $\beta$ -hydroxyderivátů typu *LXXI*, kde kyslík přednostně vstupuje mezi uhlíky 5 a 6.

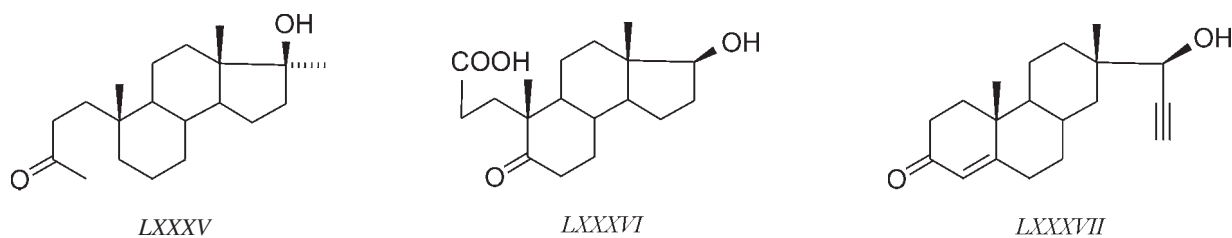
Zavedení postranního řetězce do molekuly bylo problémem řešeným mnoha školami, problémem o to těžším, že v tomto řetězci jsou 4 asymetrická centra. Přesto se na tento problém vrhla řada týmů, osmnáct z nich publikovalo své syntézy během osmnácti let. Výtěžkově zatím nejefektivnější cestu nakonec našel Tomáš Back z University of Calgary<sup>43</sup>, který využil reakce C22-aldehydu *LXXII* (obr. 20) s tříuhlíkatým aniontem generovaným z fenylselenopropanu. Deselenylace intermediátu *LXXIII* poskytla převážně žádaný *trans*-olefin *LXXIV*. Sharplessova oxidace při použití L-vinanu ethylného poskytla směs epoxidů *LXXV* a *LXXVI* (obr. 21). Posledně

jmenovaný reagoval s isopropylmagnesiumchloridem, hlavním produktem (80 %) byla látka *LXXVII* se strukturou brassinolidu v postranním řetězci. Dvanáctistupňová syntéza z aldehydu *LXXII* měla údajný výtěžek 8 %.

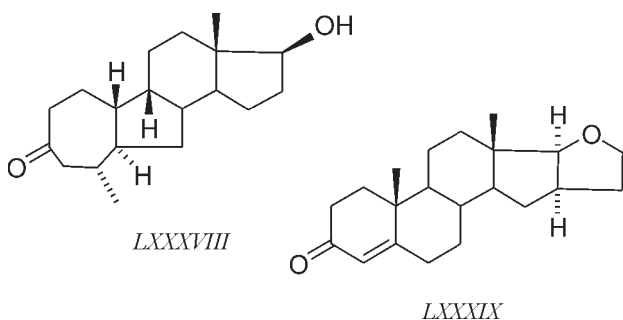
Většina chemických prací z oboru brassinosteroidů se v současné době věnuje hledání nových analogů a jejich testování. V tomto oboru pak je rozmanitost přístupů dána už jen fantazií autorů a jejich odvahou porušovat tabu: do určité doby se zdálo, že  $\epsilon$ -laktonový systém v B-kruhu je pro brassinoidní aktivitu nepostradatelný, dnes už toto pravidlo neplatí. Cholestanový postranní řetězec se taky zdál být nutnou podmínkou aktivity, ale poznání vlastností 22-oxa-, 20-azacholestanových i androstanových analogů tuto podmínku podstatně modifikovalo. Práce v tomto směru pokračují dál, syntézy jsou např. vedeny i na základě faktorové analýzy dostupných dat a matematického modelování.



Obr. 22. Syntéza racemického derivátu androstanu



Obr. 23. Sekosteroidy



Obr. 24. Antiandrogenní analogy

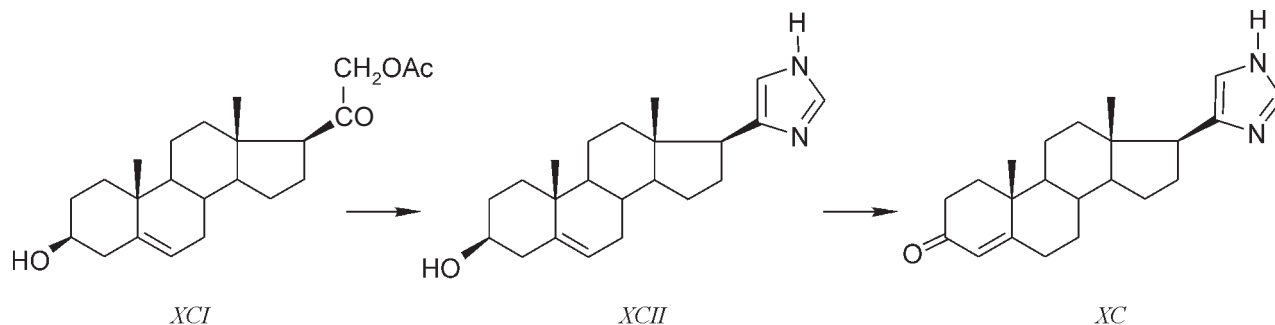
Zatím jsem tu popisoval parciálně-syntetické postupy, při nichž chemici vycházeli z jedné přírodní suroviny, aby získali jiné steroidy. Totální syntézy jsou v této oblasti rovněž používány. Např. Blazejewski a spolupracovníci<sup>44</sup> připravovali inhibitory cytochrom P450 aromatasy a získané trifluoroanalogy slibovaly být ireverzibilními inhibitory. Vyšli proto z tzv. Wielandova-Miescherova ketonu fluorovaného na angulární methylové skupině (LXXVIII, obr. 22). Jedna ketoskupina v této látce byla ochráněna ve formě silylovaného enol-etheru a druhá pak reagovala s acetylidem lithným v kapalném amoniaku za vzniku ethynylderivátu LXXIXa (R = CCH). Jeho hydrogenace na Lindlarově katalyzátoru poskytla allylový alkohol LXXIXb (R = CHCH<sub>2</sub>), a ten působením thionylchloridu poskytl přesmyknutý chlorderivát LXXX. Reakce chlorderivátu se sodným enolátem 2-methylcyklopentan-1,3-dionu poskytl sekosteroid LXXXI. Přímá cyklizace této látky byla neúspěšná, proto byla tato látka v několika stupních převedena na dienonový derivát LXXXII, a ten v alkalických podmínkách podlehl cyklizaci na derivát 14β-hydroxyandrostanu LXXXIII. Hydrogenace a dehydratace thionylchloridem v pyridinu poskytly 19,19,19-trifluor-androsta-4,6,9(11),14-

-tetraen-3,17-dion (LXXXIV). Hydrogenace se zdála být jen čistě technickou záležitostí. Asi nebyla, práce zatím zůstává v posledním stupni nedokončena.

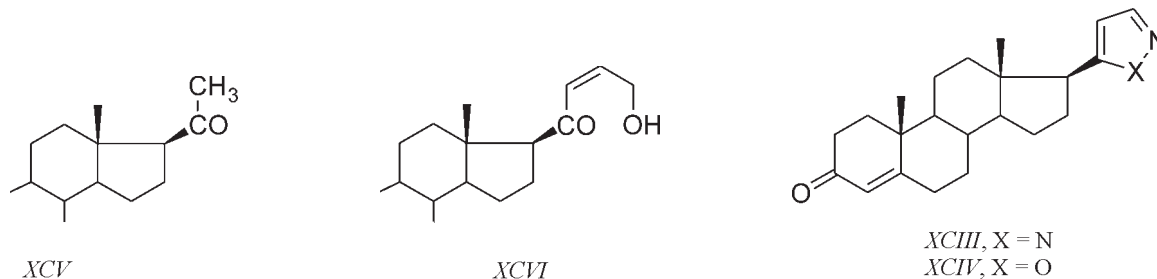
Ve snaze připravit nové typy biologicky účinných látek byly často modifikovány nejen substituenty, ale i skelet. Ze série analogů pravého androgenu – dihydrotestosteronu byl odvozen závěr, že nejlepším antiandrogenem bude látka co nejpodobnější tomuto hormonu, ale postrádající jeho rigiditu, taková látka by se vážala na androgenní receptor, ale nevnutila by mu změnu jeho konformace, tedy následnou vazbu receptorového komplexu na DNA a ani hormonální odezvu. Toto požadované uvolnění rigidity měl přinést např. 4,5-sekodihydro-testosteron (LXXXV, obr. 23). Látka byla připravena oxidací chráněného derivátu testosteronu na 5-oxo-3,5-sekokyse-linu LXXXVI a následnou sekvencí transformací<sup>45</sup> ale její antiandrogenní aktivita byla nižší než je aktivita používaného cyproteronacetátu. Podobná idea vedla jiné autory<sup>46</sup> k přípravě 14,15-sekosteroidu LXXXVII, který se nakonec ukázal být inaktivátorem dehydrogenasy 3α-hydroxysteroidů.

A-Homo-B-noranalogue dihydrotestosteronu LXXXVIII (obr. 24) měl v *in vivo* testech nejlepší účinek<sup>46</sup> v blokaci funkce androgenů, ale o této látce nelze mluvit jako o antiandrogenu, protože se v *in vitro* testech prakticky neváže na androgenní receptor. Zdá se, že tato látka je vlastně pro-antiandrogenem, který se až v živé tkáni metabolizuje na vlastní antiandrogen, pravděpodobně látku s dalšími dvojnými vazbami v A kruhu.

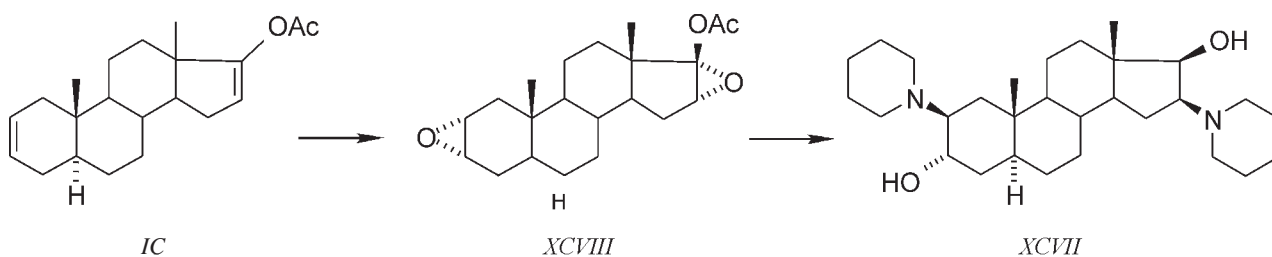
Tetrahydropyranoderivát LXXXIX se ukázal být silnějším antiandrogenem než cyproteronacetát (LX). Je to vlastně první zástupce heterocyklických steroidů, mezi nimiž nacházíme řadu aktivních látek. Např. imidazol<sup>48</sup> XC (obr. 25) je účinný jako inhibitor 5α-reduktasy i jako inhibitor C17-20-lyasy, a tak spojil dva žádoucí účinky v jedné látce. Inhibitory lidské cytochrom C17-20-lyasy (P450<sub>17α</sub>) jsou schopny intervenovat v procesu oxidace pregnenolonu na DHEA v gonádách i v nadledvinkách; dosud používané P450<sub>17α</sub> inhibitory jsou



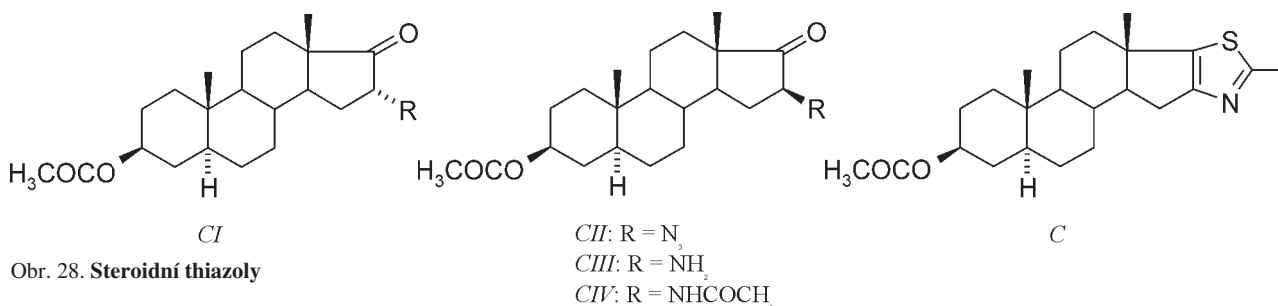
Obr. 25. Imidazolem substituované steroidy



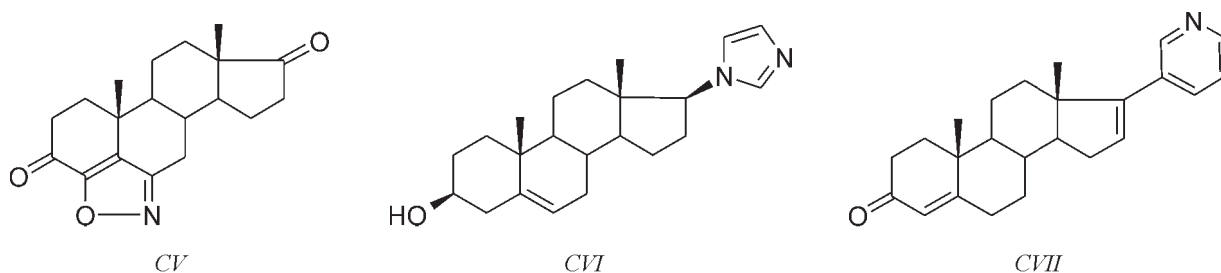
Obr. 26. Heterocyklické analogy steroidních hormonů



Obr. 27. Cesta k piperuroniu



Obr. 28. Steroidní thiazoly



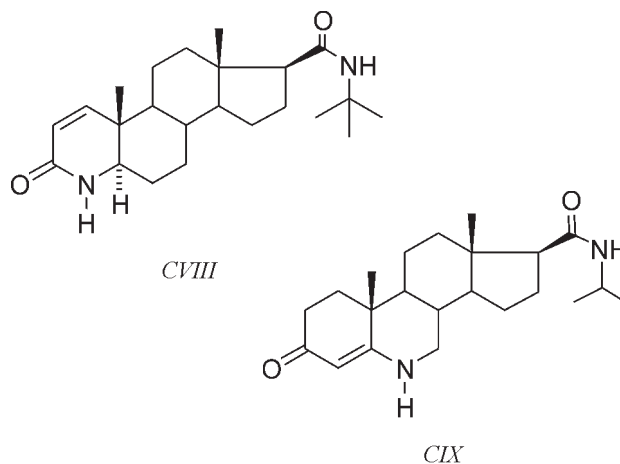
jednak slabé, jednak mají vážné vedlejší účinky. Inhibitory  $5\alpha$ -reduktasy redukuje testosteron na dihydrotestosteron, jejich působením ale hladina testosteronu v tkáních vzrostla, což u androgen-dependentních nádorů bylo velice nežádoucí. Tyto látky jsou tedy vhodné pro léčbu benigní i maligní hypertrofie prostaty.

Princip syntézy těchto látek je ukázán na jedné z nejúčinnějších, na imidazolu XC. Příprava vychází z 21-acetoxy-20-onu XCI, který reakcí s amoniakem a formaldehydem (za katalýzy octanem měďnatým) poskytuje imidazol XCII, a ten se pak oxiduje v A-kruhu.

Tito autoři připravili ještě další heterocyklické analogy, inhibici  $5\alpha$ -reduktasy a C17-20-lyasy vykazovaly ještě příslušné pyrazoly (XCIII, X = N, obr. 26) a isoxazoly (XCIV, X = O). Klíčovým stupněm k jejich přípravě je Claisenova kondenzace 20-oxopregnanového derivátu XCV s mravenčanem ethylnatým, při čemž vznikající 21-formylderivát reaguje v enolformě XCVI s hydrazinem nebo hydroxylaminem.

Jiné steroidy kombinované s heterocykly mají dva atomy dusíku ve dvou rozdílných kruzích. Např. pankuroniumbromid (bismethobromid látky XCVII, obr. 27) a jemu podobné látky byly připraveny jako analogy acetylcholinu. To je neurohumorální přenašeč, který je uvolňován z nervových zakončení a je vysoce specificky aktivní ve vyvolání svalových stahů. Pankuroniumbromid se váže na receptory acetylcho-

linu, a tím blokuje svalové stahy. Tyto látky jsou dnes používány<sup>49,50</sup> při operacích v celkové anestezii jako myorelaxans místo dříve používaného (+)-tubokurarinu. Uvedená báze XCVII byla získána reakcí epoxidu XCVIII s piperidinem za vyšší teploty v autoklávu, výchozí diepoxid XCVIII byl připraven z enolacetátu IC.

Obr. 29. Inhibitory  $5\alpha$ -reduktasy s heteroatomem v jádře

Podobný cíl sledují další heterocyklické steroidy<sup>51</sup>. Kvarterní amoniové sole odvozené od thiazolu *C* (obr. 28), zvláště soli s objemným substituentem na dusíku mají vysokou afinitu k M-2 muskarinovému receptoru. Jejich syntéza byla založena na bromaci příslušného 17-ketonu *Cla* (R = H) do polohy 16 $\alpha$ , solvolýze bromketonu *Cib* (R = Br) působením azidu sodného s inverzí na 16 $\beta$ -azid *CII*, redukcí chloridem cínatým na aminoketon *CIII*, acetylaci a cyklizaci acetátu *CIV* působením siričku fosforečného.

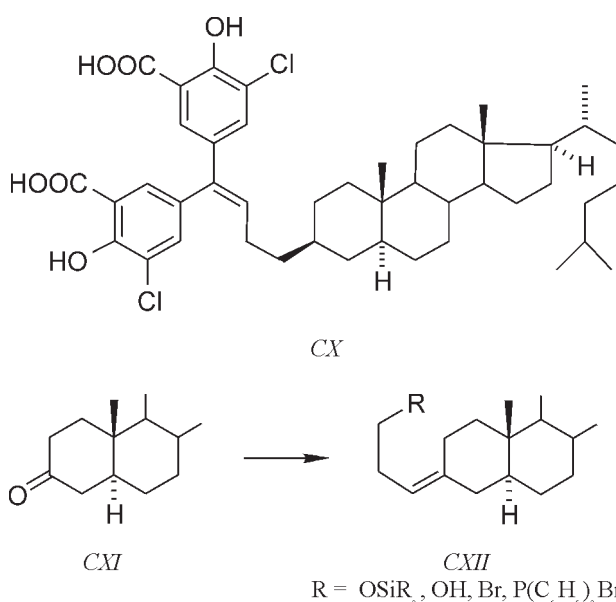
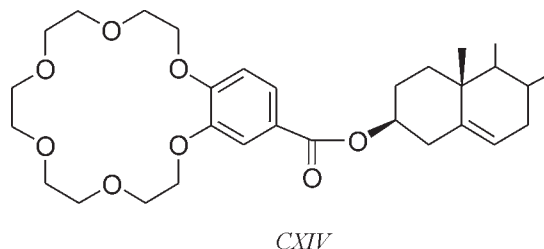
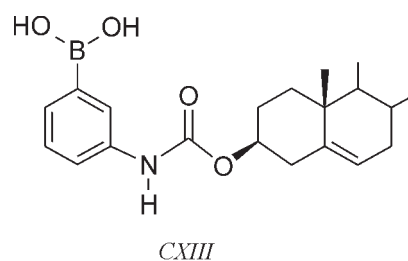
I další steroidy s dusíkatým heterocyklem v molekule se ukázaly být užitečné. Vždy šlo o látky, které se shodovaly s aktivní látkou jen v jedné části molekuly. Tak isoxazol *CV* je inhibítorem aromatasy (CYP 19), zatímco imidazol v poloze 17 (látká *CVI*) je inhibítorem C17 $\alpha$ -hydroxylasy-C17,20-lyasy. Podobnou aktivitu měl i derivát pyridinu *CVII*.

Úspěch heterocykly substituovaných steroidů byl inspirací k dalším modifikacím, tentokrát přímo steroidního jádra. Byla připravena řada různých oxa- a azasteroidních skeletů s heteroatomem v nejrůznějších pozicích. Zajímavá je historie 4-azasteroidu *CVIII* (obr. 29). Firma Merck v osmdesátých letech „racionalizovala“ pracovní místa ve výzkumu a s předpokladem útlumu steroidní chemie zredukovala počet steroidních chemiků ve vývojovém oddělení z dvaceti na jednoho. Po letech tento poslední mohykán připravil sloučeninu, kterou se Merck chlubil dodnes: Finasterid (*CVIII*) byl silným inhibítorem obou izozymů 5 $\alpha$ -reduktasy<sup>52</sup> a tedy účinným lékem při benigní hyperplazii prostaty (pro finalizaci patentu ale firma musela znova najmout asi dvacet chemiků a vychovat z nich nové sterináře).

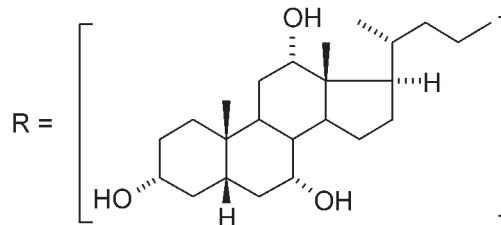
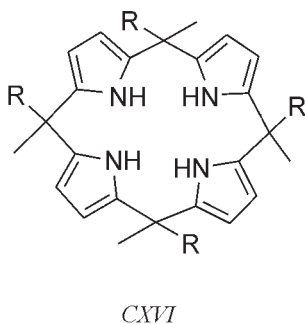
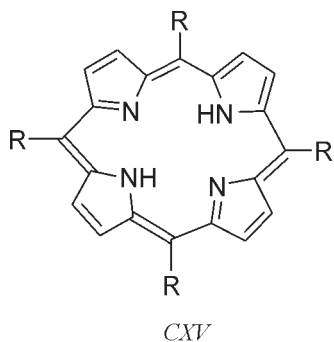
Jiný derivát s heteroatomem v kruhu (*CIX*) má stejné *in vitro* vlastnosti, navíc ještě v nadledvinkách inhibuje účinek 3 $\beta$ -hydroxy-<sup>5</sup>-steroidní dehydrogenasy a 3-keto-<sup>5</sup>-steroidní isomerasy, která katalyzuje oxidaci např. androstendiolu na testosteron.

## 7. Syntéza sloučenin obsahujících steroidní molekulu jako stavební blok

Ještě jedna skupina biologicky aktivních látek, jejichž součástí je steroidní složka, byla v poslední době intenzivně studována. Jejím představitelem je např. kosalan (*CX*, obr. 30). Je to silný antivirový prostředek, který mimo jiné inhibuje replikaci HIV viru typu 1 a 2. Zdá se, že mechanismus tohoto účinku je několikery<sup>53</sup>. Látka byla připravena z cholestanonu (*CXI*) Wittigovou reakcí, chráněná hydroxylová skupina v lát-

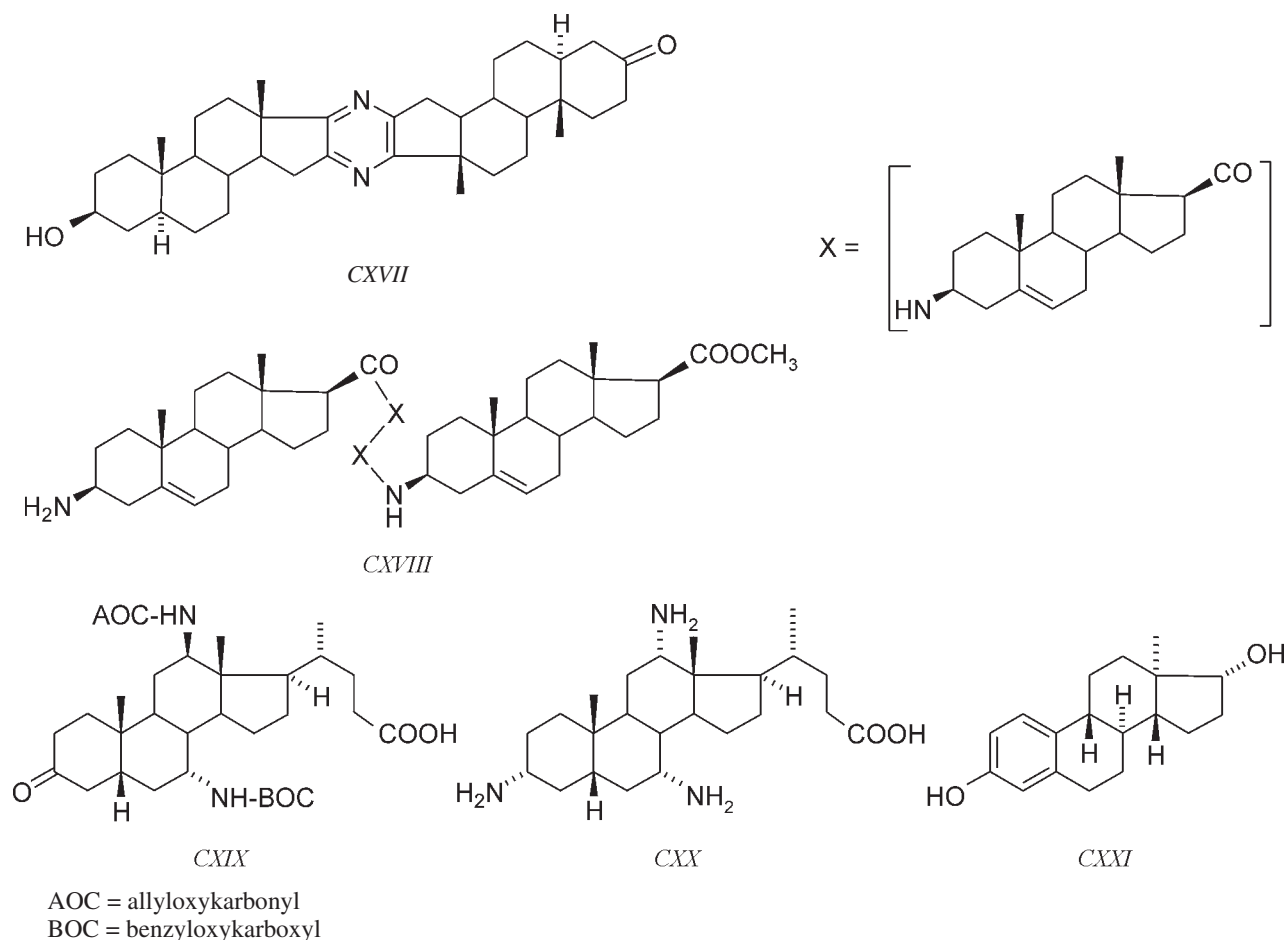
Obr. 30. Kosalan (*CX*) a jeho syntéza

Obr. 31. Cholesterol jako chirální substituent



Obr. 32. Steroidní molekula jako modifikující substituent porfyriu





ce *CXIIa* ( $R = \text{OSiR}_3$ ) byla uvolněna, alkohol *CXIIb* ( $R = \text{OH}$ ) byl převeden na bromid *CXIIc* ( $R = \text{Br}$ ) a kvarternizován působením trifenylofosfinu na *CXIIId* ( $R = \text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{Br}$ ). Pro další Wittigovu reakci byl pak použit vhodně substituovaný benzenofenon.

V těchto látkách je cholestanový zbytek zřejmě biogenním lipofilním zbytkem, který usnadňuje interakci s membránou. V této souvislosti se mluví o cholestanovém zbytku v molekule jako o „lymphotropic vector“. Látek konstruovaných s podobnými představami bylo připraveno víc a měnily se jen farmakofory (např. *N,N*-bis(2-chloroethyl)-*N*-nitrosomočovina<sup>54</sup> při přípravě nového cytostatika).

Je třeba si uvědomit, že cholestanová část je nejen rigidním alifatickým zbytkem, ale že je i chirální složkou. Toho využili různí autoři, např. při konstrukci sloučenin umožňujících rozpoznání chiralit. Např. látka *CXIII* (obr. 31) umožní rozlišovat jednotlivé monosacharidy. Jedna až dvě molekuly této látky se vážou s jednou molekulou sacharidu a maxima reflexe se posouvají k vyšší či nižší vlnové délce způsobem pro daný sacharid charakteristickým<sup>55</sup>. Látka *CXIV* byla schopna v kyselém prostředí komplexovat chirální kationty, např. aminokyseliny.

Podobné využití chirálních steroidních bloků slibují konjugáty steroidů s porfyrinem, které byly připraveny<sup>56</sup> z aldehydů odvozených od chráněných derivátů kyseliny cholové kondenzací s pyrrolem. Reakce byla prováděna v dichlorme-

thanu za katalýzy  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ . Např. látka *CXV* (obr. 32), molekula s 12 hydroxylovými skupinami, fungovala jako receptor oligosacharidů s komplexační konstantou  $10^4 \cdot \text{mol}^{-1}$ . Podobně – za kyselých katalýz vznikají kalixpyrroly typu *CXVI*, které se selektivně komplexují s některými kyselinami, jako je např. kyselina vinná.

Rigidita a chiralita – tyto dvě základní charakteristiky steroidů – byly v pozadí dalších syntéz, které stavěly výšemolekulární produkty z vhodných steroidních substrátů. Tak jako je v ritterazinu základní jednotkou diazin tvořený dvěma steroidními jednotkami, tak byly vybudovány<sup>57,58</sup> látky se dvěma až čtyřmi jednotkami typu *CXVII* a *CXVIII*, které jsou studovány jako modulátory buněčných membrán, schopné zprostředkovat přenos iontů přes membránu.

Jiný případ, kdy steroidní sloučenina byla použita jako rigidní chirální stavební blok, byla příprava „scaffold“ pro přípravu nepeptidových knihoven metodami kombinatorní chemie využívající syntézy na pevné fázi. V tomto případě byla kyselina cholová (*Xa*,  $R = \text{H}$ ) postupně přeměněna<sup>59</sup> v selektivně chráněný derivát 3-oxo-7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -diamino-5 $\beta$ -cholánové kyseliny *CXIX*. Východí kyselina cholová byla díky rozdílným vlastnostem všech tří hydroxylových skupin postupně chráněna v poloze 3, oxidována v poloze 7 a příslušný oxim byl redukován na 7 $\alpha$ -aminoskupinu. Ta byla chráněna acylací, a pak byla hydroxylová skupina v poloze 12 oxidována a přes oxim opět převedena na příslušný amin, který

byl chráněn jinou acylovou skupinou. Látka CXIX byla prostřednictvím karboxylové skupiny v postranním řetězci navázána na polymerní nosič, na němž pak byly jednotlivé skupiny v polohách 3, 7 a 12 selektivně uvolňovány a postupně randomizovaně acylovány. Podobná látka CXX byla připravena podobným způsobem a nazvána „amfifilem“: z  $\alpha$ -strany steroidní molekuly totiž ční silně polární aminoskupiny, zatímco  $\beta$ -strana je zcela nepolární. Tato látka byla studována v souvislosti s možností přenosu aniontů přes membránu.

## 8. Závěr

V Praze byly studovány steroidy už před 120 lety<sup>60</sup> a naskytá se otázka, zda steroidní chemie už nevstoupila do závěrečné etapy své existence. Dozorčí rady některých velkých farmaceutických společností mají k tomuto názoru blízko, vždyť na současných steroidních produktech už vydělávají dost, proč tedy přinášet na trh nové preparáty, které by se musely draze prosazovat na trhu? Výzkumníci ale vědí, že enantiomery přírodních látek mají někdy vlastnosti zcela nečekané: např. estradiol<sup>61</sup> vykazuje hormonální vlastnosti v gonádách a neuroprotektivní účinky v mozku, ale jeho enantiomer CXXI funguje jen v mozku, což umožňuje separaci obou aktivit. Zdá se tedy, že vše, co bylo dosud v oblasti biologicky aktivních steroidů vykonáno, bude muset být ještě zopakováno za *Alenčíným zrcadlem*.

## LITERATURA

- Černý V., v knize: *Chemie přírodních látek*, sv. 8, str. 82. Edice Macro N-8, Praha 1982.
- Wanyonyia A. W., Chhabra S. C., Mkojib G., Eilert U., Njuea W. M.: *Phytochemistry* 59, 79 (2002).
- Cragg G. M., Newman D. J., Snader K. M.: *J. Nat. Prod.* 60, 52 (1997).
- He H., Kulanthaivel P., Baker J. J., Kalter K., Dorges J., Cafield D., Wolff L., Adam L.: *Tetrahedron* 51, 51 (1995).
- Morzycki J. W., Gryszkiewicz A.: *Pol. J. Chem.* 75, 983 (2001).
- Siesking O., Kintzinger J. P., Metz B., Albrecht P.: *Tetrahedron* 51, 2009 (1995).
- Sala G. D., Izzo I., Riccardis F. D., Sodano G.: *Tetrahedron Lett.* 39, 4741 (1998).
- Jones S. R., Selinsky B. S., Rao M. N., Zhang X., Iinney W. A., Tham F. S.: *J. Org. Chem.* 63, 3786 (1997).
- Zhang X., Rao M. N., Jones S. R., Feibush R., McGuigan M., Tzodikov N., Feibush B., Sharkansky I., Snyder B., Mallis L. M., Sarkahian A., Wilder S., Turse J. E., Kinney W. A., Kjaerdsgaard H. J., Michalak R. S.: *J. Org. Chem.* 63, 8599 (1997).
- Alexander D. L., Fisher J. F.: *Steroids* 60, 290 (1995).
- Kurosawa T., Nomura Y., Mahara R., Yoshimura T., Kimura A., Ikegawa S., Tohma M.: *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1551 (1995).
- Pouzar V., Slavíková T., Černý I.: *Steroids* 63, 454 (1998).
- García-Segura L. M., Azcoitia I., DonCarlos L. L.: *Prog. Neurobiol.* 63, 29 (2001).
- Dicko A., Morissette M., Ben Armeur S., Pérolet M., Di Paolo T.: *Brain Res. Bull.* 49, 401 (1999).
- Ruenitz P. C.: *Curr. Med. Chem.* 2, 791 (1995).
- Bieber E. J., Barnes R. B.: *Int. J. Fertil. Womens Med.* 46, 73 (2001).
- Baracat E., Haidar M., Lopez F. J., Pickar J., Deu M., Negro-Vilar A.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 2020 (1999).
- Genazzani A. R., Benedekjasmann L. J., Hart D. M., Andolsek L., Kicovic P. M., Tax L.: *Maturitas* 13, 243 (1991).
- Amin D., Cornell S. A., Gustafson S. K., Needle S. J., Ullrich J. W., Bilder G. E., Perrone M. H.: *J. Lipid Res.* 33, 1657 (1992).
- Weber K. S., Setchell K. D. R., Stocco D. M., Lephart E. D.: *J. Endocrinol.* 170, 591 (2001).
- Gill-Sharma M. K., D'Souza S., Padwal V., Balasinar N., Aleem M., Parte P., Juneja H. S.: *J. Endocrinol. Invest.* 24, 598 (2001).
- Pols H., Eastell R., Delmas P., Adachi J., Ensrud K., Harper K., Sarkar S., Gennari C., Reginster J. Y., Recker R., Harris S., Wu W., Black D., Genant H.: *Bone* 28, Suppl. 85 (2001).
- Hámpel R., Lapčík O., Hill M., Klak J., Kasal A., Nováček A., Sterzl I., Sterzl J., Stárka L.: *Physiol. Res. (Prague)* 49, Suppl. 1 107 (2000).
- Brzozowski A. M., Pike A. C. W., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engstrom O., Ohman L., Greene G. L., Gustafsson J.-A., Carlquist M.: *Nature* 389, 753 (1997).
- Lieberman S.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 774, 1 (1995).
- Marmorston J., Griffith G. C., Geller P. J., Fishman E. L., Welsch F., Weiner J. M.: *J. Am. Geriatr. Soc.* 23, 481 (1975).
- Bobyleva V., Paziienza L., Muscatello U., Kneer N., Lardy H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 380, 367 (2000).
- Šulcová J., Hill M., Mašek Z., Česká R., Nováček A., Hámpel R., Stárka L.: *Physiol. Res. (Prague)* 50, 9 (2001).
- Shi J., Schulze S., Lardy H. A.: *Steroids* 65, 124 (2000).
- Pahlavani M. A.: *Age (Chester, Pa)* 21, 153 (1998).
- Liu D., Dillon J. S.: *J. Biol. Chem.* 277, 21379 (2002).
- Savic I., Berglund H., Gulyas B., Roland P.: *Neuron* 31, 661 (2001).
- Moriarty R. M., Enache L. A., Kinney W. A., Allen C. S., Canary J. W., Tuladhar S. M., Guo L. A.: *Tetrahedron Lett.* 36, 5139 (1995).
- Wang Z. Q., Cushman M.: *Synth. Commun.* 28, 4431 (1998).
- Reese P. B.: *Steroids* 66, 481 (2001).
- La Cour T. G., Guo C., Bhandaru S., Boyd M. R., Fuchs P. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 692 (1998).
- LaCour T. G., Guo C., Boyd M. R., Fuchs P. L.: *Org. Lett.* 2, 33 (2000).
- Kumar N., Koida S. S., Tsong Y. Y., Sundaram K.: *Steroids* 65, 629 (2000).
- Grove M. D., Spencer G. F., Rohwedder W. K., Mandava N., Worley J. F., Warthen J. D., Jr., Steffens G. L., Flippen-Anderson J. L., Cook J. C., Jr.: *Nature* 281, 216 (1979).
- Dinan L., Harmatha J., Lafont R.: *J. Chromatogr., B* 935, 105 (2001).

41. Kohout L., Strnad M., Kamínek M.: ACS Symp. Ser. 474, 56 (1991).
42. Černý V., Buděšínský M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 55, 2738 (1990).
43. Back T., Baron D. L., Luo W., Nakajima S. K.: J. Org. Chem. 62, 1179 (1997).
44. Blazejewski J.-C., Guilhem J., Le Guyader F.: J. Chem. Soc., Perkin Trans 1 1997, 1913.
45. Stárka L., Hampl R., Kasal A., Kohout L.: J. Steroid Biochem. 17, 331 (1982).
46. Hu Y., Sherwin P. F., Covey D. F.: Steroids 60, 250 (1995).
47. Kasal A., Hampl R., Bičíková M., Stárka L.: Steroids 57, 460 (1992).
48. Ling Y. Z., Li J. S., Liu Y., Kato K., Klus G. T., Brodie A.: J. Med. Chem. 40, 3297 (1997).
49. Sato K., Windisch K., Matko I., Vizi E. S.: Br. J. Anaesth. 82, 904 (1999).
50. Lowenick C. V., Krampfl K., Schneck H., Kochs E., Bufler J.: Eur. J. Pharmacol. 413, 31 (2001).
51. Urbanský M., Proška J., Drašar P.: Collect. Czech. Chem. Commun. 64, 1457 (1999).
52. Frye S. V.: Curr. Pharm. Design 2, 59 (1996).
53. Paul G. C., De Clercq E., Pannecouque C., Witvrouw M., Loftus T. L., Turpin J. A., Buckheit R. W., Cushman M.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 2149 (2000).
54. Elkihel L., Gelin M., Letourneux Y.: Drug Res. 45, 190 (1995).
55. James T. D., Kawabata H., Ludwig R., Murata K., Shin-kai S.: Tetrahedron 51, 555 (1995).
56. Dukh M., Drašar P., Černý I., Pouzar V., Shriver J. A., Král V., Sessler J. L.: Supramol. Chem. 14, 237 (2002).
57. Černý I., Pouzar V., Buděšínský M., Drašar P.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 1597 (2000).
58. Černý I., Buděšínský M., Pouzar V., Drašar P.: Collect. Czech. Chem. Commun. 66, 933 (2001).
59. Kasal A., Kohout L., Lebl M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 60, 2147 (1995).
60. Reinitzer F.: Monatsh. Chem. 9, 421 (1888).
61. Green P. S., Yang S. H., Nilsson K. R., Kumar A. S., Covey D. F., Simpkins J. W.: Endocrinology 142, 400 (2001).

**A. Kasal** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*):  
**Steroids at the Beginning of the 21st Century**

The review is based on a short lecture, presented to post-graduate students of chemistry. Emphasis was laid on trends of steroid chemistry at the turn of the century. The steroid nomenclature is briefly reviewed with respect to the names frequently used in literature, in which mainly medical authors prefer historical names. Several types of new natural steroids are given. Biological activity of isolated steroids or their synthesised analogues is the major impetus in modern steroid chemistry. The future prospect of steroid chemistry is bright considering the fact that unnatural enantiomers usually have a different activity from that of their natural counterparts. This suggests a repetition of the whole steroid chemistry behind Alice's looking glass.

# AGLOMERACE ČÁSTIC A DEFLUIDAČNÍ JEVY VE FLUIDNÍ VRSTVĚ

MILOSLAV HARTMAN, OTAKAR TRNKA,  
KAREL SVOBODA a VÁCLAV VESELÝ

Ústav chemických procesů, Akademie věd České republiky,  
Rozvojová 135, 165 02 Praha 6  
e-mail: hartman@icpf.cas.cz

Došlo 20.11.02, přepracováno 6.3.03, přijato 15.4.03.

Klíčová slova: fluidní vrstva, aglomerace částic, defluidace

## Obsah

1. Úvod
2. Pohled do historie
3. Příčiny a fyzický obraz defluidace
4. Faktory ovlivňující defluidaci
5. Defluidace při teplotách rovných nebo blízkých teplotě okolí
6. Defluidace při zvýšených nebo vysokých teplotách
  - 6.1. Pyrolýza plastů
  - 6.2. Spalování popelnatého uhlí a biomasy
7. Závěr

## 1. Úvod

Fluidní vrstva jako procesní jednotka nabízí pro realizaci chemických a fyzikálních transformací látek řadu výhod. Díky velmi dobrému promíchávání částic je teplota v celém objemu vrstvy prakticky stejná. Další předností je, že rychlost sdílení tepla i hmoty je ve fluidní vrstvě mimořádně vysoká. Prostředí fluidní vrstvy je proto vhodné pro realizaci reakcí citlivých na teplotu nebo operací se silným tepelným zabarvením (např. sušení a spalování). Protože se fluidní vrstva chová podobně jako tekutina, značně usnadňuje manipulaci se zrnitými materiály. Převládající vertikální rozměr, jakož i nepřítomnost pohyblivých částí u fluidních jednotek představují výhody i z pohledu stavebního a strojního.

V chemických procesech se fluidní vrstvy využívá např. při katalytické výrobě vinyl-acetátu, polymerizaci olefinů, chloraci kovových oxidů a při spalování nebo zplyňování uhlí, odpadu či biomasy. V procesech fyzikálních se fluidní vrstva používá např. při sušení, potahování, ohřevu nebo chlazení částic a v adsorpčních operacích.

Hydrodynamické chování fluidní vrstvy je složité, ale již základní fyzikální představa suspenze tuhých částic vertikálně protékajícího plynným (vznášených) plynem naznačuje případná úskalí tohoto systému. Je evidentní, že pracovní oblast rychlostí fluidačního média (obvykle plynu) nemůže být příliš široká a je závislá – vedle dalších faktorů – především na distribuci velikostí a dalších vlastností částic zrnitého materiálu ve vrstvě i na vlastnostech fluidačního média. Zatímco podíly

jemných částic mohou být při dané rychlosti plynu z vrstvy unášeny, hrubé částice mohou v jejich spodních partiích segregovat. Segregace částic může vést až k defluidaci, tj. ke tvorbě zón nehybných částic. Tento jev – někdy také označovaný jako „zaléhávání“ fluidní vrstvy – je velice nežádoucí, neboť znamená ztrátu výše zmíněných výhod fluidní vrstvy a může vést k průmyslovým haváriím.

Způsob fluidace či režim fluidních vrstev se široce mění v závislosti na velikosti a hustotě částic a na rychlosti plynu. Charakteristiky a vymezení různých režimů fluidní vrstvy může čtenář nalézt např. v některých z našich dřívějších prací<sup>1-3</sup>.

Z různých příčin (např. přílišná vlhkost, vysoká teplota či chemická reakce) mohou být částice lepkavé (přílnavé) nebo se lepkavými stávají. V důsledku toho se mohou shlukovat či aglomerovat a vytvářet tak shluky (slepence), které jsou obtížně fluidovatelné. Vhodným opatřením (zásahem) lze aglomeraci a následnou segregaci narušit (např. zvýšením lineární rychlosti plynu) a škodlivé defluidaci je možno předejít. Samotná aglomerace nemusí být vždy nežádoucí, neboť ji lze s výhodou využít např. při granulaci jemných prášků. Vysoká hybnost větších částic a potlačený kontakt mezi nimi umožňuje ve fluidní vrstvě zpracovávat (např. sušit) i pastovité, tzn. značně lepkavé látky.

Jiným nežádoucím jevem je vynášení (únos) jemných lepkavých částic z vrstvy. Unesené částice potom mohou vytvářet obtížné inkrustace na stěnách reaktoru, teplosměnných plochách, v cyklonech, příp. i v následných separačních zařízeních. Tyto jevy obvykle také vedou k vážným provozním poruchám.

V předložené práci je podán stručný obraz stavu poznatků o aglomeraci částic a defluidálních jevech ve fluidní vrstvě.

## 2. Pohled do historie

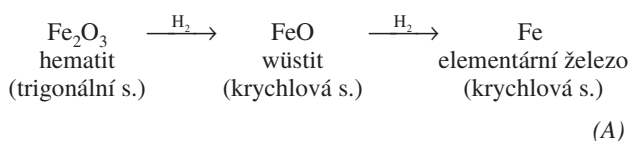
Ve srovnání s průlomovými vynálezy, jakými byly ve fluidaci Winklerův fluidní generátor v roce 1926, nebo katalytické krakování v roce 1942, se poznatky o defluidaci v odborné literatuře objevují až se značným časovým odstupem.

Mezi prvními, kteří zmínili nežádoucí defluidální jevy, byli v roce 1966 Agarwal a Davis<sup>4</sup>. Zabývali se redukcí zrnité, blíže nespecifikované železné rudy vodíkem při teplotách 590–815 °C. Autoři<sup>4</sup> zjistili, že vrstva vykazovala tendenci „zaléhat“, když byl reakční produkt zredukován více než z 90 % a pracovní teplota byla vyšší než 620 °C. Po vychlazení defluidované vrstvy byly částice slepené jen lehce a reaktor bylo možno bez mechanických potíží vyčistit.

K defluidaci docházelo někdy náhle, v jiných případech postupně. Defluidální jevy se projevovaly poklesem tlakového spádu přes vrstvu a zhoršením kontaktu mezi plynem a částicemi. Mezi okolnostmi, které ovlivňovaly tendenci fluidní vrstvy „zaléhat“ (cit.<sup>4</sup>), lze vysledovat tři základní faktory: chemická konverze částic, teplota vrstvy a rychlost plynné fáze.

Grandsden a spol.<sup>5</sup> pracovali s velmi podobným reakčním

systémem – redukovali hematit vodíkem při teplotách 600–900 °C:



Také tito výzkumníci<sup>5</sup> se museli vypořádat s defluidací vrstvy, i když k ní docházelo při teplotách poněkud vyšších (nad 710 °C) než v cit.<sup>4</sup> Zjistili také, že při těchto teplotách dochází k nukleaci a následnému růstu nodusů elementárního železa na vnějším povrchu částic. Při teplotách nižších než 710 °C, kdy k defluidaci nedochází, probíhají tyto morfologické změny ve vnitřku pórovitých částic wüstitu. Je tedy zjevné, že přítomnost chemické reakce a fyzikálně-chemické vlastnosti nové fáze, tvořící se na povrchu částice, mají pro aglomeraci a defluidaci primární důležitost.

### 3. Příčiny a fyzický obraz defluidace

Prvotním jevem každé defluidace je shlukování (aglomerace, sintrování, slinování či spékání) drobných částic do větších agregátů. K tomuto procesu může docházet jak při nižších teplotách (např. při sušení), tak i při teplotách velmi vysokých (např. při spalování nebo zplyňování uhlí). Ke shlukování částic dochází působením adhezivních sil vyvolaných přilnavostí jejich povrchů. Značná hybnost částic rychle se pohybujících ve fluidní vrstvě ( $m_p \cdot v_p$ ) však působí proti kohezivním silám a má tendenci tvořící se shluky rozvolňovat.

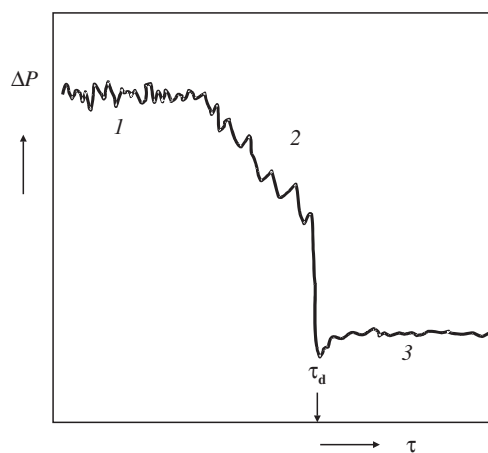
Malé a lehké částice jsou k aglomeraci náchylnější než částice velké a těžké. V tomto ohledu se také uplatňuje velký specifický (vnější) povrch jemných částic. O tom, zda k aglomeraci částic dojde či nikoliv, rozhoduje souběh celé řady faktorů jako jsou povrchové vlastnosti částic (přilnavost), jejich velikost a hustota a i rychlost proudění a fyzikální vlastnosti plynné fáze. Na aglomeraci je nutno pohlížet jako na velmi složitý jev, jenž dosud nebyl plně objasněn.

Výhodné vlastnosti fluidní vrstvy, zmíněné v úvodu, jsou vázány na vhodný pracovní režim. Vedle charakteru částic, daného hlavně Archimedovým kritériem  $Ar$ , hydrodynamický režim fluidní vrstvy silně ovlivňuje tzv. přebyteková rychlost  $U - U_{mf}$  představující rozdíl mezi (zvolenou) pracovní rychlostí plynu  $U$  a jeho rychlostí u prahu fluidace částic  $U_{mf}$  ve vrstvě. Tak např. pro režim bublinové fluidní vrstvy se přebyteková rychlost ( $U - U_{mf}$ ) pohybuje v rozsahu cca 0,05–0,30  $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  pro částice typu B a D Geldartovy klasifikace<sup>6</sup>. Je evidentní, že v důsledku aglomerace původních částic se mohou větší či menší rychlostí tvořit částice (shluky, aglomeráty) mnohem větší, jejichž prahová rychlost fluidace je podstatně vyšší než  $U_{mf}$  původních částic. Takto se pracovní režim vrstvy mění: klesá intenzita míchání a může docházet k segregaci, tj. k hromadění větších částic v oblasti distributoru fluidačního plynu.

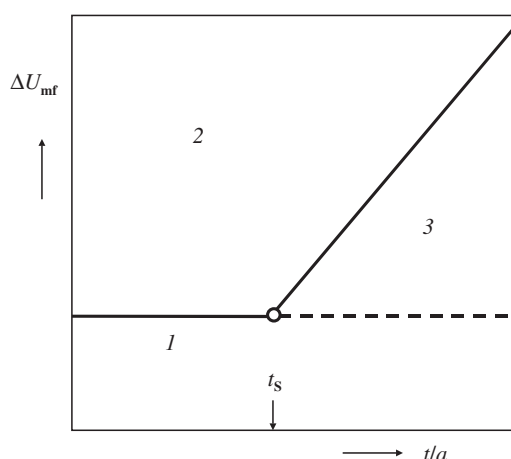
Když jsou vzniklé aglomeráty natolik veliké, že jejich prahová rychlost fluidace je větší než pracovní rychlost (tj.  $U_{mf,s} > U$ ), nemohou být udržovány ve vznosu a vytvářejí nehybnou vrstvu se všemi jejími atributy. Tento krajně nežádoucí jev je označován jako defluidace či zalehnutí fluidní

vrstvy. Defluidovaná (zalehlá) vrstva však není rozprostřena po distributoru rovnoměrně a obsahuje kanály různého průřezu, kterými plyn prochází. V tomto stavu je kontakt mezi částicemi a plynem velmi málo efektivní.

Tlakové změny ve fluidní vrstvě vyvolané postupující aglomerací a následnou defluidací jsou znázorněny na obr. 1. Pro dobrý stav fluidní vrstvy jsou charakteristické rychlé tlakové fluktuační malých amplitud. S nástupem aglomerace (tj. na prahu defluidace) se frekvence fluktuační snižuje a tlakový spád (tlaková ztráta) přes vrstvu klesá. Ve stavu defluidace proudí prakticky veškerý plyn kanály vzniklémi v zalehlé vrstvě. V důsledku toho je tlaková ztráta takovéto vrstvy značně nižší než tomu bylo ve fluidním stavu a k fluktuačním tlaku nedochází. Je příznačné, že pokud vrstva nezůstala de-

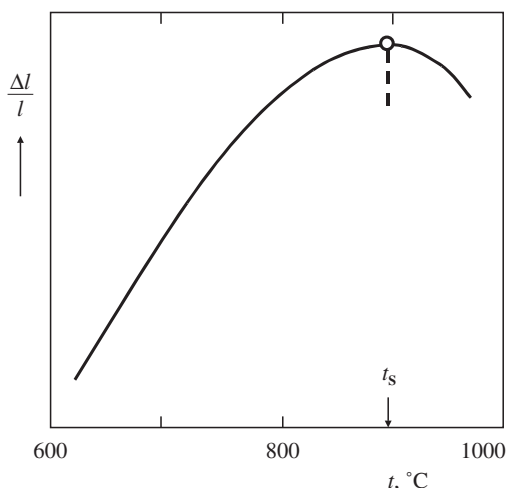


Obr. 1. Tlaková ztráta fluidní vrstvy  $\Delta P$  při postupné aglomeraci a následné defluidaci; 1 – normální fluidace, 2 – aglomerace, postupné zhoršování kontaktu, 3 – defluidace (zalehnutí) vrstvy;  $\tau_d$  – čas defluidace,  $\tau$  – čas



Obr. 2. Vliv teploty  $t$  (přilnavosti  $a$ ) částic na režimy vrstvy tuhých částic; 1 – statická vrstva, 2 – fluidní vrstva, 3 – defluidovaná (zalehlá) vrstva;  $t_s$  – teplota počátku sintrování (aglomerace),  $\Delta U_{mf}$  – rozdíl prahové rychlosti fluidace aglomerujících a neaglomerujících částic





Obr. 3. Relativní tepelná roztažnost  $\Delta l / l$  nehybné vrstvy měděných kuliček o průměru 0,51–0,58 mm (cit.<sup>7</sup>);  $t_s$  – teplota počátku sintrování (899 °C),  $t$  – teplota vrstvy

fluidována dlouho, může se přiměřeným zvýšením rychlosti plynu opět uvést do fluidního stavu.

Vliv aglomeračních tendencí na chování fluidní vrstvy je znázorněn na obr. 2. Jak je z obrázku patrné, od jisté hodnoty roste prahová rychlost fluidace s aglomeračním „potenciálem“ částic. To znamená, že k rozvolnění defluidované vrstvy je zapotřebí tím vyšší rychlosti plynu (větší energie), čím jsou aglomerační tendence částic silnější.

V případě aglomerace vyvolané účinky vysoké teploty je primární veličinou teplota počátečního sintrování (slinování, spékání) či prahová teplota sintrování  $t_s$ . Tento materiálový údaj lze stanovit z nezávislých měření tepelné roztažnosti sloupce částic v dilatometru, jak je ilustrováno na obr. 3. První projevy zvýšené přilnavosti částic vedoucí ke zhoršené fluidovatelnosti jsou patrné již při teplotách blízkých se prahové teplotě sintrování (viz obr. 2 a 3).

Je příznačné, že teplota počátečního sintrování je výrazně nižší než je teplota bodu tání. Tak např. teplotní práh sintrování měděných kuliček o průměru 0,51–0,58 mm činí 899 °C (cit.<sup>7</sup>), zatímco body tání mědi a oxidu měďnatého jsou 1084, resp. 1446 °C.

#### 4. Faktory ovlivňující defluidaci

O parametrech řídících defluidací jeví mnoho známo není. Dosavadní praktické zkušenosti však potvrzují významné vlivy teploty, rychlosti fluidační tekutiny a velikosti částic. Tendenci částic slepovat se při vzájemných kolizích je možno vyjádřit formálně jednoduchým vztahem<sup>8</sup>

$$S = h (a B / C) \quad (1)$$

kde  $S$  je náchyllost (tendence) částic k aglomeraci,  $a$  jejich přilnavost (adhesivnost),  $B$  plocha kontaktu a  $C$  je hybnost částic. Rovnice (1) naznačuje, že náchyllost vrstvy k defluidaci je úměrná přilnavosti částic, ploše jejich kontaktu a nepřímo úměrná hybnosti částic ve vrstvě.

Přilnavost, povrch a hybnost částic závisí jak na materiálu tvořícím vrstvu, tak i na pracovních podmínkách. Přilnavosti může být přiřazena nulová hodnota při teplotě počátku sintrování  $t_s$ , při teplotách vyšších přilnavost s teplotou roste (viz obr. 2). Je tedy zřejmé, že při  $t \leq t_s$  není zapotřebí k zabránění aglomerace žádná přebytečná hybnost částice ( $(U_{mf,s} - U_{mf}) m_p$ ). Tato potřebná hybnost však většinou rychle roste s rostoucí teplotou vrstvy nebo přilnavostí částic. Částice jsou většinou isometrické nebo i sférické, jejichž vnější povrch je funkcí jejich velikosti (průměru). Vedle velikosti lze hybnost částic ovlivňovat především rychlostí tekutiny; kontaktní povrch je možno měnit hlavně velikostí částic.

Například zkušenosti s popelem z uhlí indikují, že náchyllost popelových částic k aglomeraci je možno zmenšit snížením pracovní teploty vrstvy, zvýšením rychlosti plynu a zvětšením velikosti částic. Významně se uplatňuje i výška vrstvy: slabší tendence k defluidaci jsou patrné u mělkých vrstev. Pokud je vrstva provozována při teplotě vyšší než je teplota prahu sintrování, rychlost plynu musí být podstatně vyšší než je normální prahová rychlost fluidace.

Lepivost vrstvy je faktorem vymezujícím hranice pracovní oblasti, které musí být respektovány. Stupeň lepivosti závisí na množství a charakteru lepidla substance ve vrstvě. Meze bezpečného trvalého provozu závisí složitým způsobem na řadě proměnných jako jsou chemické složení, střední velikost a distribuce velikosti částic, rychlost fluidačního plynu, teplota, tlak, geometrie reaktorové nádoby aj. Jakkoliv je struktura pracovních mezí komplikovaná, lze je experimenty jasně a s dobrou reprodukovatelností vymezit.

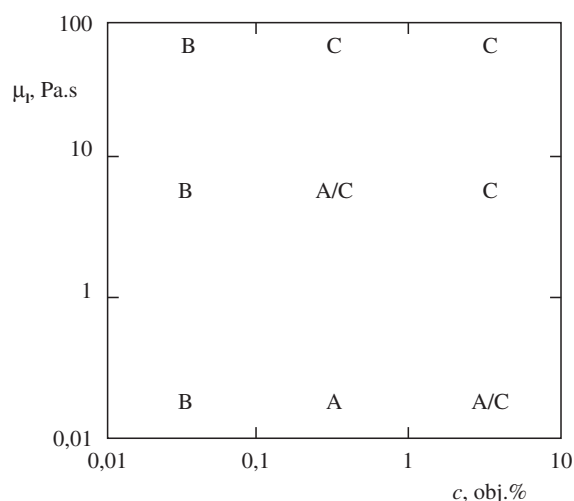
#### 5. Defluidace při teplotách rovných nebo blízkých teplotě okolí

Do této kategorie patří např. fluidní sušení produktů nebo poloproduktů v potravinářském či chemickém průmyslu, jako jsou droždí, kasein, cukr, celulosové kaly aj. Všechny tyto materiály jsou v surovém stavu silně lepidly a navíc se velmi lehce deformují. Obsahují obvykle vysoký podíl vlhkosti a samy o sobě nejsou fluidovatelné. Nicméně, když jsou tyto látky vhodným způsobem uváděny do fluidní vrstvy částic více či méně již předsušených, je jejich fluidní sušení nejen technicky schůdné, ale i v mnoha směrech výhodné.

Je evidentní, že takovéto jednotky pracují v blízkosti prahu defluidace neustále. Jejich hladký chod je podmíněn kvalifikovaným řešením celého procesu včetně jeho řízení. V ČR to byl Zdeněk Beran se svými spolupracovníky (VÚCHZ Brno, VUT Brno), kteří na základě svého původního „know-how“ úspěšně realizovali i v zahraničí řadu fluidních sušáren lepidly a pastovitých látek v provozním měřítku (např. cit.<sup>9–11</sup>). Jak je v takovýchto případech pravidlem, průmyslově využitelné poznatky o chování lepidly systémů nejsou bohužel v běžné literatuře dostupné.

Za účelem studia mechanismů defluidací jeví je možno snadno vyvolat či ovlivňovat lepivost částic přidávkou kapaliny různé viskozity a různého povrchového napětí<sup>12–14</sup> při běžné laboratorní teplotě. Ukazuje se, že přidávek kapaliny k suchým částicím může ovlivnit jejich fluidovatelnost (vlastnosti fluidní vrstvy) v jednom nebo druhém směru, a to v závislosti hlavně na množství a viskozitě kapaliny ve vrstvě. Malé množství nízkoviskózní kapaliny působí jako mazivo,





Obr. 4. Vliv viskozity  $\mu_1$  a relativního objemu kapaliny  $c$  ve fluidní vrstvě tuhých částic na její chování (fluidovatelnost) z pohledu Geldartovy klasifikace<sup>3,15,16</sup>; velikost částic  $\bar{d}_p = 1,09$  mm; hustota částic  $\bar{\rho}_p = 2594$  kg.m<sup>-3</sup> (cit.<sup>14</sup>); A, B, C typy částic vykazují zhoršující se fluidovatelnost v tomto pořadí

zvyšuje pohyblivost částic a tím zlepšuje jejich fluidovatelnost. Při vyšších koncentracích kapaliny jsou částice lepivé, obtížně fluidovatelné a snadno vytváří kanály ve vrstvě. Tyto skutečnosti jsou ilustrovány na obr. 4. Obecně platí, že materiály kategorie A fluidují velmi dobře, částice typu B hůře a materiály třídy C jsou kohezivní a vytváří kanály. Pro podrobnější popis tříd tuhých materiálů odkazujeme čtenáře na naši dřívější práci<sup>3</sup>.

Ukazuje se, že fluidovatelnost souvisí s poměrem kohezních sil kapalných můstek  $\lambda$  mezi částicemi (součet viskozitních sil a sil povrchového napětí) a třecích sil vyvolaných vertikálně proudícím plynem. Jestliže  $\lambda > 0,4-0,5$ , vrstva se stává náchylnou k defluidaci. S rostoucími hodnotami  $\lambda$  se tendence defluidovat posiluje. Tyto skutečnosti demonstrují důležitost přitažlivých sil mezi částicemi i pro Geldartovu klasifikaci<sup>3,15,16</sup> vrstev suchých částic, kde dominují třecí síly Coulombovy nebo síly van der Waalsovy.

Fyzikálně zajímavým, a dosud ne zcela vysvětleným jevem, je defluidace vyvolaná náhlou záměnou lehkého fluidačního plynu (např. vodíku) za těžký (např. za dusík nebo argon). Tato defluidace je pouze přechodná: po několika minutách se normální fluidace samovolně obnovuje. Vyskytuje se pouze při fluidaci malých a lehkých částic typu A dle Geldartovy klasifikace (např. částice katalyzátoru). Má se za to, že tento typ aglomerace a defluidace souvisí s rozdíly v rychlosti difuze v emulzní fázi fluidní vrstvy, viskozitě a adsorpci jednotlivých plynů na povrchu částic<sup>17-19</sup>.

## 6. Defluidace při zvýšených nebo vysokých teplotách

### 6.1. Pyrolýza plastů

Jednou z oblastí, ve které jsou velmi důležité aglomerační a defluidací jevy, jsou pyrolýzní technologie k využití plas-

tových odpadů pro energetické účely nebo k recyklaci suroviny. Po uvedení inertních částic do horké fluidní vrstvy inertním plynem se polymerní částice velmi rychle ohřívá, taví se, přerušují se polymerní vazby a dochází k pyrolýze, tzn., že se uvolňují těkavé látky (hořlaviny). Zatímco např. polyethylen (PE) se takto zcela transformuje na plynné složky, poly(ethylen-tereftalát) (PET) zanechává po pyrolýze jisté tuhé reziduum (cca 12 % původní hmotnosti). Lze tedy očekávat, že aglomerační a defluidací jevy budou při pyrolýze těchto dvou vsudypřítomných plastů odlišné.

Tabulka I

Teploty bodu tání (b.t.) významných látek a eutektických směsí

Materiál	b.t. [°C]	Materiál	b.t. [°C]
Polyethylen	137	Na <sub>2</sub> O . 2 SiO <sub>2</sub> <sup>a</sup>	874
Polypropylen	252	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	884
Poly(ethylen-tereftalát)	265	K <sub>2</sub> ŠO <sub>4</sub>	1069
		Na <sub>2</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>a</sup>	1135
KCl	770	K <sub>2</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>a</sup>	1135
K <sub>2</sub> O . 4 SiO <sub>2</sub> <sup>a</sup>	770	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1340
2 CaO . 3 P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sup>a</sup>	774	SiO <sub>2</sub> (křemen)	1450
NaCl	801	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (hematit)	1565
(KPO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>	810	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (korund)	2054

<sup>a</sup> Eutektické směsi<sup>21</sup>

Jsou-li pelety PE nebo PET pyrolýzovány při teplotách 450–650 °C ve vrstvě inertních částic fluidované dusíkem, jsou tendence k aglomeraci částic a defluidaci vrstvy velmi silné u obou polymerů<sup>20</sup>. Za stejných podmínek je k těmto jevům poněkud náchylnější systém s PE než s PET. Z tabulky I je patrné, že výše zmíněné pracovní teploty jsou podstatně vyšší, než jsou teploty bodů tání obou polymerů. Rozhodujícím faktorem pro nástup defluidace je množství polymeru přítomné ve vrstvě, ať už ve formě viskózní kapaliny, nebo přilnavých uhlíkových reziduí. Při pyrolýze PE je rozhodující veličinou poměr tloušťky polymerního filmu ulpívajícího na částicích písku k jejich průměru ( $\delta/\bar{d}_p$ ). Kritická hodnota tohoto poměru pro počátek aglomerace se pohybuje kolem 0,011. Toto zjištění potvrzuje vyšší náchylnost k aglomeraci a defluidaci u malých částic. Rychlost akumulace roztaveného polymeru ve vrstvě je dán bilanční relací mezi rychlostí jeho nástřiku do reaktoru a rychlostí jeho pyrolýzy. Protože rychlost pyrolýzy roste se zvyšující se teplotou, je při vyšších teplotách náchylnost k defluidaci menší. Nelze také pominout skutečnost, že viskozita polymerní taveniny s rostoucí teplotou exponenciálně klesá. Se zvyšující se teplotou se tendence k aglomeraci takto postupně oslabuje a za teplot vyšších než 700 °C při pyrolýze PE k defluidaci nedochází vůbec.

### 6.2. Spalování popelnatého uhlí a biomasy

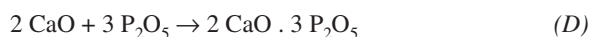
Vzhledem k nízké pracovní teplotě se fluidní spalování zdá být ideální technologií pro struskující (škvárující) uhlí. Po-

dobně jako škvárující uhlí se při spalování chovají některé materiály přírodního původu (např. sláma a dřevěné štěpky), jež mají vysoký obsah alkalických sloučenin (např. KCl). Ukazuje se však, že i při teplotách fluidního spalování jsou s těmito palivy, či spíše s jejich popelem, potíže<sup>22</sup>.

Při spalování sirnatého uhlí ve fluidní vrstvě křemenného písku ( $\text{SiO}_2$ ) se tyto částice nechovají jako materiál inertní, ale pokrývají se vrstvou tvořenou hlavně thenarditem ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), síranem sodno-vápenatým a anhydritem ( $\text{CaSO}_4$ , cit.<sup>23</sup>). Šodné sírany jsou snadno tavitelné látky ochotně vytvářející s popelovými složkami eutektické směsi s nízkým bodem tání (viz tabulka I). Nízkotavná eutektika fungují jako pojivo (tmelidlo) především pro jemné (prachové) podíly popela, obsahujícího široké spektrum chemických složek. Nejpravděpodobnějšími a z hlediska aglomerace nežádoucími reakcemi jsou vysokoteplotní reakce sloučenin alkalických kovů s oxidem křemičitým



Vznikající směsné oxidy jsou eutektika s body tání 874 a 770 °C (cit.<sup>21</sup>). Podobně reaguje oxid fosforečný přítomný v popelu s oxidem vápenatým



za vzniku eutektické směsi s teplotou bodu tání 774 °C.

Z přechodových kovů v popelu z uhlí dominuje železo ve formě  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , jež také reaguje s alkáliemi ( $X = \text{Na}$  nebo  $\text{K}$ )



Je známo, že  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  reaguje s alkáliemi ochotněji než  $\text{SiO}_2$  (cit.<sup>24</sup>). Je-li proto molární poměr  $\text{Fe}_2\text{O}_3 / (\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O})$  v popelu větší než jedna, reakce (B) a (C), vedoucí k nízkotavným eutektikům, by se neměly uplatňovat.

Depozici vyvolanou chemickými reakcemi<sup>25</sup> a následnými fázovými změnami probíhajícími na povrchu fluidovaných částic však lze potlačit nebo výrazně zpomalit. Často však z technologických důvodů není možno snižovat pracovní teplotu vrstvy. V takových případech se jako depresory aglomerace účinně uplatňují přísady např. hlinitých nebo železitých sloučenin<sup>24</sup>.

Z tabulky I je patrné, že nejnáze se taví eutektika nebo sloučeniny obsahující jako alkalické složky  $\text{K}_2\text{O}$  nebo  $\text{Na}_2\text{O}$  a jako kyselé složky chloridy,  $\text{SiO}_2$  nebo  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Není bez zajímavosti, že teplota bodu tání samotného  $\text{SiO}_2$  je vysoká (1450 °C).

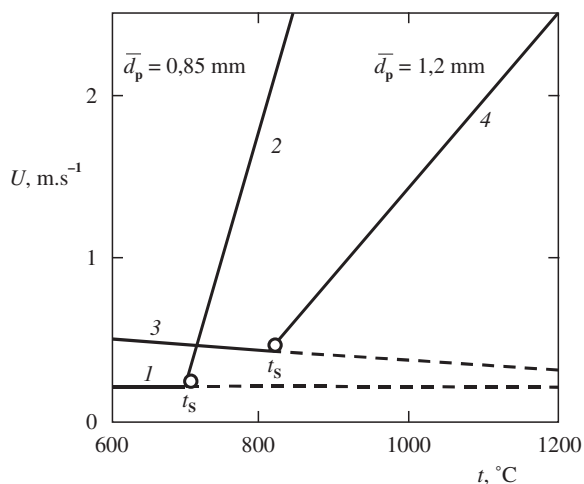
Draslík patří mezi základní živiny prakticky pro všechny rostliny. Udržuje se ve velké míře v rostlinných tkáních a po jejich spálení zůstává v popelu. Tak např. popel z pšeničné slámy nebo z kůry stromů obsahuje více než 20 hm.%  $\text{K}_2\text{O}$ . Je tedy zřejmé, že při spalování biomasy ve vrstvě křemenného písku jsou tendence k aglomeraci velmi silné. Jako schůdné řešení se nabízí např. společné spalování biomasy s uhlím.

Na to, zda v konkrétní vrstvě dojde k aglomeraci či nikoliv, má velmi silný vliv teplota. Pracovní teplota ve fluidní vrstvě se pro účinné spalování pohybuje obvykle kolem 850 °C. Je nutno si však uvědomit, že hořící částice mají většinou teploty

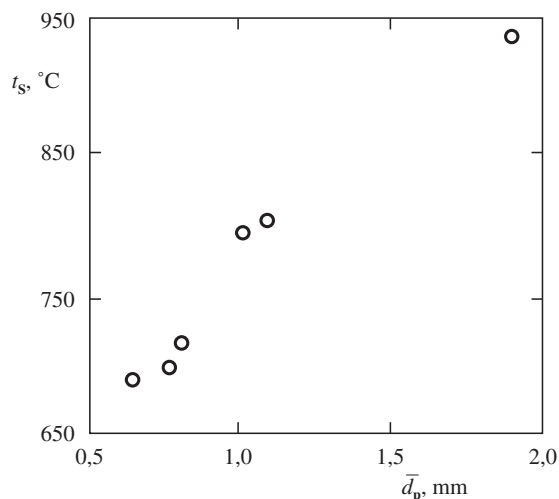
významně vyšší než je teplota vrstvy, a že o nástupu aglomerace rozhodují právě tyto teploty.

Detailní mechanismus aglomerace dosud není jasný, ale nepochybně se při ní uplatňuje řada jevů<sup>26–28</sup>, jako částečné tavení (přítomnost i malých množství eutektik), plastická deformace, viskózní tok, molekulární difuze aj., které vyvolávají adhezivní síly mezi částicemi.

Existují tři rozdílné způsoby, jak určovat náchylnost vrstvy k aglomeraci: standardní stanovení tavitelnosti popela, sintrační test založený na měření pevnosti v tlaku popelových pelet a testy řízené aglomerace na laboratorním fluidním zařízení. Nejspolehlivější je třetí metoda, i když porovnání s výsledky získanými na zařízeních provozní velikosti chybí.



Obr. 5. Vliv teploty  $t$  a velikosti částic  $\bar{d}_p$  na defluidiční tendence fluidní vrstvy popelu z uhlí<sup>22</sup>; 1, 3 – prahová rychlost fluidace neaglomerujících částic  $U_{mf}$ ; 2, 4 – prahová rychlost fluidace / defluidace aglomerujících částic  $U_{mf,s}$ ; (O) teplota počátku sintrování (aglomerace) částic  $t_s$



Obr. 6. Dilatometricky změřené teploty počátku sintrování  $t_s$  popelu z uhlí jako funkce velikosti částic  $\bar{d}_p$  (cit.<sup>22</sup>)

Rozhodující vliv na teplotu prahu aglomerace mají chemické charakteristiky materiálu vrstvy a konkrétního paliva (popela) a z nich plynoucí fyzikálně-chemické interakce, jenž mohou vést k tvorbě snadno tavitelných eutektických směsí. V takových případech je účinek ostatních faktorů, jako je rychlost plynu nebo velikost částic, na prahovou teplotu aglomerace relativně slabý.

K nejnáze tavitelným a tedy nežádoucím látkám, které se při spalování uhlí a biomasy mohou vyskytnout, patří chloridy, příp. sírany alkalických kovů a jejich eutektika a zejména eutektické směsi oxidů alkalických kovů s oxidem křemičitým (viz tabulka I). Náchylnost částic k aglomeraci lze snížit přidáním vhodných materiálů do fluidní vrstvy. K nejúčinnějším patří látky schopné vázat alkalické kovy jako např. gibbsit ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ), bauxit ( $\text{AlO}(\text{OH})$ ), sillimanit ( $\text{Al}_2\text{SiO}_5$ ), kaolinit ( $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) a další hlinitokřemičitanové jílovité minerály. Aglomeraci vrstvy je možno potlačit též přidáním dolomitu ( $\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$ ) nebo vápence ( $\text{CaCO}_3$ ). Jako inertní částice fluidních vrstev jsou vhodné materiály s nízkým obsahem přístupného  $\text{SiO}_2$  jako gabro<sup>29</sup> (obsahuje minerály jako např. pyroxen,  $\text{M}_2^{\text{II}}\text{Si}_2\text{O}_6$ ; amfibol,  $\text{M}_7^{\text{II}}[(\text{Al}_2\text{Si})_4\text{O}_{11}](\text{OH})_2$ , živce  $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ – $\text{KAlSi}_3\text{O}_8$ – $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$  aj.), olivínový písek ( $(\text{Mg},\text{Fe})_2\text{SiO}_4$ ) a živce.

## 7. Závěr

Agglomerace částic je způsobena lepivostí jejich povrchů. Jestliže aglomerace není řízena tak kvalifikovaně, jako je tomu např. u některých fluidních sušáren, chování fluidní vrstvy se v důsledku aglomerace drasticky mění. Vrstva postupně degraduje a rychlost cirkulace vrstvy se zpomaluje, až se částice dostanou do klidového stavu, kdy plyn prochází kanály ve znehýbnělé vrstvě částic (defluidace).

Lepivost povrchu částic je vyvolána přítomností tekutin (vlhkost, tavenina) nebo sintrací tuhé fáze při zvýšených teplotách. Detailní mechanismus aglomerace není znám, ale v jejím průběhu se uplatňují jevy jako tvorba eutektických směsí, plastická deformace, viskózní tok, molekulární difuze aj. Do jisté míry lze aglomeračním tendencím ve fluidní vrstvě čelit vyšší hybností částic, tj. zvýšením rychlosti fluidačního plynu a volbou hrubších částic.

Aglomerační a defluidací procesy jsou aktuální i při fluidním spalování nebo zplyňování méněhodnotných uhlí či biomasy a jsou velmi citlivé na teplotu. Kritická teplota pro práh (počátek) aglomerace závisí především na chemické charakteristice materiálu vrstvy a paliva (popela). Například interakcemi mezi alkáliemi a některými křemičitými sloučeninami se na povrchu fluidovaných částic tvoří eutektické směsi s teplotou bodu tání nižší než je potřebná pracovní teplota vrstvy. Aglomerační tendence jsou dále posilovány dalšími faktory, jako je lokální redukční atmosféra či zvýšená teplota na povrchu reagujících (hořících) částic.

Nastupující aglomeraci ve vysokoteplotní vrstvě je možno potlačit přidávky vhodných materiálů jako jsou dolomit, vápence a látky na bázi oxidu hlinitého. Mezi praktické materiály vrstvy odolné vůči aglomeraci patří různé přírodní aluminosilikáty s nižším obsahem oxidu křemičitého. Potížím s aglomerací při spalování biomasy se lze vyhnout společným spalováním s (neaglomerujícím) uhlím.

## Seznam symbolů

$a$	přilnavost (adhezivnost) částic ve vrstvě
$B$	dotyková plocha částic, $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$
$c = (V_f/V_s) \cdot 100$	relativní objem kapaliny ve vrstvě, obj.%
$C = m_p \cdot v_p$	hybnost částice, $\text{kg} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
$\bar{d}_p$	střední velikost částic, obvykle určená síťováním, m
$f$	funkce
$g$	tíhové zrychlení ( $= 9,807$ ), $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$
$h$	funkce v rovnici (I)
$\Delta l$	diference výšky (délky) nehybné vrstvy způsobené změnou teploty, m
$l$	výška vrstvy při normální teplotě, m
$m_p$	hmotnost částice, kg
$\Delta P$	rozdíl tlaku, Pa
$S$	náchylnost (tendence) částic k aglomeraci
$t$	teplota, $^{\circ}\text{C}$
$t_s$	teplota počátku sintrování, $^{\circ}\text{C}$
$U$	mimovrstvová rychlost plynu v zařízení, $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
$U_{mf} = f(\text{Ar})$	prahová rychlost fluidace neadhezivních částic, $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
$U_{mf,s}$	prahová rychlost fluidace za podmínek, kdy se uplatňuje přilnavost částic, $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
$v_p$	rychlost částice ve fluidní vrstvě, $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
$V_1$	objem kapaliny přidané do vrstvy, $\text{m}^3$
$V_s$	objem částic ve vrstvě, $\text{m}^3$

## Bezrozměrná kritéria

$$\text{Ar} = \bar{d}_p^3 \cdot g \cdot \rho_f \cdot (\rho_p - \rho_f) / \mu_f^2 \quad \text{Archimedovo kritérium}$$

## Řecké symboly

$\delta$	tloušťka adhezivního filmu kapaliny (taveniny) na částici, m
$\lambda$	poměr kohezních sil mezi částicemi ke třecím silám, vyvolaným vertikálním proudem plynu
$\mu_f$	viskozita fluidační tekutiny (plynu), Pa.s, $\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$\mu_l$	viskozita kapaliny, Pa.s, $\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$\rho_f$	hustota fluidační tekutiny (plynu), $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
$\rho_p$	hustota částice, $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
$\tau$	čas, s
$\tau_d$	čas defluidace, s

*Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou ČR (grant č. 203/02/0002) a Grantovou agenturou Akademie věd ČR (granty č. 4072201 a 4072001).*

## LITERATURA

- Hartman M., Yates J. G.: Collect. Czech. Chem. Commun. 58, 961 (1993).
- Hartman M., Coughlin R. W.: Collect. Czech. Chem. Commun. 58, 1213 (1993).
- Hartman M., Beran Z., Svoboda K., Veselý V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 60, 1 (1995).
- Agarwal J. C., Davis W. L.: Chem. Eng. Prog. Symp. Ser. 62 (67), 101 (1966).
- Gransden J. F., Sheasby J. S., Bergougnou M. A.: Chem. Eng. Prog. Symp. Ser. 66 (105), 208 (1970).

6. Hartman M., Svoboda K., Veselý V., Ziolkowski D.: Chem. Listy 81, 1233 (1986).
7. Gluckman M. J., Yerushalmi J., Squires A. M., v knize: *Fluidization Technology* (Keairns D. L., ed.), str. 395. McGraw-Hill, New York 1976.
8. Siegel J. H.: Powder Technol. 38, 13 (1984).
9. Beran Z., v knize: *Drying '92, Part B* (Mujumdar A. S., ed.), str. 1303. Elsevier, Amsterdam 1992.
10. Beran Z., Hartman M., Bednařík J., Koza F.: Užitný vzor 3847 (1995).
11. Beran Z., Koza F.: Užitný vzor 6906 (1997).
12. Pata J., Čárský M., Hartman M., Veselý V.: Ind. Eng. Chem. Res. 27, 1413 (1988).
13. Kuwagi K., Takano K., Horio M.: Powder Technol. 113, 287 (2000).
14. McLaughlin L. J., Rhodes M. J.: Powder Technol. 114, 213 (2001).
15. Geldart D.: Powder Technol. 7, 285 (1973).
16. Yates J. G.: *Fundamentals of Fluidized-Bed Chemical Processes*. Butterworths, London 1983.
17. Rietema K., Hoebink J.: Powder Technol. 18, 257 (1977).
18. Kai T., Takahashi T.: AIChE J. 43, 357 (1997).
19. Kai T., Kamei T., Takahashi T.: AIChE J. 44, 491 (1998).
20. Arena U., Mastellone M. L.: Chem. Eng. Sci. 55, 2849 (2000).
21. Levin E. M., McMurdie H. F., Hall F. P.: *Phase Diagrams for Ceramists*. American Ceramic Society, Ohio 1964.
22. Basu P., Sarka A.: Fuel 62, 924 (1983).
23. Vuthaluru H. B., Linjewile T. M., Zhang D., Manzoori A. R.: Fuel 78, 419 (1999).
24. Lee J.-K., Gu J.-H., Kim M.-R., Chun H.-S.: J. Chem. Eng. Jpn. 34, 171 (2001).
25. Tardos G., Pfeffer R.: Powder Technol. 85, 29 (1995).
26. Skrifvars B.-J., Hupa M., Backman R., Hiltunen M.: Fuel 73, 171 (1994).
27. Skrifvars B.-J., Öhman M., Nordin A., Hupa M.: Energy Fuels 13, 359 (1999).
28. Öhman M., Nordin A.: Energy Fuels 12, 90 (1998).
29. Mann M. D., v knize *Circulating Bed Technology VII* (Grace J. R., Zhu J., de Lasa H., ed.), str. 645. Can. Soc. Chem. Eng., Ottawa 2002.

**M. Hartman, O. Trnka, K. Svoboda, and V. Veselý**  
(*Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Agglomeration of Particles and Defluidization Phenomena in the Fluid Bed**

Fluidized-bed reactors can be employed in various thermal processes like combustion, gasification or pyrolysis aimed at gaining energy or material recovery. Stable long-term operations can be plagued with particle agglomeration which can dramatically degrade the quality of fluidization. The stickiness of particles mainly depends on chemical interactions between the bed material and the fuel. Although the agglomeration and defluidization of beds of sticky particles are well-reproducible phenomena, their mechanisms are not fully understood yet. It appears that processes such as plastic deformation, viscous flow, molecular diffusion, etc., develop adhesive forces between particles bringing about their agglomeration that can eventually lead to defluidization. The agglomeration and defluidization processes are very sensitive to temperature. At usual combustion temperatures, the mineral residue of a fuel (e.g., alkalis-containing ash) reacts with inert bed particles (e.g., silica sand) forming mixed oxides and corresponding low-melting-point eutectics on the surface of particles. The factors that enhance the formation of agglomerates include local reducing conditions and high temperature on the surface of the burning fuel particles. When planning a high-temperature operation with materials prone to agglomeration, the phenomena of cohesion and defluidization should carefully be observed in small-scale tests. The tendency of a bed to agglomerate can be reduced or minimized by additives such as dolomite, limestone, kaolin and other clays or using low-silica bed materials.



# GENOM RETROVIRŮ A FYZIOLOGICKÁ FUNKCE JEHO PRODUKTŮ

PETR STRNAD, ŠÁRKA HAUBOVÁ  
a TOMÁŠ RUML\*

Ústav biochemie a mikrobiologie a Centrum integrované genetiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
e-mail: tomas.ruml@vscht.cz

Došlo 30.5.02, přepracováno 23.7.02, přijato 13.1.03.

Klíčová slova:

## Obsah

1. Úvod
2. Struktura virionu
3. Organizace genomu
4. Životní cyklus
5. Klasifikace retrovirů
6. Virus lidské imunodeficience
7. Strukturní proteiny
  - 7.1. Polyproteinový prekurzor Gag
  - 7.2. Matrixový protein
  - 7.3. Kapsidový protein
  - 7.4. Nukleokapsidový protein
8. Závěr

## 1. Úvod

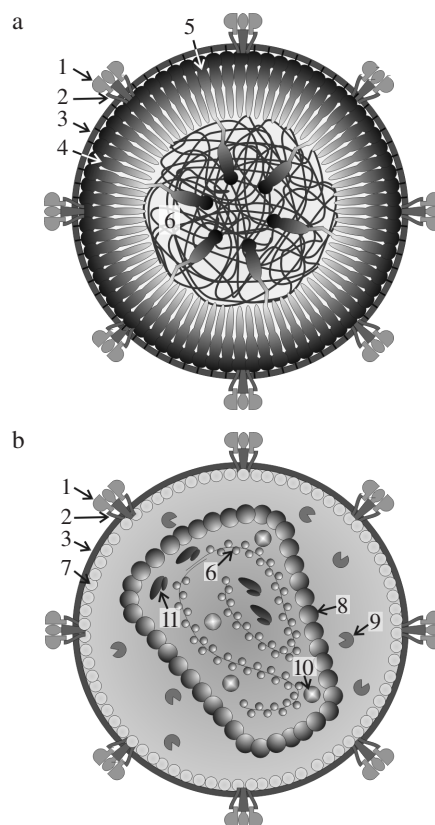
Čeď *Retroviridae* zahrnuje viry s diploidním RNA genomem, replikujícím se pomocí RNA-dependentní DNA polymerasy (reverzní transkriptasy). Retroviry jsou v posledních letech předmětem velmi intenzivního výzkumu zejména v souvislosti s pandemií choroby AIDS, ale i vzhledem k jejich onkogenním účinkům. Detailní studium regulace genové exprese, životního cyklu, způsobu skládání kapsid a mechanismu infekce přináší poznatky použitelné nejen v oblasti medicíny a farmakologie, ale odhaluje též základy chování biologických objektů na molekulární úrovni. Příkladem může být objev reverzní transkripce, díky němuž muselo být přehodnoceno známé centrální dogma molekulární biologie. Výzkum retrovirů indukované onkogeneze byl prvním krokem k pochopení buněčného cyklu a vedl k objevu buněčných onkogenů. Retroviry také poskytly nepostradatelný nástroj molekulární biologie, jakým je použití reverzní transkriptasy pro přípravu tzv. cDNA knihoven. Jedná se o soubory genů ve formě dvojřetězcové DNA, získaných přepisem sestřížených mRNA, tj. kódujících úseků zbavených intronů jakožto „nadbytečných“ úseků. Lze je tedy využít pro expresi eukaryotických genů i v bakteriálních buňkách, jímž mechanismus sestříhu chybí. Další perspektivní oblastí je využití

\* Autor pro korespondenci

modifikovaných retrovirových genomů pro expresi klonovaných genů v buňkách obratlovců a jako „dopravních prostředků“ pro genové terapie<sup>1</sup>.

## 2. Struktura virionu

Struktura virové částice je v základních rysech společná všem retrovirům. Má sférický tvar o průměru asi 80–100 nm (cit.<sup>1</sup>). Je složena přibližně z 1–2 % RNA, 35 % lipidů a 65 % proteinů<sup>2</sup>. Vnější obal je tvořen fosfolipidovou membránou, kterou virus získává během uvolnění z buňky procesem podobným pučení. Ačkoli pochází z hostitelské buňky, její složení se liší od plazmatické membrány vyšším obsahem sfingomyelinu a cholesterolu, přítomných v místech pučení ve zvýšené koncentraci (tzv. „lipid rafts“)<sup>3,4</sup>. Ve fosfolipidové membráně virionu je zakotven transmembránový glykoprotein, na který je pomocí nekovalentních interakcí vázán povrchový glykoprotein, který je zodpovědný za vazbu na receptory hostitelské



Obr. 1. Struktura nezralého (a) a zralého (b) viru; 1 – povrchový glykoprotein, 2 – transmembránový glykoprotein, 3 – dvojvrstvá fosfolipidů, 4 – polyproteinový prekurzor Gag, 5 – polyproteinový prekurzor Gag-Pro-Pol, 6 – genomová RNA, 7 – matrixový protein, 8 – „core“ tvořený kapsidovým proteinem, 9 – proteasa, 10 – integrasa, 11 – reverzní transkriptasa<sup>1</sup>

buňky a je tedy i relativně variabilní mezi retroviry. Doména transmembránového glykoproteinu, lokalizovaná vně virionu, je zodpovědná za fúzi membrán<sup>5</sup>.

Během tzv. zrání dochází k proteolytickému štěpení polyproteinových prekurzorů Gag (resp. Gag-Pro-Pol), tedy proteinů nezralé kapsidy a k reorganizaci struktur uvnitř virové partikule (obr. 1). K tomuto procesu dochází u všech retrovirů, kromě spumavirů<sup>6</sup>.

V nezralé částici (obr. 1a) jsou molekuly Gag a Gag-Pro-Pol ukotveny pod plazmatickou membránou pomocí N-koncové domény Gag, tj. matrixového proteinu (MA), který je modifikován na N-konci myristylací (většina retrovirů), nebo acetylací (ASLV) (cit.<sup>7</sup>). Molekuly Gag zde mají pravděpodobně hexagonální uspořádání (u HIV-1, M-PMV) (cit.<sup>8,9</sup>). Uvnitř nezralé kapsidy jsou s molekulami Gag spojené dvě nekovalentně vázané kopie genomové RNA, dále jsou zde přítomny buněčné tRNA a buněčné proteiny, které jsou do virionu buď náhodně nebo specificky inkorporovány.

Ve zralém virionu (obr. 1b) je polyproteinový prekurzor Gag rozštěpen na jednotlivé proteiny<sup>6</sup>. Těsně pod fosfolipidovou membránou zůstává MA, který je k ní vázán stejným způsobem, jako dříve celý Gag v nezralé částici. Uvnitř je lokalizováno kondenzované jádro (tzv. „core“), které je tvořeno kapsidovým proteinem (CA). Tvar „core“ se liší u jednotlivých retrovirů a je jedním z kritérií jejich klasifikace (viz kap. 5.). Uvnitř „core“ je komplex diploidní genomové RNA, integrasy (IN) a reverzní transkriptasy (RT) a nukleokapsidového proteinu (NC). Dále zde nalézáme tRNA, sloužící jako primer pro reverzní transkripci, mRNA a některé buněčné proteiny.

Kromě těchto domén, jež jsou společné většině retrovirů existují další, pro různé viry specifické proteiny, mající své místo a funkci ve virionu (např. u HIV jsou to Vpr, cyklofilin, HLA třídy I a další)<sup>2</sup>.

### 3. Organizace genomu

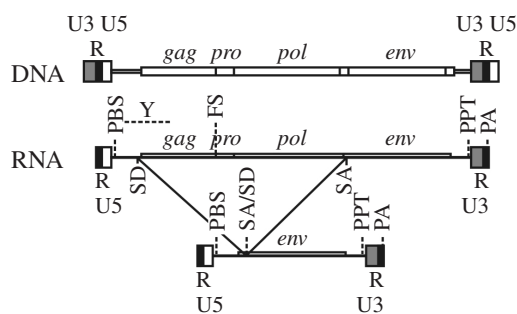
Organizací genomu jsou si všechny retroviry podobné. Jeho zobecněné schéma je na obr. 2. Je tvořen dimerem molekuly RNA, která má na 5' konci methylovanou čepičku, následuje sekvence LTR (z angl. „long terminal repeat“), tvořená úsekem R (z angl. „repeat“ – sekvence opakující se i na 3' konci) a U5 (z angl. „unique“ – jedinečná sekvence pro 5' konec). LTR v podobném uspořádání, tedy úsek U3 (sekvence jedinečná pro 3' konec) a R nalézáme i na 3' konci. V LTR se nachází promotor, zesilovač, polyadenylační signál a případně i další regulační sekvence.

Mezi koncovými sekvencemi LTR je signál pro sbalování RNA a geny pro virové proteiny. Ty jsou tvořeny minimálně geny *gag*, *pro*, *pol* a *env*. Z nesestřížené mRNA je syntetizován polyproteinový prekurzor Gag, který je prekurzorem strukturálních proteinů kapsidy. Během translace dochází s určitou pravděpodobností k posunu čtecího rámce před koncem genu *gag* (obr. 2 – FS). Tím je zrušen v původním čtecím rámci stop kodón a jsou translatovány i geny *pro* a *pol* za vzniku proteinu Gag-Pro nebo Gag-Pro-Pol. Sestřížená mRNA slouží pro translaci obalových glykoproteinů Env. Kromě těchto základních genů obsahují tzv. komplexní retroviry ještě řadu regulačních genů, které jsou translatovány podle mRNA vzniklých alternativním sestřihem.

Gen *gag* kóduje polyproteinový prekurzor Gag, z kterého štěpením virovou proteasou vznikají obecně tyto proteiny: MA – matrixový protein, CA – kapsidový protein, NC – nukleokapsidový protein. Kromě těchto kódují jednotlivé viry ještě další specifické proteiny. Geny *pro* a *pol* (translatované ve fúzi s *gag* kódují prekurzor Gag-Pro-Pol) kódují PR – proteasou, RT – reverzní transkriptasu a IN – integrasu. Gen *env* kóduje obalové glykoproteiny; povrchový glykoprotein (SU) a transmembránovou podjednotku (TM).

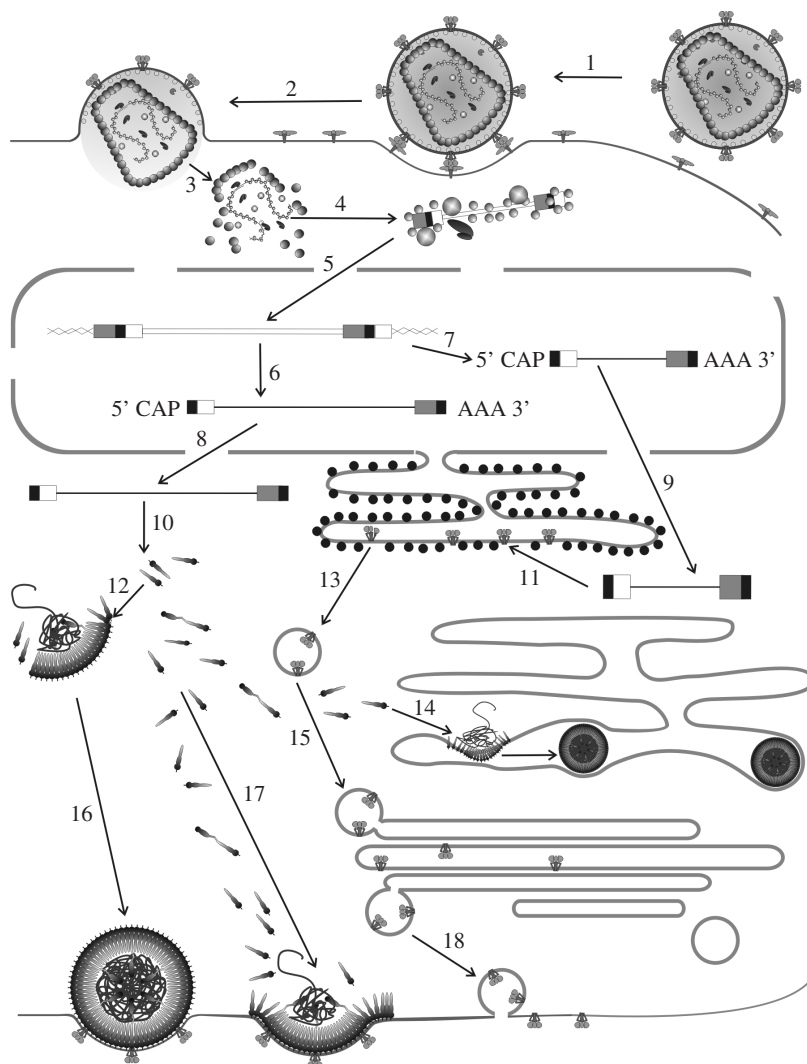
### 4. Životní cyklus

Životní cyklus retrovirů lze rozdělit na dvě fáze: časnou a pozdní. Časná fáze zahrnuje procesy od vstupu viru do buňky až po reverzní transkripci RNA genomu retroviru (obr. 3, kroky 1–4). Prvním krokem virové infekce je vazba povrchových glykoproteinů viru (SU) na receptory hostitelské buňky a následná fúze membrán zprostředkovaná transmembránovým proteinem (TM), zejména jeho hydrofobní oblastí (obr. 3, kroky 1, 2). Specifita vazby SU na buněčný receptor určuje, které buňky jsou pro vstup viru permissivní. Dále dochází ke vstupu „core“ do cytoplazmy a k jeho rozpadu (obr. 3, krok 3). Následuje využití tRNA jako primeru na vazebném místě (PBS) virové RNA, čímž je zahájena reverzní transkripce, jež probíhá v několika krocích a jejím výsledkem je přepsání jednořetězcového RNA genomu do dvojřetězcové DNA pomocí RT (obr. 3, krok 4). Tento komplexní proces je lokalizován v cytoplazmě a postupně využívá obou molekul RNA. Původní genomová RNA je z meziprojektu tohoto procesu, hybridu RNA-DNA, degradována rovněž reverzní transkriptasou, která vykazuje i RNasovou aktivitu. Je nutno poznamenat, že reverzní transkripce je ve srovnání s replikací buněčných genomů značně nepřesná a je zdrojem mnoha mutací. Proto je terapie pacientů trpících AIDS komplikována velmi rychlým vznikem mutantů resistantních k použitým lékům, a z těchto důvodů se jako jediná možnost jeví aplikace tří různých inhibitorů (dosud pouze kombinace inhibitorů reverzní transkriptasy a proteasy), tzv. kombinovaná terapie. Reverzní transkripce většinou probíhá v cytoplazmě (u ALV až v jádře a u hepadnavirů již ve virionu) v tzv. nukleoproteinovém komplexu, který obsahuje části Gag jako např. MA, CA,



Obr. 2. **Genom retrovirů**; DNA – schéma provirové DNA, RNA – schéma virové RNA (nahore) a jejího sestřihu (dole), PBS – místo vazby primeru pro reverzní transkripci,  $\Psi$  – signál pro sbalování RNA, FS – posun čtecího rámce, SA/SD – místa sestřihu, PPT – terminátor, PA – polyadenylační signál





Obr. 3. Schematické znázornění životního cyklu retrovirů; 1 – interakce s buněčnými receptory, 2 – fúze membrán a vstup „core“ do cytoplazmy, 3 – „rozbalení“ „core“, 4 – reverzní transkripce, 5 – integrace provirové DNA do chromosomu, 6, 7 – transkripce, 8, 9 – export RNA z jádra, 9 – sestřih RNA, 10, 11 – translace, 13, 15, 18 – posttranslační modifikace a sekrece obalových glykoproteinů, 12, 14, 17 – skládání kapsidy

NC, enzymy RT, IN a některé faktory pocházející z hostitelské buňky.

Prvním krokem pozdní fáze životního cyklu je integrace produktu reverzní transkripce do genomu hostitelské buňky za vzniku proviru (obr. 3, krok 5). Tento děj je katalyzován IN, která pro tento proces vyžaduje vytvoření specifického preintegračního komplexu, který vstupuje do jádra. Součástí preintegračního komplexu je lineární provirová DNA, RT, IN a pravděpodobně i CA, NC a MA. Provirus zůstává v latentní fázi dokud není aktivován.

Produkce nových virů začíná transkripcí provirové DNA buněčnou DNA polymerasou II (obr. 3, krok 6). Při její iniciaci se kromě promotoru uplatňuje řada *cis*-regulačních elementů (v LTR), transkripčních faktorů hostitelské buňky a u komplexních retrovirů také vlastních transkripčních aktivátorů (Tat, Tex u HIV-1). Část vznikající RNA je sestřihena (obr. 3, krok 9), opatřena methylovanou čepičkou na 5' konci a poly-

adenylována na 3' konci. Všechny formy RNA jsou pak exportovány do cytoplazmy, kde nesestřihená RNA slouží jako virová genomová RNA a mRNA pro translaci genů *gag*, *pro*, *pol* (obr. 3, krok 10). Sestřihená RNA je využita k expresi Env, případně dalších virových proteinů.

Gen *env* je translatován na drsném endoplazmatickém retikulu (obr. 3, krok 11) a uvnitř je produkt Env štěpen buněčnými proteasami. Vznikají tak proteiny SU a TM, které jsou transportovány do Golgiho komplexu (obr. 3, kroky 13, 15), kde probíhá jejich glykosylace, a následně jsou vystaveny na povrch buňky v místech bohatých na sfingomyelin a cholesterol (obr. 3, krok 18).

Polyproteinový prekurzor Gag vzniká translací genu *gag* na volných polysomech. Přibližně s 5–20% účinností dochází k posunu čtecího rámce před koncem *gag*, a zaniká tak stop kodón. Tím vzniká fúzní genový produkt Gag-Pro případně Gag-Pro-Pol. Tímto mechanismem je u každého viru re-

gulován poměr množství Gag:Gag-Pro:Gag-Pro-Pol. Další osud polyproteinu Gag závisí na morfogenetickém typu viru. U retrovirů typu C a lentivirů je Gag a Gag-Pro-Pol transportován k plazmatické membráně, kde vytváří shluky na vnitřní straně membrány a pučí ven z buňky (obr. 3, krok 17). V poslední době se však ukazuje, že i u retrovirů morfogenetického typu C dochází k částečné asociaci perkursorů Gag již v cytoplasmě (podrobněji viz kap. 7.). U retrovirů typu B a D a spumavirů je Gag (Gag-Pro-Pol) pravděpodobně transportován na určité místo v cytoplasmě (obr. 3, krok 12), kde vytváří tzv. A částice (strukturně podobné nezralým virionům), které jsou následně transportovány k plazmatické membráně a pučí ven z buňky (obr. 3, krok 16). Poslední možností je vznik tzv. IAP („intracisternal A-type particles“). Mechanismus je podobný morfogenesi typu C s tím rozdílem, že virus pučí do endoplazmatického retikula (obr. 3, krok 14). Tento typ se vyskytuje u některých endogenních retrovirů.

Pučením získávají retroviry svůj vnější obal, tedy fosfolipidovou dvojvrstvu mající původ v buněčné plazmatické membráně. Vzájemnou interakcí Gag a TM jsou do membrány viru selektivně inkorporovány virové obalové glykoproteiny. Jak již bylo zmíněno, důležitou roli pro transport Gag a jeho vazbu k membráně má MA doména a její N-koncová modifikace (nejčastěji myristylace).

Posledním krokem v životním cyklu retrovirů je zrání virionu. To je způsobeno proteolytickým štěpením Gag a Gag-Pro-Pol a dochází k němu velmi brzy po uvolnění viru z hostitelské buňky. Zrání je proces kompletní přestavby struktury virionu spojený s tvorbou „core“.

## 5. Klasifikace retrovirů








Retroviry taxonomicky zařazujeme do čeledi *Retroviridae*, patřící mezi DNA a RNA viry mající reverzní transkriptasu. Další členění je odvozeno od struktury a morfogenese virionu, struktury a velikosti genomu a LTR, velikosti genů a přítomnosti dalších specifických genů, tRNA použité jako primer pro reverzní transkripci atd. Toto rozdělení dobře odpovídá výsledkům fylogenetické analýzy sestavené podle vybraných domén reverzní transkriptasy. Současná klasifikace rozděluje *Retroviridae* do sedmi rodů, které jsou shrnuty v tab. I. Lentiviry jsou dále děleny do pěti skupin podle hostitele<sup>10</sup>.

Retroviry lze dále členit na komplexní a jednoduché. Komplexní mají oproti jednoduchým více možností sestihu RNA, což zvyšuje variabilitu genových produktů, např. HIV a SIV mají kromě *gag*, *pro*, *pol*, *env* ještě šest dalších proteinů, z nichž některé mají specifickou regulační funkci.

Retroviry zahrnují sedm rodů:

- alfaretroviry. Tato skupina reprezentuje exogenní i endogenní ptačí viry. Zástupci těchto virů jsou např. ALV (Avian leukosis virus) a RSV (Rous sarcoma virus),
- betaretroviry. Do této skupiny patří retroviry morfologického typu B (MMTV – Mouse mammary tumor virus) a retroviry morfologického typu D (M-PMV – Mason-Pfizer monkey virus). Jedná se o endogenní i exogenní viry myši, ovci a primátů,
- gamaretroviry. Mezi ně patří retroviry morfologického typu C. Tato skupina zahrnuje exogenní i endogenní viry savců. Prototypem je MLV (Murine leukemia virus),

Tabulka I  
Klasifikace retrovirů

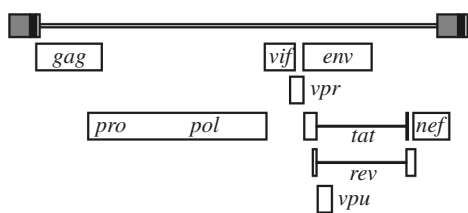
Rod	Prototyp viru	Morfogenese	Tvar zralého virionu
<i>Jednoduché retroviry</i>			
<i>Alpharetrovirus</i>	ALV	C typ	
<i>Betaretrovirus</i>	MMTV, M-PMV	B/D typ	
<i>Gammaretrovirus</i>	MLV	C typ	
<i>Komplexní retroviry</i>			
<i>Deltaretrovirus</i>	BLV	C typ	
<i>Epsilonretrovirus</i>	WDSV	C typ	
<i>Lentivirus</i>	HIV-1	C typ	
<i>Spumavirus</i>	CFV	B/D typ	

- deltaretroviry. Morfologie a tvorba kapsid těchto virů je podobná gamaretrovirům. Pro infekci jsou typická dlouhá období latence, způsobují leukémie a neurologické poruchy. Do této skupiny patří např. BLV (Bovine leukemia virus),
- epsilonretroviry. Zástupcem této skupiny je WDSV (Walleye dermal sarcoma virus),
- lentiviry. Lentiviry jsou exogenní viry způsobující pomalé, často fatální onemocnění u řady savců. Tato skupina zahrnuje HIV-1 (Human immunodeficiency virus), HIV-2, SIV (Simian immunodeficiency virus),
- spumaviry. Své označení získaly podle pěnovitěho vzhledu infikovaných buněk, jež je způsoben vakuolizací. Viry této skupiny nezpůsobují nádorová onemocnění. Mezi zástupce patří např. CFV (Chimpanzee foamy virus) a SFM (Simian foamy virus).

## 6. Virus lidské imunodeficiency

Virus lidské imunodeficiency (HIV) se díky pandemii choroby AIDS (syndrom získaného selhání imunity) stal pravděpodobně nejstudovanějším virem. Spolu s SIV patří do skupiny lentivirů primátů. Existují dva vzdálené subtypy HIV; HIV-1 převažuje ve většině oblastí světa, HIV-2 byl izolován především v západní Africe. Kmen HXB-2 HIV-1 je používán jako prototyp ve většině studií, a je ve světovém měřítku hlavní příčinou AIDS. Oba subtypy virů vznikly pravděpodobně nezávislým přenosem SIV na příslušníky domorodých kmenů žijících v Africe<sup>11</sup>.

Geny *pro* a *pol*, kódující PR, RT, IN, jsou umístěny v jed-



Obr. 4. **Genom HIV-1**; obdélníky symbolizují geny v jednotlivých čtecích rámcích

nom čtecím rámci a jsou translatovány jako součást Gag-Pol. Polyprotein Env je po translaci v endoplazmatickém retikulu štěpen buněčnou proteasou za vzniku SU a TM, které jsou po glykosylaci transportovány na povrch buňky, kde jsou inkorporovány do cytoplazmatické membrány. Struktura a funkce genu *gag* je podrobně probrána v kapitole 7. Jak již bylo zmíněno výše, genom HIV-1 obsahuje kromě základních genů ještě geny pro další proteiny, které jsou překládány ze sestřižených forem mRNA.

Jsou to: Vif, který je nutný pro produkci infekčních částic v některých buněčných liniích<sup>12</sup>; Vpr je specificky inkorporován do virionů prostřednictvím interakcí s p6 doménou Gag (cit.<sup>13</sup>) a je nezbytný pro replikaci viru a směrování provirové DNA do jádra<sup>14</sup>; Tat se váže na specifickou sekundární strukturu u 5' konce RNA a způsobuje zvýšenou produkci virové RNA; Nef způsobuje odstranění CD4 z povrchu napadené buňky<sup>15</sup>; Rev se váže na specifické místo virové RNA a zvyšuje množství nesestřižené a jednou sestřižené RNA; Vpu je integrální membránový protein, který způsobuje v endoplazmatickém retikulu disociaci komplexů SU-TM-CD4 (cit.<sup>16</sup>).

## 7. Strukturní proteiny

### 7.1. Polyproteinový prekurzor Gag

Polyproteinový prekurzor Gag je již sám o sobě, bez přítomnosti dalších virem kódovaných proteinů, schopen vytvářet kapsidy a pučet ven z buňky. Podílí se také na inkorporaci enzymů a většiny dalších virových komponent (RNA, SU, TM, Vpr) do virionu. Po štěpení virovou proteasou z něj vzniká celá řada proteinů. Struktura polyproteinu Gag zatím není známa. U různých retrovirů však byla objasněna struktura i funkce následujících domén polyproteinu Gag.

### 7.2. Matrixový protein

Matrixový protein (MA) tvoří N-terminální doménu Gag. Struktura matrixového proteinu, který vzniká po vyštěpení z Gag proteasou, byla stanovena pro HIV-1 krystalograficky<sup>17</sup> a pomocí NMR spektroskopie<sup>18,19</sup>. HIV-1 MA tvoří v krystalech trimery, ale NMR studie ukazují na jeho monomerní formu v roztoku. Nicméně cílené mutace tohoto proteinu u M-PMV, které jsou podle modelu na plochách zprostředkujících trimerizaci, způsobily snížení stability Gag a účinnosti skládání kapsid<sup>20,21</sup>. Biologická funkce multimerizace není dosud známa, ale může být důležitá pro transport, skládání kapsid a inkorporaci Env do virionu<sup>20</sup>.

Jednou z hlavních funkcí MA je zprostředkování vazby

Gag k membráně. Mutace N-koncového glycinu, který je myristylován, blokuje u HIV-1 vazbu Gag k membráně<sup>22–24</sup>. Další mutační studie bazických aminokyselin v MA HIV-1, v souvislosti s jeho prostorovou strukturou, ukazují, že pozitivní náboj vytvořený v MA doméně také zprostředkovává vazbu ke kyselým fosfolipidům na vnitřní straně membrány<sup>17,18,25</sup>. Podobné výsledky byly získány i u dalších retrovirů<sup>20,26,27</sup>. Sekvence v MA proteinu zodpovědná za vazbu k membráně byly pojmenovány M domény<sup>28</sup>. Zjištění, že samostatný MA se váže na membránu méně účinně než Gag, a že delece na C konci MA vedou k pevnější vazbě samotného MA k membráně, vedly k vytvoření teorie tzv. „myristyl switch“ (cit.<sup>29,30</sup>). Tento model je založen na předpokladu, že řetězec kyseliny myristové je v Gag vystaven ven z molekuly, zatímco v samotném MA je částečně schován. Tím je možno vysvětlit, že i přes relativně pevnou vazbu Gag k membráně může samotný MA již v rané fázi infekce disociovat od membrány a podílet se na tvorbě preintegračního komplexu. Tato teorie byla částečně podpořena dalšími studiemi<sup>31–33</sup>. Určitou roli v regulaci vazby MA k membráně může hrát jeho fosforylace<sup>34–36</sup>, avšak podíl fosforylovaného a nefosforylovaného MA nezávisí na jeho vazbě k membráně<sup>29</sup>. Další studie ukazují, že fosforylace MA je důležitá pro jeho vazbu k IN (cit.<sup>35</sup>). Již byla identifikována a charakterizována proteinkinasa asociovaná s virem<sup>37,38</sup>.

Další funkcí MA domény je směrování polyproteinového prekurzoru Gag na místo skládání kapsidy. U C typu retrovirů a lentivirů včetně HIV je to plazmatická membrána, ale delece části MA domény HIV-1 způsobila pučení do ER (cit.<sup>39,40</sup>). Náhrada MA v Gag heterologním proteinem, který se váže na membránu, způsobila pučení nejen přes plazmatickou, ale také přes intracelulární membrány<sup>33</sup>. Mutace jediné aminokyseliny změnila místo skládání kapsid z cytoplazmatické membrány na membrány Golgiho aparátu a z něj vznikajících cisteren<sup>41</sup>.

Vzhledem k tomu, že bodová mutace MA M-PMV změnila morfogenesi z B/D na C typ, můžeme předpokládat existenci dominantního signálu, který zabrání přímému transportu Gag k plazmatické membráně. Na místo toho je Gag transportován na určité místo v cytoplazmě, kde dochází ke skládání kapsidy<sup>42</sup>. Tato myšlenka byla podpořena identifikací oblasti 18 aminokyselin v MA M-PMV, která je zodpovědná za směrování resp. udržení polyproteinu Gag v cytoplazmě. Vložení této sekvence do MA MoMuLV, tedy retroviru typu C, způsobilo změnu morfogenese na B/D typ. Snímky buněk z fluorescenčního mikroskopu, které produkují GFP ve fúzi s touto sekvencí, ukazují bodovou lokalizaci GFP v cytoplazmě<sup>20,43</sup>.

V poslední době se ukazuje, že alespoň u některých retrovirů typu C vznikají intracelulární agregáty Gag, které však nejsou viditelné pomocí elektronové mikroskopie, a proto zůstaly dlouho nepopsány. Pomocí *in vitro* transkripce–translace byla analyzována raná fáze skládání kapsid HIV-1. Bylo zjištěno, že během tohoto procesu dochází postupně ke vzniku několika komplexů, jejichž konverze na složené nezralé kapsidy může být blokována nepřítomností ATP a k detergentům citlivých a necitlivých buněčných faktorů<sup>44</sup>. Toto pozorování je v souladu se zjištěním, že při expresi Gag v kvasinkách nedochází ke vzniku kapsid<sup>45</sup>, zatímco v bakulovirových i savčích expresních systémech vznikají nezralé kapsidy<sup>47</sup>. V CD4<sup>+</sup> T lymfocytech infikovaných HIV-1 byly kromě uvolněných zralých částic a nezralých virionů identifikovány ještě dva

intermediáty v procesu skládání kapsid lišící se svou citlivostí k detergentům. Tato data naznačují interakci mezi HIV-1 molekulami Gag ještě před jeho směřováním k plazmatické membráně<sup>47</sup>.

### 7.3. Kapsidový protein

Kapsidový protein (CA) tvoří ve zralém virionu tzv. „core“, které vytváří obal uzavírající genomovou RNA spolu s dalšími proteiny a RNA (viz kap. 2.). CA jako součást Gag polyproteinu hraje důležitou roli v procesu skládání virové kapsidy a jejím zrání. CA je složen ze dvou částí: N-terminální, tzv. „core“ domény, která je důležitá pro zrání virionu a u HIV-1 váže cyklofilin A (Cyp A), a C-terminální, tzv. dimerizační domény, přispívající ke vzájemným interakcím mezi molekulami Gag (cit.<sup>48</sup>). Strukturální data pro CA HIV-1 byla získána pomocí NMR spektroskopie<sup>49</sup> a rentgenové strukturální analýzy<sup>50,51</sup>. „Core“ doména je složena ze 7  $\alpha$ -helixů. Dále obsahuje 2  $\beta$ -skládané listy a exponovanou smyčku, která slouží jako vazebné místo pro Cyp A (cit.<sup>50</sup>). C-terminální doména je globulární, z velké části složena z  $\alpha$ -helixů<sup>52</sup>. Tato část obsahuje také jedinou oblast Gag, která vykazuje vysokou homologii mezi jednotlivými rody retrovirů, takzvaná „major homology region“ (MHR).

Mutace C koncové části HIV-1 CA domény Gag blokuje produkci virionů<sup>53</sup>, což naznačuje její účast na Gag-Gag interakcích. Tento fakt byl také podpořen strukturálními studiemi<sup>52</sup>. Mutace v MHR HIV-1 poskytují široké spektrum fenotypů. Konkrétně poruchy v procesu skládání a zrání kapsidy a sníženou infektivitu<sup>54</sup>. Vysvětlení je třeba hledat ve faktu, že aminokyselinové zbytky MHR tvoří síť vodíkových vazeb stabilizujících strukturu celé CA domény<sup>52</sup>. Mutace v MHR tedy pravděpodobně způsobují větší konformační změny, což může být příčinou širokého spektra pozorovaných defektů.

Pomocí kvasinkového dvouhybridového systému byla prokázána interakce HIV CA s proteiny z rodiny cyklofilinů, které v buňce slouží jako peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerasy<sup>55</sup>. Cyklofilin A (Cyp A) je specificky inkorporován do HIV-1 virionů a jeho inkorporace je nutná pro infektivitu. Viriony bez Cyp A vykazovaly defekt v rané fázi infekce, ještě před zahájením reverzní transkripce<sup>56</sup>, ale jeho přesná role v životním cyklu viru není známa. Doména vázající Cyp A se nachází v okolí prolinu v pozici 90 (cit.<sup>50,57</sup>) a inkorporace Cyp A do virionů může být blokována cyklosporinem A. Toto zjištění se zdálo být velmi slibné z terapeutického hlediska, ale při působení této látky velmi rychle vznikají rezistentní mutanty<sup>58</sup>. Přestože tyto rezistentní varianty mají mutace v blízkosti vazebného místa pro Cyp A, stále váží *in vitro* Cyp A a cyklosporin je i nadále schopen tuto vazbu narušit<sup>58</sup>. Tyto mutace tedy snížily inkorporaci Cyp A, ale způsobily, že tato látka již není ve virionu potřeba. Prostorová struktura N-terminální domény HIV-1 CA naznačuje, že inkorporace Cyp A může uvolnit CA-CA interakce a napomáhat tak v procesu otevření viru po infekci buňky<sup>50</sup>.

Mutace N-terminální domény CA obecně nezpůsobují poruchy skládání a tvorby částic, ale produkované viriony mají sníženou infektivitu a porušenou strukturu „core“<sup>59</sup>. Po proteolytickém štěpení vazby MA-CA dojde ke změně prostorové struktury N-konce CA. Tím vzniká nový motiv ovlivňující vazbu CA-CA, který může hrát důležitou roli při vzniku „core“<sup>60</sup>.

Rekombinantní HIV-1 CA vytváří *in vitro* cylindrické útvary, což je v souladu s jeho rolí při tvorbě „core“. N-terminální extenze CA C-koncovou sekvencí MA změnila tvar *in vitro* vznikajících částic na kulovité, což souhlasí s teorií o změně struktury N-konce CA po proteolytickém štěpení vazby MA-CA a s odlišným tvarem nezralé kapsidy a „core“<sup>60,61</sup>. Elektronmikroskopické studie struktur tvořených v *E. coli* ukázaly, že za tuto změnu tvaru částic odpovídá expozice či maskování N-terminálního prolinu CA (cit.<sup>62</sup>).

### 7.4. Nukleokapsidový protein

Společným znakem nukleokapsidových proteinů (NC) většiny retrovirů je přítomnost jedné nebo dvou Cys-His domén o obecné sekvenci Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-His-X<sub>4</sub>-Cys domén. Tato doména je také označována jako CCHC motiv nebo zinkový prst a její obdobu nalézáme v mnoha buněčných DNA vazebných proteinech. NC jak HIV-1 tak M-PMV obsahuje dvě takové domény, z nichž každá váže jeden zinečnatý ion<sup>63</sup>. Ve virionu nalézáme NC v jádře, vázaný na RNA (viz kap. 2.). Struktura jak samotného HIV-1 a M-PMV NC tak i HIV-1 NC vázaného na krátký oligonukleotid byla určena pomocí NMR a ukazuje, že zinkové prsty jsou lokalizovány v centrální globulární oblasti, zatímco N- a C-konce jsou relativně volnější, bez globulární struktury<sup>64,65</sup>.

Během skládání kapsidy dochází také k inkorporaci dvou kopií virové RNA. Bylo zjištěno, že virově specifická nesestřižená RNA je preferována před sestřiženými formami virové RNA a buněčnými mRNA. Mutace konzervativních cysteinů a histidinů v zinkových prstech NC u HIV-1 způsobuje významné defekty ve specifitě sbalování virové RNA a ve vazbě RNA *in vitro*<sup>66</sup>. V některých případech byl zvýšen poměr sestřižené a nesestřižené RNA ve virionu<sup>66,67</sup>. Chimérický Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) Gag obsahující HIV-1 NC specificky inkorporoval do vznikajících částic HIV-1 RNA (cit.<sup>67</sup>). Z toho vyplývá, že kromě nespecifické vazby na RNA je NC schopen specificky rozpoznávat virovou RNA a je zodpovědný za její inkorporaci do virionu. Primární doména virové RNA zodpovědná za tuto specifickou vazbu se nazývá  $\psi$  sekvence a vyskytuje se s určitou homologií u všech retrovirů. Tato oblast se nachází na 5' konci virové RNA mezi LTR a začátkem genu *gag* a vytváří strukturu 4 vlásenek (SL1–SL4) (cit.<sup>67</sup>). Vlášeny SL1–SL3, na rozdíl od SL4, vykazují vysokou afinitu k NC (cit.<sup>68</sup>). Pomocí NMR byla určena prostorová struktura HIV-1 NC s navázaným fragmentem RNA odvozeným od SL3 (cit.<sup>69</sup>) a SL2 (cit.<sup>70</sup>). Kromě specifické vazby NC jakožto součásti Gag k  $\psi$  sekvenci, odpovídající za účinnou inkorporaci virové RNA do nezralé kapsidy, je maturní NC uvnitř „core“, kde svou vazbou na RNA napomáhá její dimerizaci a zvyšuje její stabilitu<sup>71</sup>.

Mutace a delece HIV-1 Gag v oblasti NC domény způsobují poruchy uvolňování viru nebo zabraňují účinnému skládání kapsid, z čehož lze usuzovat, že NC doména Gag je důležitá i pro skládání virionu<sup>72,73</sup>. Jedná se zejména o N-koncovou oblast složenou z bazických aminokyselin<sup>74</sup>. Delece NC u RSV vedla k tvorbě částic o nižší hustotě. Tento defekt lze opravit vložením basické části NC jiného retroviru<sup>75</sup>. Analýza pomocí kvasinkového dvouhybridového systému rovněž ukazuje, že NC zprostředkovává interakce mezi molekulami Gag (cit.<sup>76</sup>). *In vitro* vytváří CA ve fúzi s NC cylindrické částice účinněji než CA samotný<sup>77</sup>. Heterologní protein, který zpro-



středkovává proteinové interakce, může zastoupit NC v procesu skládání kapsidy<sup>78</sup>. Oblasti v NC důležité pro multimerizaci Gag byly pojmenovány jako tzv. I domény (z angl. „interaction domains“)<sup>28</sup>.

V současnosti není jasné, jakou roli hraje RNA v procesu skládání kapsidy. Studie skládání přečištěného HIV-1 CA-NC *in vitro* podporují roli RNA v multimerizaci Gag, protože purifikovaný CA-NC ošetřený RNasou nevytváří cylindrické částice<sup>77</sup>.

## 8. Závěr

Je zřejmé, že retroviry jsou přes svoji malou velikost a zdánlivou jednoduchost velmi komplexní částice, v nichž všechny komponenty mají zcela specifickou a nepostradatelnou funkci. Pro nalezení účinných terapeutik je nutno znát podrobně jak mechanismus replikace jejich genomu tak zejména funkce a vzájemné interakce produktů jednotlivých genů. Kromě retrovirových enzymů, jež jsou v současnosti jediným cílem používaným pro terapii, jsou předmětem studia i regulační proteiny a interakce mezi strukturními proteiny vedoucí ke vzniku kapsidy. Objasnění těchto interakcí je důležité nejen z hlediska možného terapeutického využití, ale také pro vývoj vektorů pro genové terapie.

### Seznam použitých zkratk

ALV	Avian leukosis virus
BLV	Bovine leukemia virus
CA	kapsidový protein
CFV	Chimpanzee foamy virus
GFP	green fluorescent protein
HIV-1	Human immunodeficiency virus
IN	integráza
LTR	long terminal repeat
MA	matrixový protein
MHR	major homology region
MLV	Murine leukemia virus
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MoMuLV	Moloney murine leukemia virus
M-PMV	Mason-Pfizer monkey virus
NC	nukleokapsidový protein
PR	proteasa
RT	reverzní transkriptáza
SFM	Simian foamy virus
SU	surface glykoprotein
TM	transmembrane glykoprotein
WDSV	Walleye dermal sarcoma virus

*Tato práce byla podpořena grantem Grantové agentury České republiky č. 203/00/1005 a grantem CEZ:J19/18:223300006 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.*

### LITERATURA

- Vogt P. K., v knize: *Retroviruses* (Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E., ed.), kap. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997.
- Vogt V. M., v knize: *Retroviruses* (Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E., ed.), kap. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997.
- Quigley J. P., Rifkin D. B., Reich R.: *Virology* 46, 106 (1971).
- Aloia R. C., Titan H., Jensen F. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5181 (1993).
- Kliková M., Ruml T.: *Chem. Listy* 88, 660 (1994).
- Vogt V. M.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, 95 (1996).
- Henderson L. E., Krutzsch H. C., Oroszlan S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 339 (1983).
- Nermut M. V., Hockley D. J., Jowett J. B. M., Jones I. M., Garreau M., Thomas D.: *Virology* 198, 228 (1994).
- Nermut M. V., Bron P., Thomas D., Rumlova M., Ruml T., Hunter E.: *J. Virol.* 76, 4321 (2002).
- Hunter E., Casey J., Hahn B., Hayami M., Korber B., Kurth R., Neil J., Rethwilm A., Sonigo P., Stoye J., v knize: *Virus Taxonomy* (Van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., ed.), kap. 3. Academic Press, San Diego 2000.
- Rambaut A., Robertson D. L., Pybus O. G., Peeters M., Holmes E. C.: *Nature* 410, 1047 (2001).
- Gabuzda D. H., Lawrence K., Langhoff E., Terwilliger E. F., Dorfman T., Haseltine W. A., Sodroski J.: *J. Virol.* 66, 6489 (1992).
- Kondo E., Mammano F., Cohen E. A., Götlinger H. G.: *J. Virol.* 69, 2759 (1995).
- Heinzinger N. K., Bukrinsky M. I., Haggerty S. A., Ragland A. M., Kewalramani V., Lee M. A., Gendelman H. E., Ratner L., Stevenson M., Emerman M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7311 (1994).
- Garcia J. V., Miller A. D.: *Nature* 350, 508 (1992).
- Willey R. L., Maldarelli F., Martin M. A., Strebel K.: *J. Virol.* 66, 7193 (1992).
- Hill C. P., Worthylake D., Bancroft D. P., Christensen A. M., Sundquist W. I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3099 (1996).
- Massiah M. A., Starich M. R., Paschall C., Summers M. F., Christensen A. M., Sundquist W. I.: *J. Mol. Biol.* 244, 198 (1994).
- Matthews S., Barlow P., Clark N., Kingsman S., Kingsman A., Campbell I.: *Biochem. Soc. Trans.* 23, 725 (1995).
- Conte M. R., Klikova M., Hunter E., Ruml T., Matthews S.: *EMBO J.* 16, 5819 (1997).
- Rhee S. S., Hunter E.: *EMBO J.* 10, 535 (1991).
- Götlinger H. G., Sodroski J. G., Haseltine W. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5781 (1989).
- Freed E. O., Martin M. A.: *Nature* 369, 107 (1994).
- Gheysen D., Jacobs E., de Foresta F., Thiriart C., Francotte M., Thines D., De Wilde M.: *Cell* 59, 103 (1989).
- Zhou W., Parent L. J., Wills J. W., Resh M. D.: *J. Virol.* 68, 2556 (1994).
- Matthews S., Mikhailov M., Burny A., Roy P.: *EMBO J.* 15, 3267 (1996).
- McDonnell J. M., Fushman D., Cahill S. M., Zhou W., Wolven A., Wilson C. B., Nelle T. D., Resh M. D., Wills J., Cowburn D.: *J. Mol. Biol.* 279, 921 (1998).
- Parent L. J., Bennett R. P., Craven R. C., Nelle T. D., Krishna N. K., Bowzard J. B., Wilson C. B., Puffer B. A., Montelaro R. C., Wills J. W.: *J. Virol.* 69, 5455 (1995).



29. Spearman P., Horton R., Ratner L., Kuli-Zade I.: *J. Virol.* **71**, 6582 (1997).
30. Zhou W., Resh M. D.: *J. Virol.* **70**, 8540 (1996).
31. Ono A., Freed E. O.: *J. Virol.* **73**, 4136 (1999).
32. Paillart J. C., Gottlinger H. G.: *J. Virol.* **73**, 2604 (1999).
33. Reil H., Bukovsky A. A., Gelderblom H. R., Gottlinger H. G.: *EMBO J.* **17**, 2699 (1998).
34. Gallay P., Swingler S., Aiken C., Trono D.: *Cell* **80**, 379 (1995).
35. Gallay P., Swingler S., Song J., Bushman F., Trono D.: *Cell* **83**, 569 (1995).
36. Bukrinskaya A. G., Ghorpade A., Heinzinger N. K., Smithgall T. E., Lewis R. E., Stevenson M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 367 (1996).
37. Jacque J. M., Mann A., Enslin H., Sharova N., Brichacek B., Davis R. J., Stevenson M.: *EMBO J.* **17**, 2607 (1998).
38. Camaur D., Gallay P., Swingler S., Trono D.: *J. Virol.* **71**, 6834 (1997).
39. Facke M., Janetzko A., Shoeman R. L., Krausslich H. G.: *J. Virol.* **67**, 4972 (1993).
40. Gallina A., Mantoan G., Rindi G., Milanesi G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 1031 (1994).
41. Freed E. O., Orenstein J. M., Buckler-White A. J., Martin M. A.: *J. Virol.* **68**, 5311 (1994).
42. Rhee S. S., Hunter E.: *Cell* **63**, 77 (1990).
43. Choi G., Park S., Choi B., Hong S., Lee J., Hunter E., Rhee S. S.: *J. Virol.* **73**, 5431 (1999).
44. Lingappa J. R., Hill R. L., Wong M. L., Hegde R. S.: *J. Cell. Biol.* **136**, 567 (1997).
45. Jacobs E., Gheysen D., Thines D., Francotte M., de Wilde M.: *Gene* **79**, 71 (1989).
46. Boulanger P., Jones I.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**, 237 (1996).
47. Lee Y. M., Yu X. F.: *Virology* **243**, 78 (1998).
48. Freed E. O.: *Virology* **251**, 1 (1998).
49. Gitti R. K., Lee B. M., Walker J., Summers M. F., Yoo S., Sundquist W. I.: *Science* **273**, 231 (1996).
50. Gamble T. R., Vajdos F. F., Yoo S., WorthyLake D. K., Houseweart M., Sundquist W. I., Hill C. P.: *Cell* **87**, 1285 (1996).
51. Momany C., Kovari L. C., Prongay A. J., Keller W., Gitti R. K., Lee B. M., Gorbalenya A. E., Tong L., McClure J., Ehrlich L. S., Summers M. F., Carter C., Rossmann M. G.: *Nat. Struct. Biol.* **3**, 763 (1996).
52. Gamble T. R., Yoo S., Vajdos F. F., von Schwedler U. K., WorthyLake D. K., Wang H., McCutcheon J. P., Sundquist W. I., Hill C. P.: *Science* **278**, 849 (1997).
53. Zhang W. H., Hockley D. J., Nermut M. V., Morikawa Y., Jones I. M.: *J. Gen. Virol.* **77** (Pt 4), 743 (1996).
54. Mammano F., Ohagen A., Hoglund S., Gottlinger H. G.: *J. Virol.* **68**, 4927 (1994).
55. Luban J., Lee C., Goff S. P.: *J. Virol.* **67**, 3630 (1993).
56. Braaten D., Franke E. K., Luban J.: *J. Virol.* **70**, 3551 (1996).
57. Franke E. K., Yuan H. E., Luban J.: *Nature* **372**, 359 (1994).
58. Braaten D., Aberham C., Franke E. K., Yin L., Phares W., Luban J.: *J. Virol.* **70**, 5170 (1996).
59. Reicin A. S., Ohagen A., Yin L., Hoglund S., Goff S. P.: *J. Virol.* **70**, 8645 (1996).
60. von Schwedler U. K., Stemmler T. L., Klishko V. Y., Li S., Albertine K. H., Davis D. R., Sundquist W. I.: *EMBO J.* **17**, 1555 (1998).
61. Gross I., Hohenberg H., Huckhagel C., Krausslich H. G.: *J. Virol.* **72**, 4798 (1998).
62. Rumlova-Klikova M., Hunter E., Nermut M. V., Pichova I., Ruml T.: *J. Virol.* **74**, 8452 (2000).
63. Darlix J. L., Lapadat-Tapolsky M., de Rocquigny H., Roques B. P.: *J. Mol. Biol.* **254**, 523 (1995).
64. Morellet N., Jullian N., de Rocquigny H., Maigret B., Darlix J. L., Roques B. P.: *EMBO J.* **11**, 3059 (1992).
65. South T. L., Summers M. F.: *Protein Sci.* **2**, 3 (1993).
66. Schwartz M. D., Fiore D., Panganiban A. T.: *J. Virol.* **71**, 9295 (1997).
67. Zhang Y., Barklis E.: *J. Virol.* **69**, 5716 (1995).
68. Amarasinghe G. K., Zhou J., Miskimon M., Chancellor K. J., McDonald J. A., Matthews A. G., Miller R. R., Rouse M. D., Summers M. F.: *J. Mol. Biol.* **314**, 961 (2001).
69. De Guzman R. N., Wu Z. R., Stalling C. C., Pappalardo L., Borer P. N., Summers M. F.: *Science* **279**, 384 (1998).
70. Amarasinghe G. K., De Guzman R. N., Turner R. B., Chancellor K. J., Wu Z. R., Summers M. F.: *J. Mol. Biol.* **301**, 491 (2000).
71. Feng Y. X., Copeland T. D., Henderson L. E., Gorelick R. J., Bosche W. J., Levin J. G., Rein A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 7577 (1996).
72. Dorfman T., Luban J., Goff S. P., Haseltine W. A., Gottlinger H. G.: *J. Virol.* **67**, 6159 (1993).
73. Hong S. S., Boulanger P.: *J. Virol.* **67**, 2787 (1993).
74. Jowett J. B., Hockley D. J., Nermut M. V., Jones I. M.: *J. Gen. Virol.* **73** (Pt 12), 3079 (1992).
75. Bennett R. P., Nelle T. D., Wills J. W.: *J. Virol.* **67**, 6487 (1993).
76. Franke E. K., Yuan H. E., Bossolt K. L., Goff S. P., Luban J.: *J. Virol.* **68**, 5300 (1994).
77. Campbell S., Vogt V. M.: *J. Virol.* **69**, 6487 (1995).
78. Zhang Y., Qian H., Love Z., Barklis E.: *J. Virol.* **72**, 1782 (1998).

**P. Strnad, Š. Haubová, and T. Ruml** (*Department of Biochemistry and Microbiology and Center for Integrated Genomics, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Retroviral Genome and Physiological Function of Its Products**

*Retroviridae* comprise viruses with diploid RNA genome, which are replicated by RNA-dependent DNA polymerase, i.e. reverse transcriptase. This enzyme itself is a valuable tool of molecular biology. However, retroviruses are in the forefront of scientific interest mainly due to the serious diseases they cause. In addition, elucidation of some aspects of the cell cycle and cellular oncogens originated from the studies of retroviral oncogenesis. Another attractive area is the design of retroviral vectors for gene therapies. This review attempts to sum up the most recent general knowledge of the function of retroviral genes and their products in the virus life cycle.

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### MIKROFLUIDNÍ ZAŘÍZENÍ PRO PRŮTOKOVOU INJEKČNÍ ANALÝZU S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ

ALEXANDR MUCK JR.<sup>a</sup>, JOSEPH WANG<sup>b</sup>  
a JIŘÍ BAREK<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Oddělení přírodních látek, Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>SensoChip Laboratory, Department of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University, MSC 3C, Las Cruces, NM 88003, USA, <sup>c</sup>UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, 128 43 Praha 2 e-mail: muck@uochb.cas.cz

Došlo 25.10.02, přepracováno 6.3.03, přijato 29.5.03.

Klíčová slova: mikrofluidní čipy, mikroprůtoková injekční analýza, amperometrická detekce, sítotiskové elektrody

### Úvod

Mikroprůtoková analytická zařízení, která by umožnila spojení několika kroků chemické analýzy na miniaturních platformách, jsou již delší dobu předmětem zájmu mnoha světových laboratoří<sup>1–4</sup>. Tato zařízení jsou někdy též nazývána „laboratoř na čipu“ systémy, mikrototální analytické systémy<sup>5</sup> ( $\mu$ TAS) nebo též mikrofluidní čipy. Jsou připravována z křemíku<sup>6</sup>, skla<sup>7</sup> či polymerů<sup>8</sup> pomocí mikrofabrikačních metod<sup>9</sup> běžných dosud spíše v elektrotechnickém průmyslu při výrobě integrovaných obvodů a pro pohyb vzorků využívají především elektroosmotický tok nebo hydrodynamický tok. Mezi největší výhody těchto konceptů patří integrace procesu předúpravy vzorku, jeho účinné separace a následné detekce, minimální nároky na množství použitých reagensů a spotřebu vzorku, vysoká rychlost analýzy, automatizovatelnost analytických procesů, cenová dostupnost, nízké nároky na prostor, atd.<sup>1–4</sup>

Mikrofluidní zařízení jsou spojena především se spektrometrickými způsoby detekce, například s laserem indukovanou fluorescencí<sup>10</sup> či hmotnostní spektrometrií<sup>11</sup>. Tyto detektory jsou však příliš objemné ve srovnání s vlastními čipy, čímž se ztrácí některé výhody spojené s miniaturizací. Proto je další rozvoj nových způsobů detekce velice potřebný. Výhodným řešením pro elektroaktivní látky se jeví detekce elektrochemická, kde lze detekční elektrodu integrovat k mikrofluidnímu zařízení samotnému<sup>12</sup>. Většinou je používána amperometrická detekce při konstantním potenciálu<sup>13,14</sup>. Z metod s proměnným potenciálem byla použita například cyklická voltametrie pro měření v subnanolitrových objemech<sup>15,16</sup>, další možností je použití detekce vodivosti<sup>17</sup>.

Cílem této práce je ukázat možnosti různých operací prů-

tokové injekční analýzy (FIA) integrované na jednoduchou mikrofluidní platformu (autoři navrhnou používat český název mikroprůtoková injekční analýza či  $\mu$ FIA (cit.<sup>18</sup>)).

Zmíněná metoda dosud nebyla, navzdory jejím nesporným výhodám pro automatizaci a miniaturizaci, středem zájmu rychle se rozrůstajícího oboru mikrofluidní chemie<sup>19</sup>. Cílem předkládané práce je proto zhodnocení takového systému. Byly studovány možnosti opakovaného dávkování analytu, účinného transportu nosného média a reagentu v submikrolitrových objemech, byl zkoumán vliv některých experimentálních parametrů (intenzita elektrického pole, doba dávkování, materiál pracovní elektrody) na analytické vlastnosti systému. Pro detekci byla zvolena sítotisková (screen-printed) elektroda z uhlíkového inkoustu, která byla nedávno použita pro amperometrickou detekci v mikrofluidním systému s kapilární zónovou elektroforézou<sup>20</sup> (CZE). Výzkum a využití nových netradičních elektrodoých materiálů je v současné době v popředí zájmu naší laboratoře.

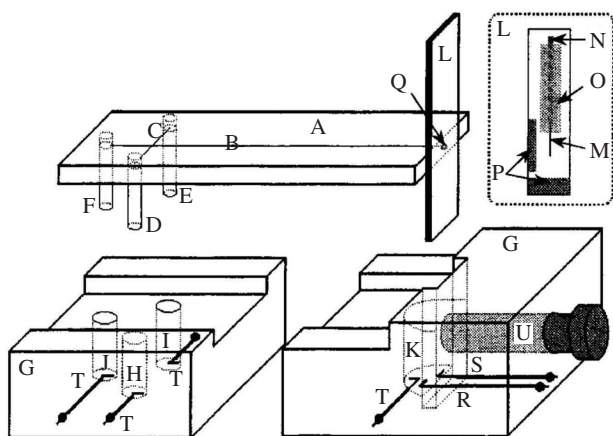
### Experimentální část

#### Chemikálie

Dopamin (3,4-dihydroxyphenethylamin), *p*-kresol (4-methylfenol), 1,2-dihydroxybenzen,  $\beta$ -D(+)-glukosa a glukosoxidasa ( $\beta$ -D-glukosa:kyslík 1-oxidoreduktasa) (234 900 jednotek.g<sup>-1</sup>), byly zakoupeny od Sigma-Aldrich. Nosným elektrolytem byla směs fosfátového a borátového roztoku (oba 0,02 mol.l<sup>-1</sup>, pH 7,9, pro fosfátový pufr byly použity hydrogenufosforečnan sodný a fosforečnan sodný, pro borátový pufr boritan sodný). Zásobní roztoky a pufr byly připravovány denně v deionizované vodě a filtrovány 0,45  $\mu$ m membránovým filtrem (Whatman, USA). Roztoky vzorků byly připravovány ředěním odpovídajících zásobních roztoků pufrů. Pro modifikaci tiskové elektrody byl použit standardní roztok zlata pro atomovou absorpci (1,000  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> Au ve 5 hm.% HCl) zakoupený od Sigma-Aldrich.

#### Použité přístroje

Elektrochemická měření byla provedena na potenciostatu Electrochemical Analyzer 621 (CH Instruments, Austin, USA) spojeném s osobním počítačem s procesorem Pentium III 166 MHz, 32 MB RAM. Uspořádání integrovaného systému čip–detektor bylo popsáno dříve<sup>13,20</sup>. Mikrofluidní skleněný čip byl vyroben firmou Alberta Microelectronic Company (AMC, Model MC-BF4-001, Edmonton, Kanada) vlhkým chemickým leptáním a tepelným lepením. Skládal se z mikrokanálků o průřezu tvaru poloviční elipsy o šířce 50  $\mu$ m a hloubce cca 40  $\mu$ m tvořících čtyřcestný dávkovací kříž spojený s třemi zásobníky pufru a reakčního mikrokanálu délky 72 mm. Pracovní elektroda a mikrofluidní čip byly ukotveny v laboratorně připraveném držáku z poly-methylmethakrylátu (obr. 1). Pro spojení odpovídajících dávkovacích kanálků se zásobníky pufru a roztoku vzorku byly použity zkrácené špič-

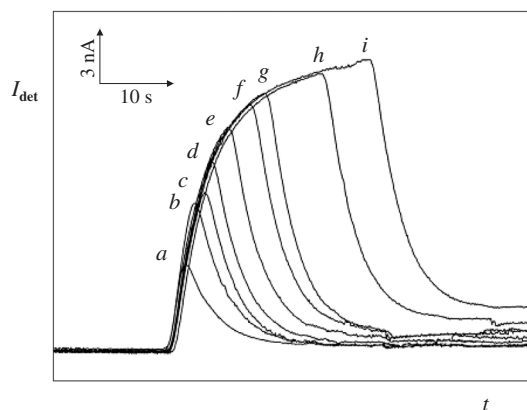


Obr. 1. Integrovaný mikroprůtokový systém s amperometrickou detekcí; A – skleněný mikrofluidní čip, B – reakční kanál, C – dávkovací kanál, D – špička pipety pro spojení se zásobníkem nosného elektrolytu, E – špička pipety pro spojení se zásobníkem vzorku, F – nevyužitý kanál, G – držák systému z plexiskla, H – zásobník nosného elektrolytu, I – zásobník vzorku, J – nevyužitý zásobník, K – detekční (odpadní) zásobník, L, M – tištěná pracovní elektroda, N – kontakt stříbrným inkoustem, O – izolant, P – vymezovací těsnění, Q – vývod kanálu, R – referentní elektroda, S – pomocná elektroda, T – elektrody zdroje vysokého napětí, U – plastový šroub. Pro lepší zobrazení jsou čip, plastový držák a síťotisková elektroda odělené a rozměry nejsou v reálném měřítku (přetištěno se svolením redakce<sup>13</sup>)

ky z plastových pipet naplněné odpovídajícími roztoky. Elektrochemický detektor byl umístěn v odpadním zásobníku, přičemž vývod reakčního mikrokanálku byl použit pro „end-column“ amperometrickou detekci. Stříbrný drátek pokrytý AgCl byl použit jako referentní elektroda, platinový drátek tvořil elektrodu pomocnou a jako pracovní byla použita síťotisková elektroda z uhlíkového inkoustu natištěná na keramické destičce pomocí poloautomatické tiskárny TF 100 (MPM, Franklin, USA)<sup>19</sup>, byl použit inkoust Electrodag 440B kat. č. 49AB90 (Acheson, Colloids, Kanada). Vzdálenost mezi vývodem reakčního mikrokanálku a povrchem pracovní elektrody byla kontrolována plastovým šroubem a teflonovým vymezovacím těsněním tloušťky 50  $\mu\text{m}$ . Do všech zásobníků byly umístěny platinové drátky pro spojení se zdrojem vysokého napětí (HV), vyrobeného v laboroři. Napětí zdroje vysokého napětí bylo možné nastavovat v rozmezí  $0 \pm 4$  kV.

#### Pracovní postup

Pro detekci glukosy a *p*-kresolu byla elektroda modifikována zlatem použitím čtvercových pulzů ( $-0,2$  až  $+0,75$  V proti Ag/AgCl) šířka pulzu 0,6 s po 30 min) v roztoku  $0,3 \cdot 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup> Au(III),  $0,1$  mol.l<sup>-1</sup> NaCl a 1,5% HCl. Zlato bylo vyloučeno redukcí. Jak bylo zjištěno<sup>21</sup>, redukce čtvercovými pulzy poskytuje mechanicky odolnější vrstvu zlata než redukce při konstantním potenciálu či redukce cyklickou voltametrií. Pro detekci dopaminu byla použita nemodifikovaná uhlíková síťotisková elektroda. Pracovní potenciál elektrody pro detekci glukosy a *p*-kresolu byl 0,9 V (vše proti Ag/AgCl), Dopamin byl detegován při +1,2 V. Amperometrický signál byl zaznamenáván s časovou konstantou 0,1 s.



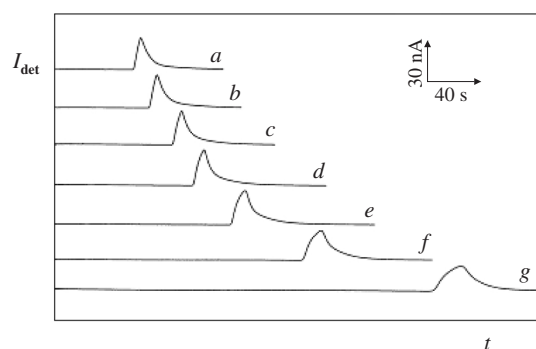
Obr. 2. Vliv dávkovaného objemu na tvar píku  $1.10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> *p*-kresolu; intenzita elektrického pole  $0,42$  kV.cm<sup>-1</sup>, dávkování 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20 s (a–i), v  $0,02$  mol.l<sup>-1</sup> směsi fosfátového a borátového pufru pH 7,9, detekce na zlatem modifikované síťotiskové uhlíkové elektrodě při 0,9 V vs. Ag/AgCl;  $I_{\text{det}}$  – proud,  $t$  – čas

Zásobník pro nosný elektrolyt v plastovém držáku s odpovídajícími spojkami z pipet byl naplněn 250  $\mu\text{l}$  pufru, zásobníky pro roztoky vzorku byly naplněny 200  $\mu\text{l}$ . Čip byl poté umístěn do plastového držáku se špičkami plastových spojek mířícími dolů do zásobníků v těle plastového držáku. Nakonec byl naplněn detekční zásobník a bylo zapojeno vysoké napětí. Roztoky vzorku a nosného elektrolytu byly pumpovány elektrokineticky, detekční zásobník byl uzemněn, ostatní zásobníky byly plovoucí. Vzhledem k vysokému napětí je třeba všechny operace provádět s mimořádnou opatrností. Mikrokanálky byly před použitím propláchnuty deionizovanou vodou. Přívod vysokého napětí do zásobníku nosného elektrolytu a roztoku vzorku byl realizován pomocí Pt elektrod. Napětí bylo přepínáno pomocí jednoduchého přepínače. Takto bylo dávkování vzorku do proudu nosného elektrolytu velice rychlé a tok byl přerušován jen minimálně. Před opakovanými dávkováními vzorku byly naplněny i postranní mikrokanálky čipu připojením napětí 3 kV po dobu 20 s. Elektrokinetické dávkování vzorku bylo prováděno po stabilizaci signálu proudu základní linie připojením napětí 3 kV (intenzita elektrického pole  $0,42$  kV.cm<sup>-1</sup>).

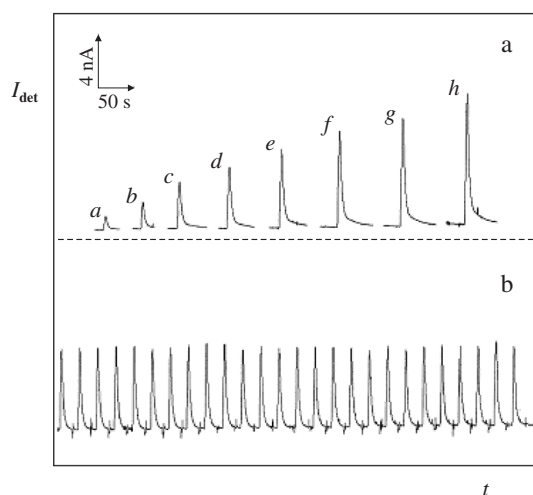
#### Výsledky a diskuse

##### Charakterizace mikrofluidního toku

Pro charakterizaci elektrokinetických vlastností mikrofluidního toku byly vybrány dopamin a *p*-kresol. Při pH 7,9 je potlačena ionizace těchto látek, které pak migrují s elektroosmotickým tokem, což bylo prokázáno minimálním rozdílem migračních časů 38 a 37 s při 3 kV (dávkování 3 s). Lze je detegovat s mikromolární citlivostí bez předchozí derivatizace, výsledek proto nejsou ovlivněny různými parametry účinnosti reakce (čas, teplota, míchání, atd.). Analytický výkon platformy byl vyhodnocen jako počet rozlišených píků ve stanoveném čase při postupném dávkování modelových látek do elektroosmotického toku. Počet úspěšných dávkování byl ovlivněn časem potřebným ke stabilizaci signálu základní



Obr. 3. Vliv intenzity elektrického pole na tvar píků  $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  dopaminu; intenzita elektrického pole 0,56, 0,49, 0,42, 0,35, 0,28, 0,21, 0,14  $\text{kV.cm}^{-1}$  (a–g), dávkování 3 s, v  $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$  směsi fosfátového a borátového pufru pH 7,9, detekce na sítotiskové uhlíkové elektrodě při 1,2 V vs. Ag/AgCl;  $I_{\text{det}}$  – proud,  $t$  – čas



Obr. 4. a: Odezva detektoru na vzrůstající koncentrace dávkovaného dopaminu,  $(1-8).10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  v  $1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  krocích (a–h). b: Opakovatelnost měření: třicet dávkování  $5.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  dopaminu, intenzita elektrického pole  $0,42 \text{ kV.cm}^{-1}$ , směs fosfátového a borátového pufru pH 7,9, dávkování 3 s, detekce na sítotiskové uhlíkové elektrodě při 1,2 V vs. Ag/AgCl

linie po elektrochemické detekci. Během 3 min bylo možno detegovat 7 píků dopaminu s 20 s intervaly mezi dávkováním či 6 píků *p*-kresolu s 25 s intervaly. Dále byl sledován vliv dávkovaného objemu na tvar píků u *p*-kresolu (obr. 2). Optimální gaussovský pík je dosažen při cca 3 s dávkování. Vliv intenzity elektrického pole na výšku a šířku píků byl studován pro  $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  analyty. Jak je patrné z obr. 3, pološířka píků  $w_{1/2}$  se zvětšuje a výška píků se snižuje se snižující se intenzitou elektrického pole. Jako optimální lze doporučit napětí 3 kV (intenzita elektrického pole  $0,42 \text{ kV.cm}^{-1}$ ), při němž bylo zjištěno nejmenší rozmytí píků.

Opakovatelnost a stabilita signálu byla vypočtena jako relativní směrodatná odchylka z 30 dávkování modelových látek o koncentraci  $5.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (2,47 % pro dopamin, 3,06 % pro *p*-kresol)(viz obr. 4).

Tabulka I

Analytické parametry kalibračních měření stanovených látek

Sloučenina	$c$ [ $\text{mol.l}^{-1}$ ]	Směrnice [ $\text{nA.mol}^{-1}.\text{l}$ ]	Úsek [nA]	$R^a$	$L_D^b$ [ $\text{mol.l}^{-1}$ ]
Glukosa	$(5-15).10^{-3}$	$5,56.10^3$	0,31	0,9945	$2,5.10^{-3}$
Dopamin	$(1-8).10^{-5}$	$1,24.10^5$	0,12	0,9976	$5.10^{-6}$
<i>p</i> -Kresol	$(2-12).10^{-5}$	$3,22.10^4$	0,21	0,9899	$1.10^{-5}$

<sup>a</sup> Korelační koeficient, <sup>b</sup> limita detekce

### Stanovení glukosy

Možnost využití chemické reakce pro stanovení glukosy v mikroprůtokové injekční analýze byla studována na reakci glukosy s enzymem glukosooxidase. Byla zvolena aerobní enzymatická oxidace glukosy na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku, kyselina glukonová byla následně amperometricky oxidována na pracovní elektrodě. Použití této reakce bylo již dříve popsáno v literatuře<sup>22</sup>. Enzym o koncentraci 70 jednotek. $\text{ml}^{-1}$  byl připraven v roztoku směsi fosfátového a borátového pufru. Vzorek byl pak dávkován do toku pufru obsahujícího enzym. Jako reakční smyčka byl využit mikrokanál vedoucí k detektoru.

Byla provedena kalibrační měření a určeny limity detekce (tabulka I). Koncentrace byly měřeny třikrát, signál pro všechny studované látky vzrůstal lineárně v celé měřené koncentrační oblasti a limita detekce byla určena jako trojnásobek absolutní hodnoty šumu základní linie ( $S/N = 3$ ).

### Závěr

Bylo zkoumáno využití jednoduchého mikrofluidního zařízení v mikroprůtokové injekční analýze. Vliv intenzity elektrického pole, dávkovaného objemu a koncentrace vzorku, opakovatelnost a dlouhodobá stabilita stanovení byly zkoumány pro dopamin a *p*-kresol. Pro  $\mu\text{FIA}$  stanovení byla využita enzymatická reakce glukosy s glukosooxidase. Jako detekční technika byla zvolena amperometrie za konstantního potenciálu, pro zlepšení citlivosti detektoru byl povrch elektrod modifikován zlatem. Metoda poskytuje velmi dobrou opakovatelnost a spolehlivost. Bylo dosaženo milimolární limity detekce pro glukosu a mikromolárních limit detekce pro dopamin a *p*-kresol.

A. M. děkuje Americké chemické společnosti (ACS) a Fondu rozvoje vysokých škol (FRVŠ G4 2300/2002) a J. B. děkuje Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt 232/2002/B-CH/PrF) za poskytnutou finanční podporu.

### LITERATURA

- Jakeway S., de Mallo A. J., Russell E. L.: Fresenius' J. Anal. Chem. 366, 525 (2000).
- Freemantle M.: Chem. Eng. News 22, 27 (1999).
- Hadd A., Raymond D., Halliwell J., Jacobson S., Ramsey M.: Anal. Chem. 69, 3407 (1997).



4. Reyes D. R., Iossifidis D., Auroux P.-A., Manz A.: *Anal. Chem.* **74**, 2623 (2002).
5. <http://www.lab-on-a-chip.com/home/index.html>; 20. října 2002.
6. Manz A., Graber N., Widmer H. M.: *Sens. Actuators, B* **1990**, 244.
7. Jacobson S. C., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **69**, 3212 (1997).
8. Becker H., Locascio L. E.: *Talanta* **56**, 267 (2002).
9. McCreedy T.: *Trends Anal. Chem.* **19**, 396 (2000).
10. Ramsey R. S., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **69**, 1174 (1997).
11. Woolley A., Lao K., Glazer A., Mathies R. A.: *Anal. Chem.* **70**, 684 (1998).
12. Wang J.: *Talanta* **56**, 223 (2002).
13. Wang J., Tian B. M., Sahlin E.: *Anal. Chem.* **71**, 3901 (1999).
14. Clark R., Hietpas P., Ewing A. G.: *Anal. Chem.* **69**, 259 (1997).
15. Bratten C., Cobbold P., Cooper J. M.: *Anal. Chem.* **69**, 253 (1997).
16. Haswell S. J.: *Analyst* **122**, 1R (1997).
17. Pumera M., Wang J., Opekar F., Jelínek I., Feldman F., Löwe H., Hardt S.: *Anal. Chem.* **74**, 1968 (2002).
18. Greenway G. M., Haswell P. H., Petsul P. H.: *Anal. Chim. Acta* **387**, 1 (1999).
19. Wang J., Tian B. M., Nascimento V., Agnes L.: *Electrochim. Acta* **43**, 3459 (1998).
20. Wang J., Tian B. M., Sahlin E.: *Anal. Chem.* **71**, 5436 (1999).
21. Wang J., Chatrathi M. P., Tian B. M.: nepublikované výsledky.
22. Wang J., Chatrathi M. P., Tian B. M., Polsky M. P.: *Anal. Chem.* **72**, 2514 (2000).

**A. Muck<sup>a</sup>, J. Wang<sup>b</sup>, and J. Barek<sup>c</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Natural Compounds, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>b</sup>*Department of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University, Las Cruces, NM, USA*, <sup>c</sup>*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Charles University, Prague*): **Microfluidic Platform for FIA with Electrochemical Detection**

The performance of a new microfluidic device was tested in a flow-injection analysis arrangement. The influence of the electric field intensity, sample volume and concentration as well as the repeatability were evaluated for dopamine and *p*-cresol. Determination of glucose was carried out after reaction with glucose oxidase using amperometric detection at gold-coated screen-printed carbon ink electrode. The method provided reliable performance and easy operation. Millimolar detection limits for glucose and micromolar detection limits for dopamine and *p*-cresol were achieved.

**Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka,  
ASLAB Středisko pro posuzování způsobilosti laboratoří,  
Praha 6, Podbabská 30**

### **přijme spolupracovníka**

s velmi dobrou znalostí MS Office, zejména datových a textových aplikací.  
**Požadavky:** VŠ (US) vzdělání chemického nebo přírodovědného zaměření,  
spolehlivost, přesnost, vhodné i pro absolventy.  
Nástup ihned nebo podle dohody.

**Informace:** tel. 220 197 272, e-mail koruna@vuv.cz



**PROJEKT MEZINÁRODNÍ BANKY  
SPEKTROSKOPICKÝCH DAT EUROSPEC\***

**LIDMILA VOLKOVÁ a KAREL VOLKA**

*Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 1905, 166 28 Praha 6  
e-mail: Karel.Volka@vscht.cz*

Došlo 2.4.03, přepracováno 20.4.03, přijato 6.5.03.

Klíčová slova:

Ke dni 26. března 2003 bylo v Chemical Abstracts registrováno 21 211 680 organických a anorganických látek, přičemž ke dni 21. září 2001 to bylo „jen“ 18 683 580 organických a anorganických látek (aktuální počet registrovaných chemických látek lze snadno zjistit na webové stránce Chemical Abstracts Service, <http://www.cas.org/cgi-bin/regreport.pl>). Během půldruhého roku tedy počet registrovaných chemických látek vzrostl o více než 2,5 milionu.

Porovnáme-li tyto počty s existujícími databázemi spekter, zjistíme několikařádkový rozdíl mezi počtem známých sloučenin a počtem uložených spekter. Je přitom známo, že právě molekulová spektra (především spektra NMR, IČ, Ramanova a hmotnostní) jsou jedním ze základních zdrojů informací o nových látkách. Spektra jsou ve většině publikací zredukována na jednovětá konstatování, po případě na jednoduchou tabulku. Původní spektra v lepším případě uchovává autor, dříve či později jsou i tato spektra často zapomenuta či ztracena. Tabulka I shrnuje odhad počtu spekter, která byla zmíněna jen v prvních šesti číslech 67. ročníku časopisu Collection of Czechoslovak Chemical Communications.

V uplynulých letech jsme byli svědky řady pokusů vybudovat mezinárodní banku spektroskopických dat. Idea budování takové mezinárodní databáze není nová a byla úspěšně ověřena na bance krystalografických dat proteinů, do které

**Tabulka I**

Přibližný počet citovaných spekter v článkách časopisu Collection of Czechoslovak Chemical Communication 67 (2002) (spektra: IČ – infračervená, UV – ultrafialová, ESR – elektronové spinové resonance, NMR – nukleární magnetické resonance, MS – hmotnostní)

Číslo	IČ	ESR		<sup>13</sup> C-NMR		Jiná	MS
		UV	RAMAN	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR		
1	70	0	0	0	138	134	25
2	16	16	0	0	23	37	0
3	45	14	0	0	32	75	35
4	3	2	0	0	3	3	0
5	101	12	0	0	158	166	14
6	1	0	10	2	41	56	83
<i>Celkem</i>	<i>236</i>	<i>44</i>	<i>10</i>	<i>2</i>	<i>395</i>	<i>471</i>	<i>157</i>

\* Volně zpracováno podle článku A. N. Daviese: An update on the International Spectroscopic Data Bank Project. *Spectroscopy Europe* 13 (5), 24–26 (2001).

jsou data ukládána téměř z každé recenzované proteinové krystalografické publikace. Tato banka dat je zpřístupněna krystalografické obci a je klíčovým zdrojem pro aktivity na tomto poli (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

V roce 1996 byl na konferenci „Spojení a interpretace spekter prostřednictvím molekulových struktur“ (Linking and Interpreting Spectra through Molecular Structures), konané ve Warwicku (Velká Británie), podán návrh na založení obdobného zdroje spektroskopických dat. Hnací silou tohoto návrhu byl stále se zvětšující rozdíl mezi počtem známých sloučenin a počtem spekter uložených ve spektrálních databázích. V roce 1996 bylo evidováno 14 milionů chemických látek.

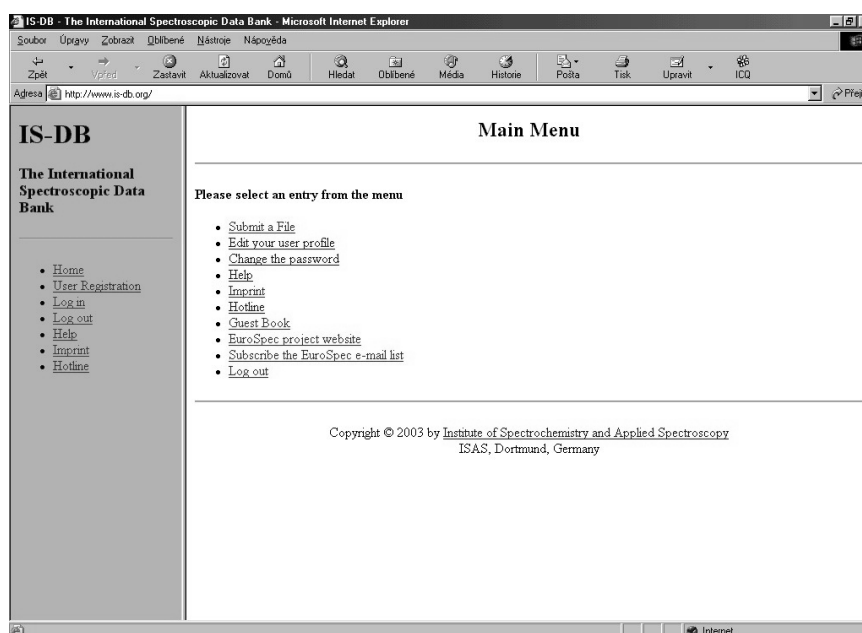
Po řadě diskusí na různých konferencích v letech 1996 až 1998 jak v Evropě, tak i v USA byly v roce 1999 a 2000 předloženy dva návrhy vyjádření zájmu o 5. rámcový program založení spektroskopické databanky. Duší celého projektu se stal Dr. Antony N. Davies, University of Glamorgan (Wales) a Creon Lab Control A.G., Frechen (SRN) (dříve Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie, Dortmund (SRN)). Oba návrhy byly pozitivně posouzeny, prvním však bylo vytknuto, že se nezabýval strukturou projektu po skončení jeho financování EU. V druhém kole byl projekt s názvem „Access to Research Spectroscopic Data and Associated Chemical Knowledge“ (Přístup k výzkumným spektroskopickým datům a doprovodným chemickým znalostem) (EUROSPEC) vysoce oceněn a schválen k financování jako tématická síť v rámci programu Konkurenceschopný a trvale udržitelný růst. Řešiteli projektu jsou Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie, Dortmund (SRN), Creon Lab Control A.G., Frechen (SRN), Institute National Agronomique Paris-Grignon, Paris (Francie), Universidade de Aveiro, Aveiro (Portugalsko), Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, LGC Ltd., Runcorn (Velká Británie), IM Publications, Chichester (Velká Británie) a Specs and Biospecs B.V., Rijswijk ZH (Nizozemsko). Prosazení tohoto projektu je velkým úspěchem nejen pro zúčastněné konsorcium, ale pro spektroskopii jako celek, neboť potvrzuje její nepostradatelnou úlohu ve sféře priorit EU.

Jedním z klíčových momentů přípravy celého projektu byla všeobecná podpora a příslib účasti řady vědeckých i komerčních vydavatelů časopisů i vědeckých společností. I přes silný atak ze strany komerčních organizací, zabývajících se tvorbou a prodejem spektrálních databází, projekt získal silnou podporu celé řady velkých i malých vydavatelství, a to České chemické společnosti, EDP Sciences, Elsevier Science, IM Publications, International Society for Ion Mobility Spectrometry, Spektroskopické společnosti Jana Marka Marci (Ioannes Marcus Marci Spectroscopic Society), John Wiley & Sons, Royal Society of Chemistry, Society for Applied Spectroscopy a Springer-Verlag Heidelberg. Projekt počítá s připojením dalších vydavatelů časopisů, včetně časopisů východní Evropy (tab. II).

Vlastní tříletý projekt byl zahájen 1. ledna 2002 a v prvním roce měl dva klíčové úkoly: připravit infrastrukturu projektu a přesná pravidla ukládání a manipulace s daty. Vydavatelé časopisů by měli vyzvat svoje autory k zaslání dat do této mezinárodní databáze a archivu (International Spectroscopic Databank and Archive, IS-DB) již v roce 2003.

Tabulka II  
Seznam participujících časopisů

Název časopisu	Název časopisu	Název časopisu
Actualité Chimique	Green Chemistry	Lab on a Chip
Analisis Magazine	International Journal for Ion Mobility Spectrometry	Magnetic Resonance in Chemistry
Analyst	International Journal of Mass Spectrometry	New Journal of Chemistry
Analytical and Bioanalytical Chemistry	Journal of Analytical Atomic Spectrometry	NIR News
Analytica Chimica Acta	Journal of Environmental Monitoring	PhysChemComm
Applied Spectroscopy	Journal of Mass Spectrometry	Physical Chemistry Chemical Physics
Bulletin České chemické společnosti	Journal of Materials Chemistry	Rapid Communications in Mass Spectrometry
Bulletin of the Ioannes Marcus Spectroscopic Society	Journal of Molecular Structure	Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy
Chemical Communications	Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions	Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy
Chemické listy	Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1	Spectroscopy Europe
Collection of Czechoslovak Chemical Communications	Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2	Surface and Interface Analysis
CrystEngComm	Journal of Near Infrared Spectroscopy	Talanta
European Journal of Mass Spectrometry	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Vibrational Spectroscopy
Faraday Discussions	Journal of Raman Spectroscopy	X-Ray Spectrometry
Geochemical Transactions		



Obr. 1. Vstupní webová stránka Mezinárodní spektroskopické databáze

Snahou řešitelů projektu je, aby vstup dat do databáze byl co nejjednodušší. Bude realizován pomocí webové stránky, která by časem měla být dostupná i v různých jazyko-

vých mutacích, včetně češtiny (obr. 1). Preferováno bude uložení originálních dat s dostatečnými informacemi pro identifikaci měřicího systému ve standardním formátu pro výměnu

The screenshot shows a web browser window titled "IS-DB - The International Spectroscopic Data Bank - Microsoft Internet Explorer". The address bar shows "http://www.is-db.org/". The page content is divided into a left sidebar and a main form area.

**IS-DB**  
The International Spectroscopic Data Bank

- Home
- User Registration
- Log in
- Log out
- Help
- Imprint
- Hotline

**Submit a File**

Please enter information about the data file

File name and path:  Procházet...

Data type:

Data format:

Data description:   
E.g. figure number and caption of the data set within the publication

Instrument:   
Name and model of the spectrometer or chromatograph

Measurement technique:   
E.g. ionization mode (EI+, CI+, ...), observed nucleus (1H, 13C, ...), observation method (transmission, ATR, ...)

Data processing:   
Background correction, smoothing, subtraction, zero-fill, ...

Sample state:   
Solid, liquid, gas, solution, powder, ...

Sample pressure in kPa:

Sample temperature in K:

Comment:

Obr. 2. Jedna ze stránek pro zaslání spektra do Mezinárodní spektroskopické databáze

dat, jako je JCAM-DX pro spektra, MOLFILES pro struktury atp.

Uložená data budou v první fázi přístupná pouze vydavatelům a po zajištění licence recenzentům určitého článku. Přístup k úplným spektrálním datům by měl recenzentům usnadnit jejich práci a odhalit chyby v interpretaci spekter. Po přijetí článku k uveřejnění budou spektroskopická data a doprovodné chemické informace (název, chemická struktura, reaktivita, zdraví a bezpečnost atp.) zpřístupněny vhodnými odkazy v elektronické verzi článku nebo adresou webového prohlížeče v tištěné verzi. Spektroskopická data (obr. 2) spolu s doprovodnými chemickými informacemi budou v databázi uložena jako jednotlivé soubory, projekt však nepočítá s použitím prostředků na vyhledávání spekter. Tento úkol bude přenechán organizacím, které jsou na jeho plnění lépe připraveny a bude řešen spolu se zajištěním provozu databáze po skončení projektu, kdy její správu převezme organizace neziskového charakteru.

Neméně důležitým krokem je příprava nových instrukcí autorům pro zaslání spektroskopických a doprovodných dat elektronickou poštou spolu s vlastní publikací.

Pro řešení vzniklých problémů projekt počítá s dvěma poradními orgány.

Jeden poradní orgán tvoří vydavatelé a jeho úkolem je garantovat, že projekt bude odpovídat současným trendům a technickému vývoji zvláště v oblasti elektronických publikací. To je podstatné, má-li se projekt vyhnout rozhodnutím, jejichž výsledkem by byla investice do oblastí, které budou v krátké době nedůležité.

Druhým poradním orgánem je konzultační komise koncových uživatelů, jejíž primární povinností bude radit v otázkách přijatelnosti technologických řešení. V informační technologii se u takto velkých projektů vždy objevuje nebezpečí, že jejich účastníci chtějí využívat nejnovější či nejelegantnější řešení,

koncoví uživatelé však často nejsou schopni nejnovější trendy ve vývoji hardware či software sledovat.

Bezprostřední pomoc při ukládání dat budou poskytovat školení pracovníci na telefonních linkách, z nichž jedna bude na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze.

Autoři dat musí rychle vidět úspěch ze své práce v tom, že uložená data jsou pro ně také využitelná. To je klíčový úkol řešitelů projektu. Projekt podpořili jak akademičtí, tak průmysloví spektroskopici. Pro úspěch projektu a vytvoření kvalitní databáze je třeba, aby projekt podpořila široká obec spektroskopiků. To bude představovat pro každého jednotlivce či pracovní tým určitou práci navíc, ale toto úsilí by mělo být mnohonásobně vyváжено prospěchem, které vytvoření databáze přinese v následujících letech. Věříme, že i s Vaší podporou se tento záměr podaří.

#### Dodatek

Během přípravy rukopisu k tisku byl projekt mezinárodní banky spektroskopických dat oživen. Systém pro vstup dat a server archivu IS-DB byly zpřístupněny autorům vědeckých publikací dne 19. května 2003 na Achemě. EuroSpec již žije! Chcete-li zaslat spektra do této databáze, zaregistrujte se na webové stránce <http://www.is-db.org>.

**L. Volková and K. Volka** (*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **International Spectroscopic Data Bank Project EUROSPEC**

A short introduction to the International Spectroscopic Data Bank (IS-DB) is given. This database was established in May 2003. It is up to spectroscopists around the world to feed the system with good reference spectroscopic data. Register and deposit data at <http://www.is-db.org>.

## STUDIUM INTERAKCÍ HYDROXYLOVÝCH RADIKÁLŮ A PURINOVÝCH BÁZÍ DNA

RENATA FADRNÁ

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8  
e-mail: fadrna@jh-inst.cas.cz

Došlo 5.9.02, přepracováno 21.1.03, přijato 20.3.03.

Klíčová slova: stříbrné amalgámové elektrody, HMDE, voltametrie, báze, DNA

### Úvod

Studium deoxyribonukleové kyseliny (DNA), jejího složení, struktury a případně poškození je v současnosti velmi aktuální téma a voltametrické metody nezůstávají v této oblasti stranou. V devadesátých letech minulého století se mohutně vyvíjela především optická a elektrochemická čidla monitorující různé interakce DNA (zahrnující hybridizaci, interakce DNA s léky a poškození DNA). Přestože vývoj elektrochemických metod a čidel byl například za optickými metodami poněkud zpožděn, je v posledních letech v této problematice i v oblasti elektrochemických senzorů dosahováno poměrně výrazných úspěchů. Mezi hlavní výhody elektrochemických přístrojů patří především jejich nízká cena, vysoká citlivost a jednoduché uspořádání. Především polarografie a voltametrie se ukazují jako velmi citlivé nástroje k monitorování integrity a reakcí DNA. Základní práce v tomto směru pocházejí již z počátku 60. let (cit.<sup>1</sup>). Diferenční pulzní polarografie (s rtuťovou kapkovou elektrodou) byla užita k detekci přerušení řetězce DNA (cit.<sup>2</sup>). Další pokrok pak přinesly rozpouštěcí (stripping) metody. V poslední době byly testovány i adsorpční přenosové techniky, založené na imobilizaci DNA na povrchu elektrody, následném promytí a přenosu elektrody se zachycenou DNA do čistého základního elektrolytu, kde není analýza rušena organickými látkami přítomnými v měřeném roztoku a zároveň je možno analyzovat extrémně malé objemy analytů (až jednotky mikrolitrů).

Adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) využívá adsorpčně/desorpčních procesů uplatňujících se na povrchu elektrody<sup>3</sup>. Adsorpce či desorpce povrchové aktivních látek (PAL) na polarizované elektrodě při určitém potenciálu je doprovázena změnou struktury elektrodové dvojvrstvy projevující se měřitelným proudovým signálem, a to i v případě, že PAL není elektroaktivní, tj. že nedochází k její redukci či oxidaci. Tento signál je funkcí povrchové koncentrace  $\Gamma$  PAL (přesněji relativního povrchového přebytku), resp. její objemové koncentrace  $c$  v roztoku.

Z elektrodové kinetiky je známo<sup>4</sup>, že PAL mohou znatelně ovlivnit též redukční či oxidační proces na elektrodě. Působí zpravidla změnu mechanismu elektrodové reakce, zastoupení jednotlivých reakčních meziproductů atd. To může být využito i při studiu elektrodových procesů a jejich praktickém využití.

Příkladem z minulosti bylo využití přísadků PAL k potlačování polarografických maxim prvního i druhého druhu nebo ke snížení limitního difuzně řízeného proudu. Jiné možnosti skýtá ovlivňování voltametrické redukce látky (např. peroxidu vodíku či iontů zinku) na povrchu elektrody. Tato metoda byla dříve užívána především při studiu vlivu PAL na druhý stupeň redukce vzdušného kyslíku, tj. redukci peroxidu vodíku. Ukázalo se, že tento princip lze využít i k odhadu či stanovení obsahu PAL (cit.<sup>5-9</sup>) v roztoku.

DNA vykazuje vlastnosti PAL stejně jako její báze adenin, guanin, thymin a cytosin. K jejich voltametrickému stanovení sloužily např. visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)<sup>10</sup>, stříbrná amalgámová<sup>11</sup> a měděná amalgámová elektroda<sup>12</sup>. Tyto metody však nejsou jednoduché a selektivita není zcela optimální. To vede k hledání jiných možností kvalitativního a kvantitativního sledování nukleových bází. Jednou z cest může být sledování jejich interakcí s hydroxylovými radikály při redukci peroxidu vodíku jak na rtuťových kapkových tak na amalgámových elektrodách.

Studiu vzájemných interakcí DNA a hydroxylových radikálů je v poslední době věnována poměrně značná pozornost<sup>13</sup>. Zaměřena byla dosud na radikály, generované buď v roztoku (např. hydroxylové radikály vzniklé Fentonovou reakcí<sup>14</sup>) nebo v těsné blízkosti molekuly DNA, jestliže existuje specifická interakce (např. Cu/1,10-fenanthrolinový systém<sup>15</sup>) nebo za užití komplexu železo/EDTA (cit.<sup>16</sup>). Bylo zjištěno, že tyto hydroxylové radikály štěpí řetězec DNA, což je možno voltametricky detegovat. Předpokládá se, že radikály reagují s bázemi DNA a deoxyribosovými zbytky<sup>13</sup>. Pojednání o jejich vlivu na samotné báze se však dosud v odborné literatuře nevyskytuje.

### Experimentální část

#### Přístroje

Pro měření byl využit počítačem řízený Eco-Tribo Polarograf PC ETP s příslušenstvím (Polaro-Sensors, Praha)<sup>17</sup> se softwarem Polar Pro v. 4.0. pro Windows 95/98/Me. Jako referentní byla užita 1 M argentochloridová elektroda oddělená od roztoku solným můstkem, naplněným 1 M-KNO<sub>3</sub>, k níž jsou vztaženy všechny v této práci udávané hodnoty potenciálů, a jako pomocná sloužila elektroda platinová (obě Elektrochemické detektory, Turnov). Měrnou elektrodou byla buď rtuťová kapková elektroda (HMDE) nebo stříbrná menisková amalgámová elektroda (m-AgSAE), zhotovená amalgamováním stříbrného prášku a pokrytím vzniklého povrchu AgSAE meniskem rtuťí vytvořeným krátkým ponořením ústí AgSAE do rtuť<sup>18,19</sup> (obě elektrody byly produkty firmy Polaro-Sensors, Praha). Pomocí speciální procedury zahrnuté do programu Polar Pro byla z jednotlivých kroků sestavena metoda, zahrnující sled všech operačních stupňů (akumulaci, měření, automatické opakování měření, obnovení kapky atd.), takže celé měření probíhalo automatizovaně.

Vlastní měření probíhalo v režimu katodické diferenční pulzní voltametrie (DPV) při výšce pulzu 50 mV a jeho šířce 100 ms stejně jako doba mezi dvěma následujícími pulzy, se vzorkováním během posledních 20 ms před začátkem, resp. koncem pulzu. Potenciál akumulace činil ve všech případech -600 mV vs. Ag/AgCl, doba akumulace 60 s a po ní následo-



vala klidová doba 15 s. Počáteční potenciál byl shodný s potenciálem akumulace. V případě m-AgSAE bylo před zahájením měření provedeno 50 regeneračních cyklů mezi +300 a -1300 mV. Rychlost polarizace byla u obou elektrod 20 mV.s<sup>-1</sup>. Měření probíhala při pokojové teplotě 20±2 °C.

### Chemikálie

Pro přípravu základních roztoků byla použita redestilovaná voda, všechny chemikálie byly čistoty p.a. (Lachema, Brno). Jako srovnávací povrchové aktivní standard byl použit zásobní vodný roztok neionogenního surfaktantu Triton-X-100 o koncentraci 17,6 mg.l<sup>-1</sup>. Báze adenin a guanin byly čistoty p. a. (Sigma-Aldrich). Roztoky adeninu a guaninu byly připraveny ředěním zásobních roztoků o koncentraci 1.10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup> v redestilované vodě. Jako základní elektrolyt sloužil 0,1 M-KCl, resp. 0,1 M-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### Používané regresní vztahy

Pro regresi potenciálových či proudových závislostí na koncentraci PAL bylo možno použít v užších intervalech koncentrací přímkové závislosti typu

$$I_p = a_1 + b_1c; \quad E_p = a_2 + b_2c \quad (1)$$

kde  $I_p$  je výška píku, resp.  $E_p$  jeho potenciál,  $c$  je koncentrace PAL a  $a_1$ ,  $b_1$ ,  $a_2$ ,  $b_2$  jsou parametry příslušných lineárních závislostí. V některých případech však bylo v souladu s literaturou<sup>3,20,21</sup> vhodnější užívat relativní hodnoty pro vyjádření změn výšky píků nebo jejich polohy:

$$X = \frac{E_p - E_{p,0}}{E_{p,1} - E_{p,0}} \quad (2)$$

$$Y = \frac{I_p - I_{p,0}}{I_{p,1} - I_{p,0}} \quad (3)$$

kde  $I_p$  a  $E_p$  značí proud, resp. potenciál píku; index 0 – proud či potenciál bez přítomnosti PAL, index 1 – proud či potenciál při úplném pokrytí elektrody PAL. Použití výrazů (2) a (3) je například vhodné v případech<sup>3,21</sup>, kdy je závislost veličin  $X$ ,  $Y$  na koncentraci hyperbolická, sigmoidní nebo tvarově podobná. To přirozeně nevylučuje použití i možnosti lineární aproximace vhodných úseků křivek vztahy (1), obecně při rozdílných hodnotách koeficientů  $a_1$ ,  $b_1$ ,  $a_2$ ,  $b_2$ . Aproximaci kalibračních závislostí polynomy druhého a vyšších stupňů lze aplikovat tam, kde jde o prosté proložení dat polynomem bez fyzikálního významu.

Pro nalezení takových závislostí je lépe aplikovat některou z izoterem (Langmuirova, Freundlichova, resp. izoterma dle Novotného<sup>3,8</sup>). Všechny izotermy je možno užívat buď v absolutních ( $I_p$ ,  $E_p$ ,  $c$ ) nebo v relativních souřadnicích  $X$ ,  $Y$ . Izoterma dle Novotného má pak např. tvar

$$\frac{Y}{1-Y} \exp\left(\sum_{i=1}^4 A_i Y^i\right) = bc \quad (4)$$

resp.

$$\frac{X}{1-X} \exp\left(\sum_{i=1}^4 A_i X^i\right) = b'c \quad (5)$$

Vyčíslování regresních parametrů lze realizovat buď v programu MS Excel 9 nebo v programu ETP pro DOS v. 3.1 (Polaro-Sensors, Praha).

### Výsledky a diskuse

V literatuře byl popsán vliv běžných kationaktivních, anionaktivních a především neionogenních PAL (cit.<sup>22,23</sup>) na redukcí peroxidu vodíku, případně zinečnatých iontů. Při velmi nízkých koncentracích PAL docházelo často nejprve k nepatrnému zmenšení redukčního píku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avšak s rostoucí koncentrací PAL výška píku monotónně rostla a špěla postupně k určité limitní velikosti. Obdobně tomu bylo s potenciálovým posuvem. Bylo tedy zřejmé, že v oblasti nejnižších koncentrací, kdy probíhá na povrchu elektrody řada vzájemně si konkurujících dějů<sup>3</sup> (substituční adsorpce, změny struktury elektrochemické dvojvrstvy, atd.), má popis pomocí závislostí typu (4) a (5) aproximativní charakter. Dominantní adsorpce PAL při dalším zvyšování koncentrace však užití rovnic (4) a (5) opravňuje. Případný posuv píku nejprve k pozitivním a posléze k negativním hodnotám souvisí patrně s vlivy přítomných iontů základního elektrolytu a dalších složek roztoku, s jejichž přítomností, koncentrací a větší či menší aktivitou na povrchu elektrody je třeba obecně počítat. Vhodnou volbou neaktivního základního elektrolytu je možno strukturu elektrochemické dvojvrstvy stabilizovat a zmíněné vlivy minimalizovat nebo eliminovat. Ukázalo se, že směr potenciálové změny a její velikost stejně jako proudové změny jsou závislé na typu (anionaktivní, kationaktivní, neionogenní) a množství přítomných PAL (cit.<sup>22</sup>).

### Reakční elektrodové schéma elektroredukce O<sub>2</sub> v přítomnosti PAL

Sumárně lze proces redukce kyslíku popsat rovnicemi (6) a (7)<sup>24</sup>:



Druhý stupeň (7) lze pak rozdělit na dvě následné reakce:



Je přitom známo, že redukční stupeň dle rovnice (7) je ireverzibilní a kinetika redukce O<sub>2</sub> je složitější, než jak naznačují rovnice (8) a (9).

V literatuře<sup>5-8</sup> popsaný způsob detekce a stanovení obsahu PAL vychází z poznatku, že vlivem jejich interakcí na povrchu rtuťové kapkové elektrody dochází k výraznému posuvu voltametričeského píku, příslušejícího druhému stupni redukce rozpuš-



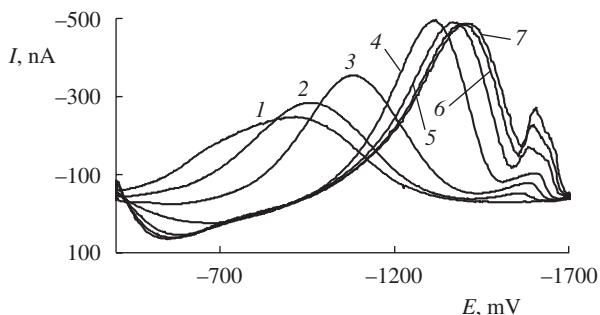
těného molekulárního kyslíku, přesněji redukci peroxidu vodíku, na vodu v potenciálové oblasti  $-0,9$  V (a negativnější) vs. Ag/AgCl. Současně s tím dochází i ke změně výšky tohoto píku<sup>7,8,22</sup>.

Veškeré v literatuře popsané efekty však byly realizovány na rtuťových elektrodách. Reakce probíhá naprosto analogicky jak za přítomnosti peroxidu vzniklého redukcí vzdušného kyslíku, tak peroxidu vodíku úmyslně přidaného.

#### Kvalitativní popis vlivu PAL na voltametrické křivky redukce peroxidu vodíku na HMDE a na m-AgSAE

Jako modelová látka, jejíž vliv na redukci peroxidu vodíku již byl v literatuře<sup>5</sup> popsán, byl použit Triton X-100. S jeho vzrůstající koncentrací v základním elektrolytu 0,1 M-KCl roste na HMDE výška redukčního píku peroxidu vodíku a zároveň se jeho vrchol posouvá směrem k negativnímu potenciálu, jak je patrné z obr. 1.

Ve stejném základním elektrolytu měly přídavky roztoků adeninu i guaninu při použití HMDE podobný vliv, pod  $0,2$  mg.l<sup>-1</sup> docházelo však nejprve k malému posuvu píku směrem k pozitivním potenciálům, následovaným pro  $c > 0,2$  mg.l<sup>-1</sup> posuvem k negativním potenciálům. Nárůst velikosti proudu či posuvy potenciálů vrcholů píků směrem k negativnějším potenciálům nebyly však tak výrazné jako v přítomnosti neionogenního Tritonu X-100, jak je vidět z obr. 2 pro adenin (vliv guaninu je obdobný).



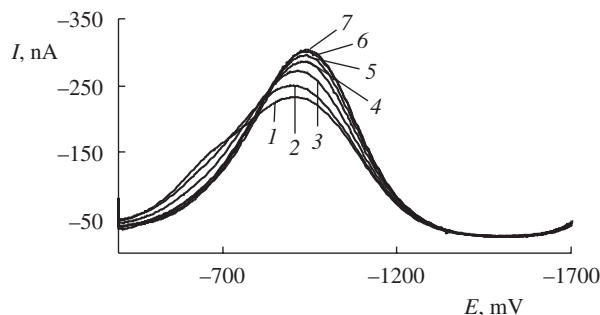
Obr. 1. Vliv Tritonu X-100 na DP voltamogram redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na HMDE; koncentrace Tritonu X-100 v mg.l<sup>-1</sup>: 1 – 0; 2 – 0,2; 3 – 0,4; 4 – 0,6; 5 – 0,8; 6 – 1,0; 7 – 1,2

Odlišné chování vykazovala v tomto směru menisková stříbrná amalgámová elektroda. Zatímco Triton X-100 ovlivňoval zde výšku i polohu píku (při poněkud nižší citlivosti) stejným způsobem, jako tomu bylo na HMDE (obr. 3), vliv adeninu a guaninu se naprosto odlišoval ode všech dosud zkoumaných PAL. Výška píku se zvyšovala se vzrůstající koncentrací zmíněných bází, stejně jako ostrost píku, avšak posuv vrcholu píků směřoval do pozitivní oblasti potenciálů v celém použitém koncentračním rozsahu od 0 do 1,2 mg.l<sup>-1</sup>, jak je patrné z obr. 4 pro adenin (vliv guaninu je obdobný). Citlivost tohoto posuvu vůči koncentraci byla přítom podstatně větší než při užití HMDE.

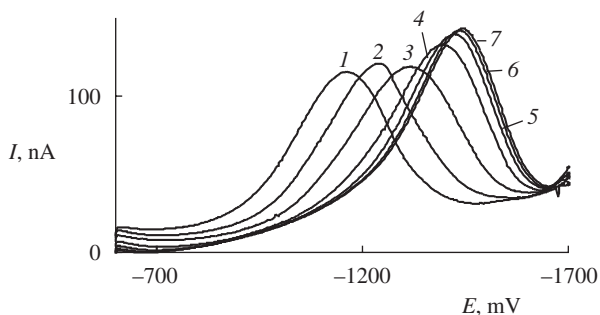
Pokud základní elektrolyt neobsahoval chloridy (0,1 M-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), posouval se vrchol redukčního píku peroxidu vodíku za přítomnosti bází stejným způsobem jak na HMDE, tak na m-AgSAE. Z toho je možné usuzovat, že příčinou změny směru posuvu píku na m-AgSAE byly právě chloridové ionty, které se specificky adsorbují na povrchu elektrody nebo mohou tvořit nerozpustný AgCl, čímž dochází k modifikaci povrchu elektrody.

Mez detekce<sup>28</sup> (vypočtená z kalibrační křivky relativní změny výšky píku peroxidu vodíku v závislosti na koncentraci PAL) jak u Tritonu, tak u bází v 0,1 M-KCl se pohybuje kolem 0,05 mg.l<sup>-1</sup>.

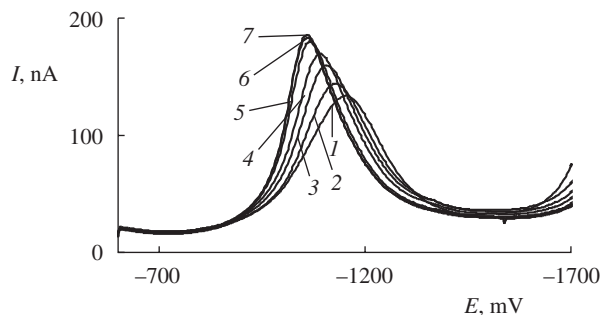
Registrované proudové hodnoty redukce peroxidu vodíku byly ve srovnání s odpovídajícími redukčními proudy adeninu několikanásobně větší, což způsobilo překrytí píku adeninu píkem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Obr. 2. Vliv adeninu na DP voltamogram redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na HMDE; koncentrace adeninu v mg.l<sup>-1</sup>: 1 – 0; 2 – 0,2; 3 – 0,4; 4 – 0,6; 5 – 0,8; 6 – 1,0; 7 – 1,2



Obr. 3. Vliv Tritonu X-100 na DP voltamogram redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na m-AgSAE; koncentrace Tritonu X-100 v mg.l<sup>-1</sup>: 1 – 0; 2 – 0,2; 3 – 0,4; 4 – 0,6; 5 – 0,8; 6 – 1,0; 7 – 1,2

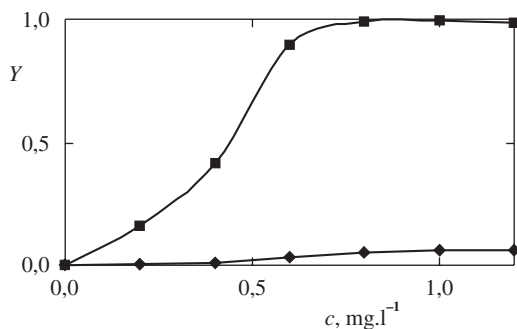


Obr. 4. Vliv adeninu na DP voltamogram redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na m-AgSAE; koncentrace adeninu v mg.l<sup>-1</sup>: 1 – 0; 2 – 0,2; 3 – 0,4; 4 – 0,6; 5 – 0,8; 6 – 1,0; 7 – 1,2

### Kalibrační závislosti relativních posuvů výšek a potenciálů píků

Z výše uvedeného vyplývá, že směr posuvu potenciálu může být jedním z faktorů odlišení bází DNA od jiných PAL. Dalším zkoumaným aspektem bylo možné rozlišení zmíněných bází velikostí a tvarem změřených koncentračních závislostí, obdobně jako v cit.<sup>3</sup>

Pokud byly mezi sebou porovnávány absolutní hodnoty výšek proudů a potenciálů vrcholů píků, vznikal problém s výškou základního píku peroxidu vodíku, který musel být stejný pro všechny vzorky. Vzhledem k tomu, že množství redukovaného peroxidu vodíku bylo určováno koncentrací rozpuštěného vzdušného kyslíku, byla právě ta určující. Na ni měla pak vliv teplota, atmosférický tlak apod. Jelikož reprodukovatelnost těchto podmínek nebyla zaručena, jevílo se jako vhodnější používat relativní souřadnice vypočtené podle rovnic (2) a (3), takže prvý bod obou kalibračních křivek ležel při stejné proudové či potenciálové hodnotě  $I_{p,0}$  resp.  $E_{p,0}$ . Jelikož  $I_{p,1}$  resp.  $E_{p,1}$  pro první křivku nebyl v absolutních hodnotách shodný s  $I_{p,1}$  resp.  $E_{p,1}$  druhé křivky, došlo by po přepočtu do relativních souřadnic v rozmezí 0–1 a následném srovnání v grafické podobě k nepřijatelným deformacím křivek. Proto byly vzaty relativní souřadnice zvolené křivky za vztahnou soustavu a body druhé křivky byly přepočteny do relativních souřadnic křivky první. Pokud byly absolutní hodnoty  $I_{p,1}$  resp.  $E_{p,1}$  vztahné soustavy menší než  $I_{p,1}$  resp.  $E_{p,1}$  druhé křivky, mohlo být dosaženo relativních hodnot  $Y$  resp.  $X$  větších než 1.

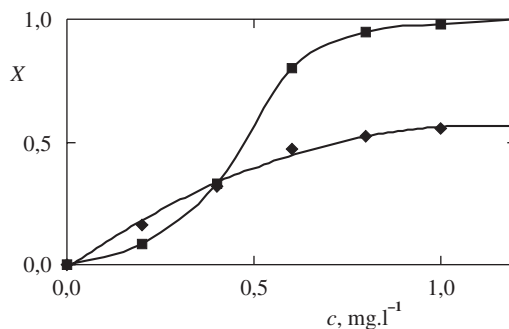


Obr. 5. Vliv Tritonu X-100 na relativní výšku DPV redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na HMDE ■ a na m-AgSAE ◆

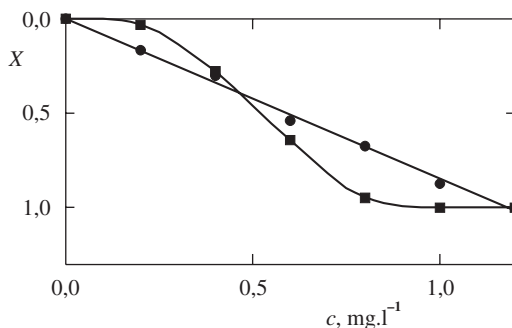
Ačkoli obě elektrody, HMDE i m-AgSAE, měly stejnou aktivní plochu, registrované relativní změny výšek proudů  $Y$  redukčního píku za přítomnosti Tritonu X-100 se podstatně liší (relativní změna na rtuťové elektrodě je až 20× větší) (viz obr. 5). Ve srovnání s tím dosahuje relativní potenciálový posuv  $X$  na HMDE maximálně dvakrát větší hodnoty než hodnoty  $X$  na m-AgSAE (obr. 6). Zatímco izoterma  $Y$  vs.  $c$  vykazovala na obou elektrodách prakticky identický tvar (lišící se pouze velikostí), tvar izoterem potenciálového posuvu byl výrazně odlišný: průběh izotermy měřené na amalgamové elektrodě byl parabolický, zatímco průběh izotermy na rtuťové elektrodě byl sigmoidní.

Lze konstatovat, že rozdíly v relativních posuvech  $Y$  na HMDE v závislosti na koncentraci adeninu a guaninu vykazují parabolický průběh a liší se jen nepatrně. Naproti tomu relativní potenciálové rozdíly  $X$  v závislosti na koncentraci těchto látek vykazují vzájemné rozdíly: zatímco izoterma guaninu se v koncentračním rozsahu 0–1,2 mg.l<sup>-1</sup> dá velmi dobře aproximovat přímkou (korelační koeficient  $r = 0,9982$ ), izoterma adeninu vykazuje klesající sigmoidní tvar (výška redukčního píku  $H_2O_2$  se se vzrůstající koncentrací adeninu snižuje, a proto hodnoty  $X$  nabývají záporných hodnot) (obr. 7).

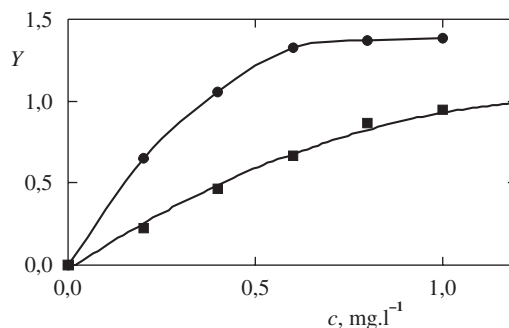
Naopak na amalgamové elektrodě není velký rozdíl mezi relativními potenciálovými posuvy  $X$  v závislosti na koncentraci adeninu a guaninu. Jako výraznější na m-AgSAE se však jeví rozdíly mezi izotermami relativních proudových posuvů  $Y$  (obr. 8).



Obr. 6. Vliv Tritonu X-100 na relativní polohu DPV redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na HMDE ■ a na m-AgSAE ◆



Obr. 7. Závislost relativního potenciálového posuvu DPV redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na koncentraci guaninu ● a adeninu ■ na HMDE



Obr. 8. Závislost relativního proudového nárůstu DPV redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na koncentraci guaninu ● a adeninu ■ na m-AgSAE

Tabulka I  
Regresní parametry izotermy dle rovnic (4) a (5)

Parametr	HMDE				m-AgSAE			
	adenin		guanin		adenin		guanin	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
$b, \text{l.mg}^{-1}$	0,16	0,43	0,32	0,72	0,31	0,32	0,39	0,38
$A_1$	-7,53	-6,97	-1,39	-5,96	-14,26	-10,10	-9,04	-10,65
$A_2$	7,96	10,85	-	11,97	113,03	76,98	18,85	30,12
$A_3$	-4,96	-7,60	-	-9,21	-378,21	-272,30	-	-20,72
$A_4$	-	-	-	-	434,95	332,60	-	-
MEP <sup>a</sup>	0,19	0,06	0,05	0,02	0,06	0,05	0,11	0,14

$$^a \text{MEP} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_{\text{změřeno}} - Y_{\text{vypočteno}})^2 \text{ dle cit.}^{28}$$

### V ýklad pozorovaných dějů

V práci<sup>23</sup> byly odvozeny vztahy pro případ ovlivnění redukčního píku peroxidu vodíku purinovými bázemi adeninem a guaninem. Bylo zde předpokládáno, že PAL pokrývající povrch elektrody mají vliv jak na rychlostní konstantu probíhajícího faradaického děje, tak na Gibbsovu energii, tj. na polohu vrcholu faradaického píku. Práce<sup>7,8,22,23</sup> diskutují několik možností vysvětlení daného efektu (maxima druhého druhu, posuv vrcholů píků v důsledku změny koncentrace základního elektrolytu, zvyšování ireverzibility, homogenizace povrchu elektrody, regenerace redukované formy, atd.). Tyto práce vyvracejí i předpoklad, že by sledovaný pík mohl být považován za pouhý faradaický pík zvýšený o desorpční pík PAL (samotné desorpční píky se vyskytují v jiné oblasti potenciálů a jejich výška není probíhající redukcí dotčena). Jejich autoři nakonec dospívají k závěru, že uvedené jevy vznikají v důsledku slabých interakčních sil (např. díky vodíkovým můstkům, uplatňujícím se jak u zkoumané PAL, tak u peroxidu vodíku). Vazba může mít při tom inter- či intramolekulární charakter. Působením těchto slabých interakčních sil dochází k nahromadění většího množství peroxidu vodíku v okolí elektrody, než jaké by odpovídalo transportu bez přítomnosti PAL. Právě slabé interakční síly také brzdí nebo akcelerují průběh reakce, takže k jejímu nastartování dochází při negativnějším nebo naopak pozitivnějším potenciálu (viz posuv potenciálu píku), zato však s větším množstvím peroxidu (viz růst píku).

Při složitějších elektrochemických mechanismech se zřejmě můžou v přítomnosti PAL urychlovat některé reakční stupně, takže výsledný efekt se projeví jako akcelerace elektrodového děje. V důsledku toho se zvyšuje  $\Delta I_p$  s koncentrací PAL, případně při jiných potenciálech (posunutých o  $\Delta E_p$ ), než je tomu bez přítomnosti PAL. Celkově bychom mohli hovořit o tom, že děj probíhá s jinou výslednou efektivní rychlostní konstantou, vyšší než bez přítomnosti PAL (tj. mění se rychlostní konstanty dílčích reakcí, což se projeví ve výsledku jako změna efektivní rychlostní konstanty souhrnné reakce, tj. redukce  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Lze tedy říci, že některé z dílčích reakcí probíhají za daných podmínek rychleji, ale současně se zpomalují zpětné reakce.

Pokud se vrcholy píku redukce peroxidu posunují k pozitivním hodnotám, ačkoliv výška píku stoupá, lze to vysvětlit např. kompeticí mezi různými slabými interakčními silami a nábojem elektrody.

Pro báze na meniskové stříbrné amalgámové elektrodě za přítomnosti chloridů je charakteristický posun k pozitivnějším potenciálovým hodnotám. Na obou testovaných elektrodách (HMDE i m-AgSAE) probíhá reakce na rtuťovém povrchu, a tudíž by měly být všechny interakce prakticky shodné (resp. probíhat stejným způsobem). Není však zřejmé, jakou roli hraje vliv stříbrných iontů v amalgamové elektrodě. K interakčním silám pravděpodobně přistupuje vliv specificky se sorbujících chloridových iontů ve vnitřní Helmholtzově rovině, které také ovlivňují popisované interakční síly a efekty. Pro objasnění dějů by bylo vhodné porovnat výše popisované výsledky s vlivem bází či PAL na redukci kyslíku na kovových stříbrných nebo kompozitních stříbrných elektrodách<sup>25–27</sup> za a bez přítomnosti chloridových iontů; v literatuře nebyly příslušné informace nalezeny a budou proto předmětem dalšího výzkumu.

Pro vytvoření regresního modelu byla užita izoterma podle Novotného dle rovnic (4) a (5) a byly získány parametry pro adenin a guanin na HMDE a m-AgSAE, shrnuté v tabulce I.

Ukázalo se, že hodnota parametru  $b$  (souvisejícího s adsorptivitou resp. adsorpčním koeficientem daných látek) se pohybovala v řádu desetin  $\text{l.mg}^{-1}$  (0,16–0,72  $\text{l.mg}^{-1}$ ), což odpovídá kategorii středně silně až silně adsorptivních látek. Přitom bylo nalezeno, že se parametr  $b$  případ od případu lišil jen relativně málo; jeho hodnoty na m-AgSAE byly vzájemně téměř shodné (viz tab. I). Naopak jednotlivé parametry  $A_i$ , související zřejmě s uplatněním povrchových a mezičásticových interakcí, se u obou sledovaných látek i elektrod vzájemně výrazně lišily. Záporná polarita parametru  $A_1$  ve všech zmíněných případech souhlasí s představou o podobném charakteru interakcí jak mezi molekulami adeninu, tak i guaninu. V souladu s klasickými představami lze tedy tuto interakci interpretovat jako mezimolekulární přitažlivost. Koeficienty  $A_2$  a další, příslušející v rovnicích (4) a (5) členům vyššího řádu, již tuto jednotnou polaritu podle předpokladu nevykazovaly.

**Závěr**

Pro rozlišení mezi běžnými PAL a nukleovými bázemi je možno použít jejich vliv na redukci peroxidu vodíku, resp. jejich rozdílného potenciálového posuvu vrcholu redukčního píku na amalgámové elektrodě. Byla zjištěna možnost vzájemného rozlišení některých bází (adeninu a guaninu) na základě různých tvarů izoterem relativních posuvů, a to proudového na amalgamové a potenciálového na HMDE.

K výhodám užití této metody patří i fakt, že měřené proudy se pohybují řádově v desítkách až stovkách nA, což je asi o jeden řád více, než odpovídající výšky voltametrických fardaických píků uvedených bází.

Velmi podstatným se jeví vliv chloridových iontů, které svými specifickými interakcemi s bázemi, povrchem elektrody, resp. s peroxidem vodíku umožňují rozlišení mezi běžnými PAL a uvedenými bázemi a zvyšují selektivitu analýzy.

*Autoři děkují za finanční podporu grantu č. 101/02/U111/CZ.*

**LITERATURA**

- Paleček E.: *Nature* 188, 656 (1960).
- Paleček E.: *Biochim. Biophys. Acta* 145, 410 (1967).
- Novotný L. v knize: *Electrochemistry for Environmental Protection* (Kalvoda R., Štulík K., ed.). UNESCO-ROSTE Publishing House, Venezia 1995.
- Galus Z.: *Fundamentals of Electrochemical Analysis*. Polish Scientific Publisher, Warszawa 1994.
- Navrátil T., Novotný L., Battisti A.: *Chem. Listy* 90, 121 (1996).
- Novotný L., Navrátil T.: *Vodni Hospodarstvi* 12, 390 (1997).
- Novotný L., Navrátil T.: *Electroanalysis* 10, 8 (1998).
- Navrátil T., Novotný L.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 366, 249 (2000).
- Navrátil T., Novotný L., Bečičková D.: *Univerzitní noviny, List Masarykovy Univerzity a Nadace Universitas Masarykiana* 6, 21 (1999).
- Paleček E., Jelen F., Hung M.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8, 621 (1981).
- Yosypchuk B., Heyrovský M., Paleček E., Novotný L.: *Electroanalysis* 14, 1488 (2002).
- Jelen F., Yosypchuk B., Kouřilová A., Novotný L., Paleček E.: *Anal. Chem.* 74, 4788 (2002).
- Fojta M., Kubičárová T., Paleček E.: *Biosens. Bioelectron.* 15, 107 (2000).
- Price M. A., Tullis T. D.: *Methods Enzymol.* 212, 194 (1992).
- Feig A. L., Therdarahnm T., Sigman D. S.: *Biophys. Res. Commun.* 155, 338 (1988).
- Dabrowiak J., Kissinger K., Goodisman J.: *Electrophoresis* 10, 404 (1989).
- Polaro-Sensors: Manuál k počítačovému Eco-Tribo Polarografu PC-ETP*, Praha 2001. <http://www.polarsen.cz;> 20.8.2002.
- Novotný L., Yosypchuk B.: *Chem. Listy* 94, 1118 (2000).
- Yosypchuk B., Novotný L.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 141 (2002).
- Novotný L.: *Habilitační práce*. Univerzita Pardubice, ÚFCH – J. Heyrovského AV ČR, Praha 1995.
- Kopanica M., Novotný L.: *Anal. Chim. Acta* 368, 211 (1998).
- Navrátil T.: *Doktorská dizertační práce*. Univerzita Karlova, Praha 1996.
- Bečičková D.: *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1997.
- Heyrovský M., Vavříčka S.: *J. Electronal. Chem.* 353, 335 (1993).
- Navrátil T., Kopanica M.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 153 (2002).
- Navrátil T., Kopanica M.: *Chem. Listy* 96, 111 (2002).
- Šebková S., Navrátil T., Kopanica M.: *Anal. Lett.* 36, (2003), v tisku.
- Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Edice Plus, Praha 1994.

**R. Fadrná** (*J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Study of the Interactions Between Hydroxyl Radicals and Purine DNA Bases**

The effect of nucleic acid bases (adenine, guanine) on the second reduction step of oxygen (electroreduction of hydrogen peroxide) on the hanging mercury drop electrode (HMDE) or the meniscus-modified silver amalgam electrode (m-AgSAE) was studied. In the presence of chloride anions the corresponding voltammetric peak increases with increasing concentration of the bases while the peak potential is shifted to more positive potentials.

---

**RECENZE**


---

H. Y. Aboul-Enein, I. Ali:

**Chiral Separations by Liquid Chromatography. Theory and Applications, Chromatographic Science series.**

**Volume: 90**

Stran 400, cena 165,00 USD, ISBN 0-8247-4014-9, pevná vazba.

Příručka, kterou napsali Hassan Y. Aboul-Enein z King Faisal Specialist Hospital and Research Centre, Riyadh, Saudská Arabie a Imran Ali z National Institute of Hydrology, Roorkee, India, a American Biographical Institute, Raleigh, North Carolina, U.S.A., je velmi dobrý systematický a podrobný popis různých typů chirálních stacionárních fází, jejich přípravy, použití a možných budoucích aplikací. Použití těchto fází se soustřeďuje na širokou sféru kapalinové chromatografie (včetně pod- a nad-kritické kapalinové chromatografie), kapilární elektrochromatografie a chromatografie na tenké vrstvě. V jedenácti kapitolách popisuje knížka fenomén chiralit a dále se věnuje různým fázím, založených na polysacharidech, cykloextrinech, makrocyclických glykopeptidových antibiotikách, proteinech, ligandové výměně, crown etherech a Pirkleho fázi. Jedna kapitola je věnována specialitám, které se „nevešly“ do předchozích typů a poslední enantiomerickým separacím pomocí chirálních aditiv v mobilní fázi. Každá kapitola je zakončena extensivním seznamem literatury, zahrnujícím i rok 2002. Kvalitní rejstřík zakončuje dílo.

Je velmi užitečné, že autoři opatřili každou kapitolu stručným shrnutím, ve kterém uvádějí závěry pro použitelnost dané fáze v praxi.

Smutné naopak je, že autoři díla o chirálních separacích nevěnovali dostatečnou pozornost kreslení vzorců chirálních látek. Vzhledem k charakteru obrázků je zřejmé, že byly přebírány „hlava–nehlava“ z jiných zdrojů. Často se o chiralitě dozví čtenář jen z textu.

Závěrem lze shrnout, že se jedná o velmi dobrou, užitečnou a pečlivě napsanou knížku, jakých v praxi není mnoho. Všem, kteří se zajímají o chiralitu a separační metody ji lze vřele doporučit.

*Pavel Drašar*

D. W. Oxtoby, W. A. Freeman, T. F. Block:  
**Chemistry: Science of Change (Saunders Golden Sunburst Series)**

Vydaná Brooks Cole jako 3. vydání.

Stran 1152, cena 124,95 USD, ISBN 0030200881, pevná vazba.

Kniha, která si klade za cíl na 1000 stranách přiblížit čtenáři chemii od atomové struktury přes organickou syntézu k živé hmotě, je velmi obtížný autorský projekt. Navíc si autoři vytkli za cíl být struční. Některé pasáže jsou konfušní a jiné tak stručné, že ztrácejí na smyslu. Logická struktura knihy postrádá jakoukoliv nit a je velmi obtížné použít takovou knihu ke skutečnému učení. Nicméně, pro čtenáře, který není naprostým začátečníkem a který má i jiné knihy k použití, může tato kniha svým simplicizmem přinést nové pohledy na věc. Také je nutno konstatovat, že rigoroznost této příručky není vždy na vyčtené úrovni. Hluboká úroveň výkladu se mísí

s povrchnostmi. Učebnice je navíc poněkud mimo soudobou filozofii chemie tím, že např. u biologicky aktivních a přírodních látek pomíjí aspekt konfigurace a stereochemie obecně.

Všechny uvedené výhrady jsou asi důvodem k tomu, že kniha vyšla nyní i ve 4. vydání: Chemistry – Science of Change, 4th Edition, napsal ji David W. Oxtoby z University of Chicago již sám, ISBN 0030331889, 1128 stran.

*Pavel Drašar*

M. K. Campbell, S. O. Farrell:

**Biochemistry (with Lecture Notebook)**

Vydaná Brooks/Cole Pub v roce 2003, jako 4. vydání.

Stran 864, cena 118,00 USD, ISBN 0-534-39181-8, původně jako Biochemistry, ISBN 0-03-034849-8 ve spirálové a později pevné vazbě.

Učebnice určená pro jednosemestrální kurs biochemie na nižší úrovni VŠ pro nebiochemiky (biologie, zemědělství, technologie, ošetřovatele, geology či odborníky na stravování). Předpokladem zvládnutí kursu je úvodní kurs biologie, obecná chemie a nejméně jeden semestr organické chemie. Nicméně i na této úrovni je kniha napsána s použitím soudobých vědeckých výsledků. Důležité je i to, že kniha se zabývá souvztažnostmi biochemické teorie s praxí denního života i z historie a není tak suchopárná a zvládnutí čtenáře tak podněcuje ke čtení.

Ke knize jsou dostupné doplňkové tituly Experiments in Biochemistry: A Hands-On Approach ISBN/ISSN 0-03-021284-7, Interactive Biochemistry CD-ROM and Workbook ISBN/ISSN 0-03-029258-1 a Student Study Guide and Problems Book for Campbell/Farrell's Biochemistry, 4th ISBN/ISSN 0-03-034917-6.

Spoluautor, přizvaný k napsání 4. vydání knihy, Shawn Farrell, je molekulární biolog. Přispívá v knize novými pohledy a doplněním o mikrobiologii.

Toto vydání přináší mnoho praktických cvičení (50 i více v kapitole) ke každé kapitole a bibliografii užitečných odkazů. Na adrese <http://www.brookscole.com/> jsou pomůcky jak pro učitele, tak pro studenty, zkušební test, doplňkové materiály ke každé kapitole a powerpointová prezentace pro přednášejícího v editovatelné(!) podobě, které vytvořil William H. Brown z Beloit College. Ke každé nově zakoupené knize je přibalen sešit s vytištěnými prezentacemi učitele s místem na poznámky.

Tři mezikapitoly přinášejí diskusi koncepce a teorie za technikami používanými v laboratoři, podobně jako tři „interview“ přinášejí rozhovory s Lilou Gierasch, University of Massachusetts, Seanem Decatur, Mount Holyoke College, a Sylvií Daunert z University of Kentucky. Na závěr knihy je uveden seznam řešení ke cvičením glosář termínů a rejstřík.

Jde typicky o knihu, ze které je radost se učit. Přehrně obrázků, praktické konotace, barevný tisk, zvládnutá chemická typografie a co navíc, maximální pochopení pro stereochemii a výše zmíněné pomůcky z ní činí velmi dobrý zdroj informací nejen pro studenty biochemie.

*Pavel Drašar*



---

**DISKUSE**

---

**Je rozdíl mezi učitelem všeobecně vzdělávacího předmětu chemie a učitelem odborných chemických předmětů?**

Tyto poznámky bych rád doplnil ke svému článku „Učitelství chemie v kontextu akreditace učitelství studijních programů na pedagogických fakultách“ (Chem. Listy 96, 716 (2002)) jako odpověď na reakci předsedy pracovní skupiny Akreditační komise pro chemické obory prof. O. Pytely (Chem. Listy 96, 1015 (2002)).

Předně bych rád poděkoval prof. Pytelovi za otevření diskuse k problematice studijních programů učitelství chemie a za prezentaci jeho postojů. Jednoznačně souhlasím s tím, že „kvalitní vzdělávání budoucích učitelů chemie je nezbytnou podmínkou kvalitní výuky chemie na základních a středních školách, potažmo i žádoucího povědomí o chemii v laické veřejnosti“. S prof. Pytelou se však rozcházejím v názoru, že příprava kvalitních učitelů chemie pro všeobecně-vzdělávací předmět chemie na základních a středních školách a učitelů odborných chemických předmětů na středních odborných školách a učilištích má naplňovat stejné cíle. Domnívám se, že v první z alternativ je základním cílem učitelovy činnosti žák a hlavním úkolem je přispívat k rozvoji žákovy osobnosti. Tato příprava je prioritou, která vyžaduje soubor odpovídajících prostředků. Za jeden z těchto prostředků lze považovat učivo chemie jako všeobecně vzdělávacího předmětu. Pro tuto alternativu jsou u nás v České republice připravováni učitelé všeobecně vzdělávacích předmětů ve studijních programech Učitelství pro základní školy (zde obor: Učitelství pro 2. stupeň základních škol – chemie) a Učitelství pro střední školy (zde obor: Učitelství pro střední školy – chemie). V druhé alternativě je právě učivo chemie (zpravidla její některé subdisciplíny) převedeno z kategorie prostředků do kategorie cílů. Pro zajištění takto pojaté výuky jsou připravováni učitelé tzv. odborných (specializačních) chemických předmětů. Jejich vzdělávání je v České republice zabezpečováno doplňujícím pedagogickým studiem navazujícím nebo souběžně prováděným s příslušným magisterským (většinou inženýrským) chemickým studijním programem. V této souvislosti nelze souhlasit s výrokem prof. Pytely „nakolik je výuka na základních a středních školách všeobecná a nakolik odborná, je snad věcí osnov“, ale je zřejmé, že je to věcí učebních plánů příslušných škol, v nichž se jednotlivé předměty se svými osnovami vyskytují a vyučovat by je měli učitelé s odpovídající kvalifikací. Souhlasím s tím, že učitel má být odborník, ale především odborník ve své profesi – v učitelství chemie. Co se týče všeobecného vzdělávání, je to v první řadě učitel, jehož profesionální stránku zajišťuje soubor předmětů z didaktiky chemie, postavený jednak na solidních znalostech (vědomostech, dovednostech a postojích) z chemie (zabezpečovaný výukou bloku základních chemických disciplín a výběrovou formou dalších chemických předmětů) a na solidních znalostech (vědomostech, dovednostech a postojích) z pedagogiky a psychologie (zabezpečovaný výukou příslušných disciplín v rámci společného základu dvoupředmětového učitelství studia). Co se týče výuky odborných chemických předmětů,

je to v první řadě chemik se svou specializací, který si doplnil požadované pedagogické vzdělání např. formou doplňujícího studia (pedagogické, psychologické a oborově-didaktické předměty). Tolik z mé strany k doplnění diskuse o rozdílech všeobecného a odborného (specializačního) chemického vzdělávání a jeho průmětu do učitelství vzdělávání.

Prof. Pytela připomíná, že jsem asi neuvědoměle spojil výsledky akreditací s vyšší finanční dotace na jednotlivé studijní programy. Toto spojení jsem provedl záměrně a domnívám se, že od něho nelze abstrahovat. Dle Zákona o vysokých školách jsou Akreditační komisí posuzovány studijní programy a v případě učitelství chemie jako všeobecně-vzdělávacího předmětu jak na ZŠ tak na SŠ se jedná o studijní programy řazené dle číselníku oborů mezi pedagogické studijní programy (s odpovídajícím koeficientem pro násobení normativu na studenta – zde 1,2), kdežto chemické studijní programy mají přisouzeno jinou náročnost (koeficient převážně 2,8). Lze tedy abstrahovat od absolutní výše dotace, ale domnívám se, že nelze abstrahovat od deklarovaného charakteru studijního programu, který se odráží ve výšce jeho tzv. koeficientu náročnosti.

Další poznámky prof. Pytely, na něž musím reagovat, se týkají didaktiky chemie jako oboru výzkumné činnosti a potažmo vysokoškolské výuky. Prof. Pytela uvádí názor, že „na oborové didaktiky se v praxi pohlíží jako na pomocný, spíše technický (ve smyslu využívání poznatků a dovedností), než vědecký (ve smyslu objevování něčeho zásadně nového) obor“. Ve výzkumné zprávě o stavu didaktiky chemie u nás a v dalších zemích Evropy (zvláště Německa) a USA, jsme analyzovali více než 350 témat v posledních třech desetiletích obhájených dizertačních prací z didaktiky chemie<sup>1</sup>. První doktoráty v didaktice přírodních věd byly v USA uděleny již v roce 1930 (Teachers College, Columbia University, N. Y.) a např. v rozmezí let 1970–1980 bylo v USA přijato na 2100 prací z přírodovědných oborových didaktik<sup>2</sup>. V Německu působil v roce 1994 67 profesorů didaktiky chemie a v jejich vědecko-výzkumné činnosti připadalo 70 % na výzkum v didaktice chemie<sup>3</sup>. V průzkumu názorů na didaktiku chemie, který jsme provedli v akademickém roce 2000–2001 u cca 65 % všech tzv. vzdělavatelů učitelů chemie v učitelství studijních programech (zkoumaný vzorek zahrnoval odborné chemiky (42 %), odborníky, dělící své odborné zájmy mezi chemii a didaktiku chemie (42 %), didaktiky chemie (10 %) a ostatní (8 %)), uvedlo 79 % respondentů vědecko-výzkumnou činnost v didaktice chemie za potřebnou, 13 % za zbytečnou a 7 % uvedlo jinou charakteristiku<sup>4</sup>. Domnívám se, že tyto výsledky nelze nijak zpochybňovat a degradovat didaktiku chemie na pomocný či dokonce technický obor, bez možnosti řešit vědecko-výzkumné úkoly. Z důvodu menší informovanosti naší odborné veřejnosti o didaktice chemie jsme se problematikou charakteristiky disciplíny, jejích problémových oblastí a vědeckého výzkumu v oboru věnovali v řadě publikací, ve sbornících mezinárodních konferencí a nyní v monografii *Didaktika chemie – výzkum a vysokoškolská výuka*, která vyšla v letošním roce v nakladatelství M&V Hradec Králové<sup>4</sup>.

V původním článku o akreditaci jsem připomínal, že AS

(ať prostřednictvím pracovní skupiny pro chemické obory či pracovní skupiny pro pedagogické obory) neposuzovala na jednotlivých pedagogických fakultách úroveň didaktiky chemie. Prof. Pytela píše „za sebe ji (didaktiku chemie – pozn. autora) hodnotím dobře, a nebylo nutné vydávat nějaké doporučení ze strany AS“. To je pro mne velké překvapení, neboť v současné době existuje obrovský rozdíl v zabezpečení didaktiky chemie ve studijních programech učitelství chemie na jednotlivých pracovištích pedagogických (či jiných pro pedagogickou fakultu uvedený program garantujících) fakult. Např. v hodinové dotaci pro chemicko-didaktický blok, jak uvádí ve své dizertační práci B. Voříšková<sup>4</sup>, je rozdíl v počtu hodin přednášek, seminářů a cvičení u učitelství chemie pro ZŠ na jednotlivých fakultách v rozmezí od pouhých 6 až do 29 „týdnohodin“ za celé studium v povinné výuce (průměrně 17 hodin) a u učitelství chemie pro SŠ od 10 do 23 „týdnohodin“ za celé studium v povinné výuce (průměrně také 17 hodin). V garanci výuky chemicko-didaktických předmětů jsou také propastné rozdíly: od několika habilitovaných pracovníků až po poloviční úvazek učitele základní školy bez vědecké hodnosti na jednom pracovišti. Byla tedy chemicko-didaktická část posuzována s tak výrazným stupněm volnosti?

V oblasti výukové praxe se můžeme setkat s názorem prof. Pytely, že „dobře učící neodborník může napáchat větší škody, než špatně učící odborník“. S tím zásadně nemohu souhlasit, neboť i špatně vyučující odborník (myšleno asi odborník v některém chemickém oboru) může napáchat výrazné škody, zvláště v oblasti všeobecného vzdělávání či v oblasti motivace pro další studium chemie i přírodních věd jako celku. Názor prof. Pytely pravděpodobně vychází ze zkušeností s účastníky Chemické olympiády nebo Středoškolské odborné činnosti, kteří řadu svých znalostí (vědomostí, dovedností a postojů) získali samostudiem a z dalších na učitele více či méně závislých zdrojů. Jaké procento z celkového počtu žáků základních

škol a studentů středních škol však olympionici a účastníci Středoškolské odborné činnosti tvoří?

Ani já nevím, podobně jako se přiznává prof. Pytela, nakolik se mi podařilo odpovědět na otázku v názvu tohoto příspěvku. V žádném případě jsem však ve svém původním článku ani v těchto řádcích nezpochybňoval odbornou způsobilost členů Pracovní komise pro chemické obory Akreditační komise, jak na str. 1016 prof. Pytela uvedl. Pokusil jsem se pouze o analýzu průběhu a výsledků akreditace studijních programů učitelství v oborech učitelství chemie jako všeobecně vzdělávacích předmětů na ZŠ a SŠ, které se tolik lišily od akreditace ostatních oborů učitelství přírodovědných předmětů. I mně jde v první řadě o kvalitní vzdělávání učitelů a ne o partikulární zájmy.

#### LITERATURA

1. Bílek M. a spol.: *Zpráva o řešení projektu IG PdF 22/2000*. PdF UHK, Hradec Králové 2001.
2. Brockmeyerová-Fenclová J.: *Didaktika fyziky po čtyřiceti letech*. Sborník k jubileu Jitky Brockmeyerové-Fenclové. str. 33. ZČU, Plzeň 1997.
3. Nentwig P.: *Fachwissenschaft und Lebenswelt: Chemie-didaktische Forschung und Unterricht* (Gräber W., Bolte C., ed.), str. 237. IPN, Kiel 1996.
4. Bílek M.: *Didaktika chemie – výzkum a vysokoškolská výuka*. M&V, Hradec Králové 2003.
5. Voříšková B.: *Dizertační práce*. PdF UK, Praha 2002.

Martin Bílek

Autor je vedoucím oddělení didaktiky chemie katedry chemie Pedagogické fakulty Univerzity Hradec Králové a členem České komise pro výchovu a vzdělávání UNESCO.

# 56. sjezd chemických společností

**Ostrava**  
**6.–10. září 2004**

## *Pořádající organizace*

Asociace českých chemických společností  
Asociácia slovenských chemických a farmaceutických spoločností  
ve spolupráci s  
VŠB-Technickou univerzitou a Ostravskou univerzitou

## *Sekce sjezdu*

Chemie uhlí, produktů jejich zpracování a chemie uhlíkatých materiálů  
Analytická chemie a chemometrie  
Anorganická chemie  
Organická, bioorganická a farmaceutická chemie  
Fytochemie  
Potravinářská chemie  
Chemie životního prostředí, rizikové látky v chemii a jejich likvidace  
Fyzikální chemie a chemická fyzika  
Makromolekulární chemie a technologie polymerů  
Chemické vzdělávání, chemická informatika a historie chemie  
Petrochemie  
Jaderná chemie  
Chemie a struktura materiálů  
Průmyslová chemie

## *Organizační výbor*

<i>Předseda:</i>	Doc. Ing. Petr Pánek, CSc., rektor OU, petr.panek@osu.cz
<i>Místopředseda:</i>	Doc. Ing. Bořivoj Fiala, CSc., MARBO A.P.S., vrbovskysfp@quick.cz
<i>Hospodář:</i>	Ing. Vladimíra Plačková, FMMI VŠB-TU, vladimira.plackova@vsb.cz
<i>Vědecký tajemník:</i>	Doc. RNDr. Ervín Kozubek, CSc., FMMI VŠB-TU, ervin.kozubek@vsb.cz
<i>Organizační tajemník:</i>	RNDr. Václav Slovák, Ph. D., FMMI VŠB-TU, vaclav.slovak@vsb.cz, vaclav.slovak@osu.cz
<i>Kontaktní adresa:</i>	vaclav.Slovak@vsb.cz

---

**OBSAH**

<b>ÚVODNÍK</b>	919
<b>REFERÁTY</b>	
<b>Steroidy na začátku jedenadvacátého století</b> A. Kasal	921
<b>Aglomerace částic a defluidizační jevy ve fluidní vrstvě</b> M. Hartman, O. Trnka, K. Svoboda a V. Veselý	942
<b>Genom retrovirů a fyziologická funkce jeho produktů</b> P. Strnad, Š. Haubová a T. Ruml	949
<b>LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY</b>	
<b>Mikrofluidní zařízení pro průtokovou injekční analýzu s elektrochemickou detekcí</b> A. Muck, J. Wang a J. Barek	957
<b>Projekt mezinárodní banky spektroskopických dat EUROSPEC</b> L. Volková a K. Volka	961
<b>Studium interakcí hydroxylových radikálů a purinových bází DNA</b> R. Fadrná	964
<b>RECENZE</b>	970
<b>DISKUSE</b>	971

---

**CONTENTS**

<b>EDITORIAL</b>	919
<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Steroids at the Beginning of the 21st Century</b> A. Kasal	921
<b>Agglomeration of Particles and Defluidization Phenomena in the Fluid Bed</b> M. Hartman, O. Trnka, K. Svoboda, and V. Veselý	942
<b>Retroviral Genome and Physiological Function of Its Products</b> P. Strnad, Š. Haubová, and T. Ruml	949
<b>LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS</b>	
<b>Microfluidic Platform for FIA with Electrochemical Detection</b> A. Muck, J. Wang, and J. Barek	957
<b>International Spectroscopic Data Bank Project EUROSPEC</b> L. Volková and K. Volka	961
<b>Study of the Interactions Between Hydroxyl Radicals and Purine DNA Bases</b> R. Fadrná	964
<b>BOOK REVIEWS</b>	970
<b>DISCUSSION</b>	971

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 97 (2003), čís./no. 9 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 127, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 113 • 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, kolektivních členů ČSCH a Ministerstva zemědělství České republiky • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Heftlejš, P. Holý, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke, M. Bláhová (Bulletin), M. Ferles (Bulletin), B. Valter (Bulletin), I. Valterová (Bulletin), R. Liboska (webové stránky), P. Zámotný (webové stránky) • 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. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel., fax +420 222 220 184, e-mail: mblahova@csvts.cz, simanek@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA: SF SOFT, Jinonická 329, 158 00 Praha 5, B. Valter (Bulletin) • Copyright © 2003 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 125 Kč, roční plné předplatné 2003 (12 čísel) 1190 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 630 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 2003 (12 issues) 225 euro • Podávání novinových zásilek povoleno ČP s.p. OZ VČ, č.j. PPI/5333/95 • 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 v rámci dohod o spolupráci významným představitelům české chemie a chemického průmyslu a do všech relevantních knihoven v ČR.**