

NOVÝ SYSTÉM BEZPEČNOSTI POTRAVIN V EVROPSKÉ UNII A ČESKÉ REPUBLICE

EVA ČERNÁ

*Samostatné oddělení bezpečnosti potravin, Ministerstvo zemědělství České republiky, Těšnov 17, 117 05 Praha 1
e-mail: cerna@mze.cz*

Došlo dne 13.V.2002

Klíčová slova: Evropská komise, Evropský úřad pro bezpečnost potravin, Bílá kniha o zdravotní nezávadnosti potravin, hodnocení rizik, management rizik, komunikace o riziku

Evropská komise vydala počátkem roku 2000 tzv. Bílou knihu o zdravotní nezávadnosti potravin¹, která shrnuje cíle nové potravinové legislativy, které jsou založeny na opatřeních z oblasti potravin, krmiv, zdraví a ochrany zvířat, hygieny, reziduí až po tzv. nové potraviny včetně geneticky upravených, a tvoří rámec pro vytváření a způsob práce kontrolních orgánů. Uvedená kniha byla konkrétní reakcí na prohlášení předsedy Evropské komise Romana Prodiho, který ihned po svém nástupu do funkce avizoval revizi celého potravinového práva ES a vytvoření nadnárodní instituce, která by dohlížela na dodržování hygienických předpisů ve všech členských státech unie. Uvedená kniha avizovala vznik nových a jasných předpisů v oblasti celého potravinového řetězce od farmy ke spotřebiteli, které zahrnují problematiku veterinární (zdraví zvířat, zootechniku, péči o zvířata, veřejné zdraví), fytosanitární (zdraví rostlin, hygiena rostlin, pesticidy a kontaminanty) včetně výživy zvířat a potravin (označení, aditiva, nové potraviny atd.). V tomto dokumentu jsou též avizovány prováděcí postupy pro činnost kontrolních orgánů a stanoveny odpovídající úřední kontroly na národní i evropské úrovni. Zřízení nezávislého Evropského úřadu pro bezpečnost potravin považuje Evropská komise za nejvhodnější nástroj, jak zajistit vysoký stupeň zdravotní nezávadnosti potravin.

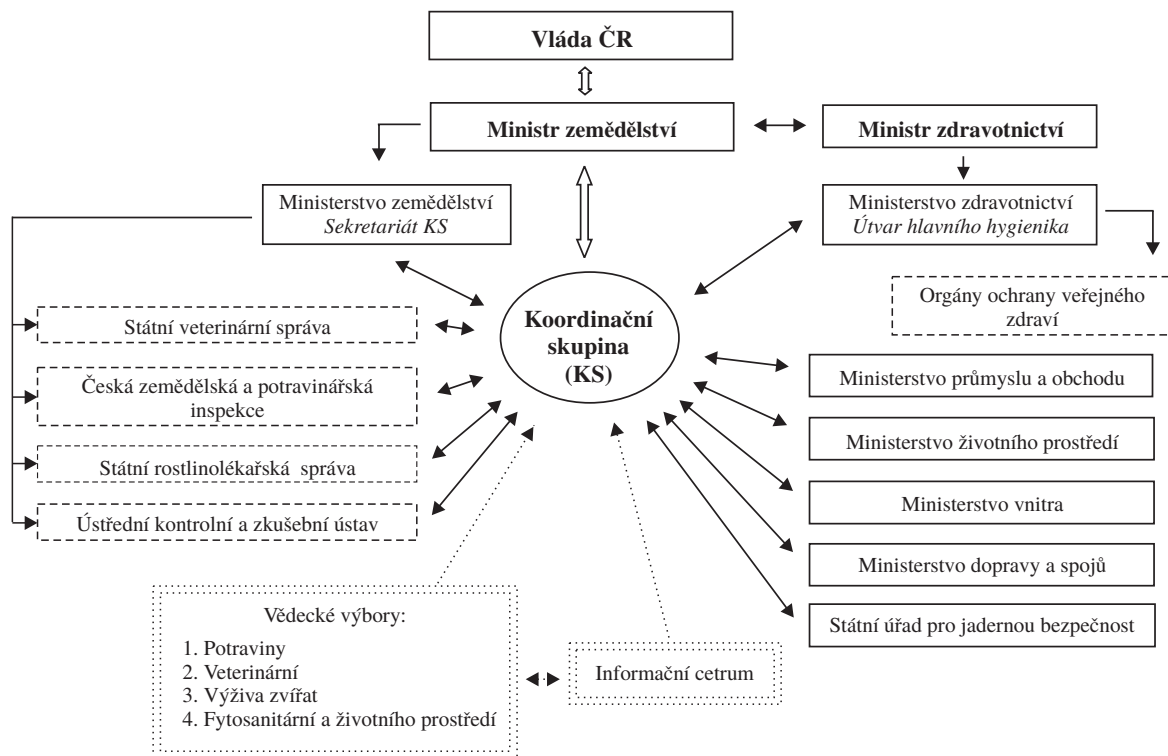
Uvedený dokument deklaruje jednotný systém, který vyžaduje zajišťování zdravotní nezávadnosti potravin v celém potravinovém řetězci a požaduje lepší koordinaci a sjednocení jak na úrovni společenství, tak i na úrovni národní. Podle této koncepce vychází politika bezpečnosti (nezávadnosti) potravin z analýzy rizika, která zahrnuje tři základní prvky, které musí být vzájemně propojené a jejichž fungování musí být koordinováno. Jde o posouzení rizika, management rizika a komunikaci o riziku.

V České republice je v současné době základním aspektem potravinové legislativy ochrana zdraví spotřebitelů i ochrana jejich ekonomických zájmů. Odpovědnost výrobce za jakost a zdravotní nezávadnost produktu, který uvádí do oběhu, je stěžejním principem výroby v celém řetězci od zemědělské prvovýroby až po prodej spotřebiteli. Pro zabezpečení ochrany spotřebitele, ale i vzájemné důvěry mezi dodavateli a odběrateli, funguje systém kontroly, který tuto odpovědnost zohledňuje. Systém kontroly stanovuje povinnost podnikatelům provádět pravidelnou kontrolu dodržování požadavků stano-

vených právními předpisy, a dále pak je stanoven státní dozor, reprezentovaný státními dozorovými orgány. Nynější systém státní kontroly je založen na vysoce odborně specializovaných dozorových orgánech, které ve vzájemné spolupráci garantují spotřebiteli účinnost předpisů zajišťujících bezpečnou cestu výrobku od prvovýrobce po konečného spotřebitele i nezávadnost výrobku samotného. Kompetence a pravomoci jednotlivých úřadů jsou stanoveny v příslušných zákonech, kterými se výše uvedené orgány dozoru řídí. Jde zejména o zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, v platném znění, zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví, zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči, v platném znění, zákon č. 63/1986 Sb., o České zemědělské a potravinářské inspekci, v platném znění, který bude od 1.1.2003 nahrazen novým zákonem č. 146/2002 Sb., o Státní zemědělské a potravinářské inspekci, zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, v platném znění a v neposlední řadě zákon č. 147/1996 Sb., o rostlinolékařské péči, v platném znění.

V kontextu našeho vstupu do EU je ze strany Evropské komise kladen velký důraz právě na zajištění kritérií zdravotní nezávadnosti v celém potravinovém řetězci. Z tohoto důvodu si v roce 2001 Evropská komise vyžádala od 12 kandidátských zemí zpracování Strategie bezpečnosti (nezávadnosti) potravin, kterou vypracovala ČR tak jako ostatní kandidátské státy. Politická priorita této problematiky byla zmiňována právě v souvislosti s několika krizemi v zemích EU, které se týkaly zdravotní nezávadnosti potravin, krmiv a výskytu nemocí zvířat přenosných na člověka. Cílem této iniciativy je zajištění stejného přístupu k bezpečnosti potravin ve státech unie i v kandidátských zemích. Evropská komise požaduje důkazy o převzetí veškeré klíčové legislativy ES včetně kontrolního systému ještě před vstupem do EU. V této souvislosti však nejde pouze o harmonizaci našeho práva, ale důraz je kladen na splnění všech povinností, které z příslušných předpisů vyplývají.

Systém zajištění zdravotní nezávadnosti potravin je v ČR (stejně jako v ostatních kandidátských zemích) permanentně podrobován detailnímu rozboru a kontrole ze strany orgánů Evropské komise. Inspekční mise pracovníků z Food and Veterinary Office (FVO), která problematiku bezpečnosti (nezávadnosti) potravin, zejména připravenost státních orgánů, sledovala v celém komplexu, proběhla 14.–18. května loňského roku. Cílem této mise bylo prověření orgánů a struktur odpovědných za tuto oblast, týkala se stavu harmonizace legislativy a možnosti jejího vynucování (kontrolního systému nad bezpečností potravin). Závěrem bylo konstatováno, že systém zajištění zdravotní nezávadnosti potravin v ČR je funkční a na dostatečné úrovni, nicméně bylo doporučeno urychlit proces harmonizace a prohloubit spolupráci a koordinaci jednotlivých státních orgánů působících v celém procesu výroby potravin „od pole až po vidličku“. Proces inspekcí ze strany orgánů Evropské komise se v současné době výrazně zintenzivnil a je zaměřen na určité specifické oblasti, např. na dodržování veterinárně-hygienických požadavků při výrobě potravin, kontrolu potravin na hranicích, připravenost a úroveň práce laboratoří, systém rychlé výstrahy apod. V době vstupu naší země do EU musí ČR splňovat veškerá kritéria



Obr. 1. Organizační schéma koordinace bezpečnosti potravin v České republice

bezpečnosti (nezávadnosti) potravin a kontrolní orgány Evropské komise budou tuto skutečnost bedlivě sledovat.

Jako reakci na zmíněná doporučení FVO z Dublinu přijala vláda ČR koncem loňského roku usnesení č. 1320, na jehož základě byla ustavena mezirezortní Koordinační skupina bezpečnosti potravin, která je poradním a iniciačním orgánem ministra zemědělství. Byl schválen harmonogram legislativních úkolů souvisejících s implementací dosud plně neharmonizovaných právních předpisů ES a dále pak bylo rozhodnuto o zřízení tzv. vědeckých výborů, jejichž činnost bude zaměřena na hodnocení rizik. Vědecký výbor pro potraviny bude ustaven při Státním zdravotním ústavu v Praze, veterinární vědecký výbor bude pracovat při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně, vědecký výbor pro výživu zvířat při Výzkumném ústavu živočišné výroby v Praze – Uhřetěvesi a vědecký výbor pro oblast fytosanitární a ochrany životního prostředí při Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze – Ruzyni. Vědecké výbory nejsou řízeny Koordinační skupinou – organizační a technické zázemí mají v jednotlivých ústavech, členové vědeckých výborů jsou vybraní experti, za stanoviska vydávaná vědeckým výborem odpovídá předseda výboru, a nikoli ředitel ústavu. Organizační uspořádání je znázorněno na obrázku 1.

Ze strany Evropské komise avizované nařízení stanovující obecné principy a požadavky na potravinové právo zahrnující též problematiku krmiv, zřizující Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanovující postupy v záležitostech zdravotní nezávadnosti, bylo počátkem tohoto roku přijato Evropským parlamentem a Radou a zveřejněno v Úředním věstníku ES pod číslem 178/2002. Ustanovení tohoto nařízení se vztahují na celé potravinové řetězce od prvovýroby, zpracování až po

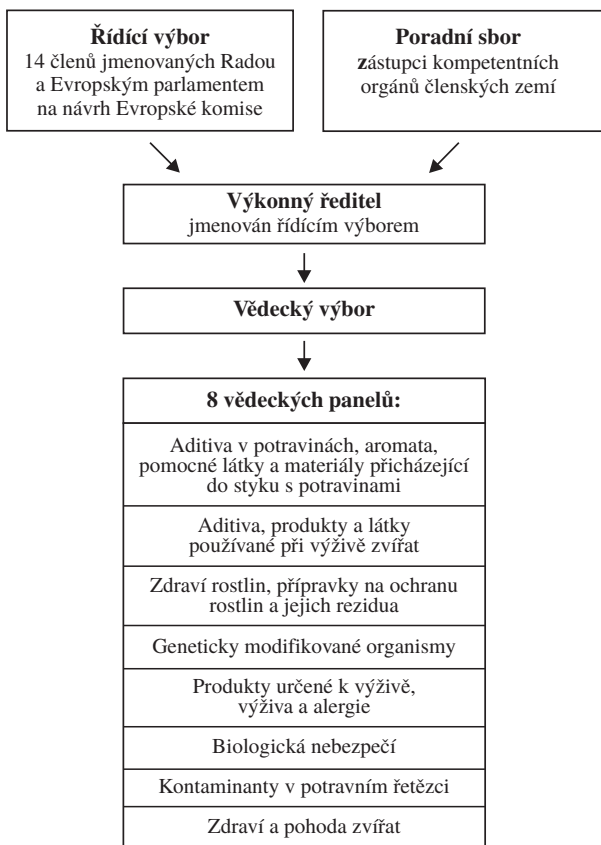
uvádění do oběhu včetně prodeje konečnému spotřebiteli a zařízení společného stravování, nevztahují se na prvovýrobu pro soukromé domácí použití nebo na domácí přípravu potravin. Poprvé je zde na úrovni ES legislativně definována potravina (jako jakákoli látka nebo produkt zpracovaný, částečně zpracovaný nebo nezpracovaný, který je určen ke konzumaci člověkem, nebo u něhož to lze očekávat, včetně žvýkaček, nápojů a vody, která je záměrně přidávána do potraviny během její výroby) a další termíny nezbytné pro stanovení požadavků na potravinové právo, přičemž potravinovým právem se chápou předpisy týkající se potravin včetně jejich zdravotní nezávadnosti, a to na úrovni národní i ES, zahrnující též celý potravinový řetězec včetně krmiv používaných v chovech hospodářských zvířat.

Z obecných zásad pro potravinové právo vyplývá, že příslušné předpisy (jak na úrovni národní i ES) musí zajišťovat:

- vysokou úroveň ochrany lidského života a zdraví,
- ochranu zájmů spotřebitelů včetně poctivého jednání při obchodování,
- podle potřeby zohlednit ochranu zdraví zvířat, pohodu zvířat, ochranu rostlin a životního prostředí.

Předpisy musí vést k tomu, aby bylo ve Společenství dosaženo volného pohybu potravin a krmiv vyrobených a uvedených na trh podle požadavků stanovených v tomto nařízení.

Pro dosažení vysoké úrovně ochrany lidského života a zdraví se musí příslušné potravinové právo opírat o analýzu rizika², která v sobě zahrnuje 3 vzájemně propojené prvky. Tím prvním je hodnocení rizika, kterým se chápe vědecky podložený proces skládající se ze 4 kroků – identifikace nebezpečí³, charakterizace nebezpečí, odhad expozice a charakterizace rizika. Dalším prvkem je management rizika, který



Obr. 2. Organizační schéma Evropského úřadu pro bezpečnost potravin

spočívá ve zvažování strategických možností, provádění konzultací se zainteresovanými stranami a zohlednění hodnocení rizika a dalších faktorů při zvolení vhodných možností a nástrojů prevence a kontroly. Za zvláštních okolností je v rámci managementu potřeba uplatnit zásadu prevence, zejména v případě, kdy přetrvává vědecká nejistota při hodnocení možnosti škodlivých účinků na zdraví – tato opatření však musí být přiměřená a časově omezená do doby, než dojde k vyjasnění vědecké nejistoty a k provedení komplexnějšího hodnocení rizika. Tím třetím prvkem v řadě je komunikace o riziku, kterou se rozumí výměna informací a stanovisek v rámci analýzy rizika. Týká se zejména vnímání rizik, a to mezi těmi, kdo hodnotí rizika, manažery rizika, spotřebiteli, výrobními podniky, akademickými obcí a dalšími zainteresovanými stranami, včetně vysvětlování výsledků hodnocení rizik a základů pro rozhodnutí v rámci managementu rizika.

Dalším úkolem potravinového práva je ochraňovat zájmy spotřebitele (prevence před podvody, falšováním a klamavými praktikami) a zajistit, aby měl k dispozici dostatek informací, které mu usnadní výběr. Podrobně je rozpracován požadavek na nezávadnost potravin a krmiv s tím, že na trh nemůže být uvedena potravin, která může poškodit lidské zdraví nebo se nehodí k lidské spotřebě, stejně tak krmivo, které se nepovažuje za zdravotně nezávadné nebo má nepříznivý účinek na zdraví nebo způsobuje, že potraviny získané z hospodářských zvířat nejsou bezpečné pro lidskou spotřebu. Vysledovatelnost původu potravin, krmiv a hospodářských zvířat a jakékoliv

látky, která je použita k výrobě potravin nebo krmiv, je dalším základním principem, který musí podnikatelé zajistit v celém řetězci. Jednoznačně je stanovena odpovědnost podnikatelů na všech stupních výroby, zpracování a uvádění do oběhu za plnění požadavků potravinového práva. Členské státy pak mají povinnost zavést systém úředních kontrol, včetně opatření a pokut při porušení ustanovení potravinového práva.

Významné místo v systému zajištění bezpečnosti potravin na úrovni společenství má Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EUBP), který bude sloužit jako referenční pracoviště pro oblast hodnocení rizik a komunikace o riziku v rámci ES. Posláním úřadu je poskytování vědeckých doporučení a stanovisek, vědecké a technické podpory při přípravě právních předpisů v oblastech, které mají přímý nebo nepřímý vliv na bezpečnost potravin a krmiv a poskytování nezávislých informací včetně komunikace o riziku. Úřad bude shromažďovat a analyzovat data, aby mohl charakterizovat a sledovat možná rizika. Dále bude úřad poskytovat doporučení, vědeckou i technickou podporu v otázkách výživy, vědecká stanoviska k problematice zdraví zvířat, pohody zvířat a zdraví rostlin a v neposlední řadě k výrobkům týkajícím se geneticky modifikovaných organismů. Členským státům se stanovuje povinnost spolupracovat s tímto úřadem s cílem zajistit plnění jeho poslání. Základními úkoly jsou zejména – poskytovat institucím ES a členským státům vědecká stanoviska, podporovat a koordinovat vývoj jednotlivých metodik hodnocení rizika, poskytovat vědeckou a technickou podporu Evropské komisi, a to i v případech krizového řízení v oblasti potravin a krmiv, zadávat vědecké studie, shromažďovat a analyzovat vědecká data, podnikat opatření k identifikaci a charakterizaci vznikajících rizik, poskytovat vědeckou a technickou pomoc pro zlepšení spolupráce s kandidátskými zeměmi, mezinárodními organizacemi a třetími zeměmi, zajišťovat včasné, spolehlivé a komplexní informace směrem k veřejnosti a plnit další úkoly zadané Evropskou komisí. Organizační uspořádání je uvedeno na obrázku 2.

Je stanoven způsob činnosti při plnění jednotlivých úkolů úřadu, zejména při vydávání vědeckých stanovisek včetně řešení rozdílných stanovisek, zpracování studií, shromažďování a analyzování dostupných údajů, identifikaci možných rizik i napojení na systém rychlého varování a propojení na ostatní organizace působící v oblastech poslání úřadu. Velmi silný důraz je kladen na nezávislost, transparentnost a důvěrnost při veškerých činnostech úřadu, není opomenuta povinnost sdělovat veřejnosti a všem zainteresovaným stranám informace o výsledcích práce úřadu včetně širokého přístupu k dokumentům, které vlastní.

Systém rychlého varování (RAS – Rapid Alert System), krizové řízení a mimořádné události jsou předmětem kapitoly IV zmíněného nařízení. Systém rychlého varování ve formě sítě pro ohlašování přímého nebo nepřímého rizika pro lidské zdraví, vyplývajícího z potravin nebo krmiva, zahrnuje členské státy, Evropskou komisi a Evropský úřad pro bezpečnost potravin. Za správu sítě je odpovědná Evropská komise. Tento systém byl původně koncipován na základě směrnice o obecné bezpečnosti výrobků (zahrnoval veškeré výrobky včetně potravin); postupně se systém rozdělil na 2 části, z nichž jedna se týkala výhradně potravin a druhá ostatních průmyslových výrobků. Nařízením EC č.178/2002 se tak zřizuje samostatný systém včasného varování pro potraviny a krmiva včetně vymezení jeho působnosti, prováděcích opatření, požadavků

na jeho činnost a možnosti účasti dalších států a mezinárodních organizací. Evropská komise i členské státy mohou přijmout mimořádná opatření spočívající v zákazu uvádění potravin nebo krmiv (pocházejících ze zemí ES i dovezených) na trh ES nebo stanovení speciálních podmínek pro uvádění na trh, pokud tyto potraviny nebo krmiva představují vážné riziko pro lidské zdraví, zdraví zvířat nebo životní prostředí. Podmínky pro jejich přijetí jsou předmětem článku 53 a 54. V rámci krizového řízení je Evropská komise povinná ve spolupráci s Evropským úřadem pro bezpečnost potravin a členskými státy EU sestavit obecný plán krizového řízení a zřídit krizový štáb.

LITERATURA

1. *White Paper on Food Safety*. COM, Brussels 1999.
2. *Bílá kniha o zdravotní nezávadnosti potravin* (Pešková Z., Mezera J., ed.). VÚZE, Praha 2000.
3. Nařízení EP a Rady 178/2002.

E. Černá (*Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Prague*): **New System of Food Safety in the European Union and the Czech Republic**

The revision of the existing and the adoption of new

legislation as well as the establishment of the independent European Food Safety Authority has become the main tool of the food safety policy of the European Commission. The food safety issue represents the system throughout the whole food chain from farm to table based on risk analysis. The risk analysis consists of three interconnected elements – risk assessment, risk management and risk communication. The basic requirements obligatory for the EU countries were set in the Regulation No. 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food law. The Czech Government adopted the resolution No.1320/2001 concerning food safety strategy and acknowledged that food safety is one of the main priorities of the Government with regard to the accession of the Czech Republic to the EU. The Czech Government adopted organizational safeguarding of the strategy. An interdepartmental coordination team working as an advisory and initiative body of the Minister of Agriculture plays the key role in this field. Establishment of scientific boards and their activities will support the decision-making of the ministries and control bodies, and will serve as a basis for the risk communication. The boards will also cooperate with scientific panels of the European Food Safety Authority.

PERSPEKTIVY ČESKÉHO ZEMĚDĚLSTVÍ V OBLASTECH S NIŽŠÍ PRODUKTIVNOSTÍ A SPOLUPRÁCE ZEMĚDĚLSTVÍ S CHEMICKÝM VÝZKUMEM A PRŮMYSEM

LADISLAV KOLÁŘ^a, STANISLAV KUŽEL^a
a JIŘÍ GERGEL^b

^aKatedra obecné produkce rostlinné, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, ^bVýzkumný ústav meliorací a ochrany půdy Praha, pracoviště Rudolfovska 80, 370 01 České Budějovice
e-mail: kolar@zf.jcu.cz

Došlo dne 15.VIII.2001

Klíčová slova: zemědělství a chemie, oblasti s nižší produktivností (LFA) v ČR

Obsah

1. Úvod
2. Vymezení oblastí LFA v ČR
3. Agrochemická charakteristika půd oblastí LFA
 - 3.1. Změny pH
 - 3.2. Úbytek přístupných živin
 - 3.3. Hodnoty prvků půdní úrodnosti
 - 3.4. Zvýšení koncentrace přístupného železa Fe_{AV} a labilního hliníku Al_{LAB} a snížení mikrobiální aktivity půd
4. Ekonomické zhodnocení dosažených výsledků
5. Návrh využití oblastí LFA v ČR
6. Možnosti chemického průmyslu a výzkumu při využití oblastí LFA
7. Závěr

1. Úvod

Vysokou spotřebu hnojiv, pesticidů a dalších agrochemikálií lze v budoucnu v ČR očekávat pouze v oblastech s nejvyšší produktivností (ONVP) a s vysokou produktivností (OVP) zemědělství, kde se budou rozvíjet i nové systémy technologické, kontrolní, organizační aj., např. tzv. „precizní zemědělství“¹. Tyto oblasti (zhruba 50 % zemědělské půdy ČR) jsou vhodné pro intenzivní zemědělskou výrobu a zajistí prakticky celou naši spotřebu zemědělských produktů. Zbývající plodiny z oblastí s méně příznivými podmínkami (oblasti LFA – less favoured areas) jsou převážně určeny pro nepotravinářské využití produkce a pro neproduktivní využití půdy. Produkují však v průměru 72,64 GJ.ha⁻¹ čistého energetického zisku, který je závislý na hustotě skotu v soustavě². Mohou být tedy dobře využity k výrobě energie z naakumulované energie sluneční, zachycené rostlinami³. Spotřeba agrochemikálií v oblastech LFA bude zcela minimální⁴.

2. Vymezení oblastí LFA v ČR⁵

Evropská komise EU předložila 18. 3. 1998 v rámci tzv. „Agendy 2000“ své návrhy k reformě zemědělství, která vstoupila v platnost v roce 2000. Tato reforma má především zajistit konkurenceschopnost evropského zemědělství. Oblasti LFA zahrnují horské oblasti (kde sníženou výnosovost působí nadmořská výška, svažitost a klimatické podmínky) a ostatní oblasti s půdami, které mají nízkou výnosovost, obtížnou obdělátnost, s nižší produktivitou přírodního prostředí, s nízkou populací převážně závislou na zemědělství a oblasti, postižené specifickými překážkami – např. kontaminací imisemi aj.⁶

V rámci celé EU je do LFA zařazeno zhruba 51 % veškeré zemědělské půdy. Rozdílly jsou však velké: např. v Belgii 23 %, ve Francii 40 %, ve Španělsku 63 % a v Lucembursku téměř 100 %.

Výchozím třídícím kritériem pro stanovení zemědělských oblastí v ČR byla zvolena výnosovost zemědělského území (Výzkumný ústav zemědělské ekonomiky Praha, stanovená pro jednotlivé bonitované půdně-ekologické jednotky (BPEJ)⁷. Hraničním limitem pro vymezení oblastí s příznivými a nepříznivými podmínkami se stala hodnota výnosovosti 35 bodů, tj. 76 % celostátního průměru. (V ČR je průměrná výnosovost 3 035 Kč.ha⁻¹ zemědělské půdy, a to je 46,2 bodu.) K této hodnotě se dospělo po analýze všech přírodních a sociálně-demografických kritérií tak, jak jsou rámcově požadovány EU (cit.⁸).

V ČR patří do oblastí LFA (horské, ostatní oblasti a oblasti se specifickými překážkami) 48,83 % veškerého zemědělského půdního fondu.

3. Agrochemická charakteristika půd oblastí LFA^{9–12}

Z celkové plochy oblastí LFA v ČR tvoří LFA se specifickými překážkami pouze 7,21 % výměry. Převažují tedy oblasti LFA horské a podhorské, a proto za oblast výzkumu půd byla zvolena jihovýchodní Šumava, zahrnující horské i podhorské lokality. Dalším zdrojem informací byly zprávy Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) Brno se svodnými údaji z okresů ČR¹³.

3.1. Změny pH^{11,12,14}

Výsledky ÚKZÚZ Brno v tabulce I dokazují změnou procentického zastoupení půd v kategoriích A a B (extrémně kyselá a silně kyselá půdy), že k nejsilnějšímu a zároveň nejrychlejšímu okyselení orných půd došlo v jihočeském regionu a k okyselení půd pod trvalými travními porosty v západočeském regionu. Změna podílu půd v těchto kategoriích v jihočeském regionu se zvýšila 3–4× proti průměru České republiky a změna podílu půd těchto kategorií pod trvalými travními porosty v západních Čechách je dokonce 15–20×

Tabulka I

Procentické zastoupení půd podle kategorie půdní kyselosti a jeho změny ve vzorcích orných půd a půd pod trvalými travními porosty ve srovnávacím období 1990–1992 a 1993–1998 podle ÚKZÚZ Brno; A – extrémně kyselá, B – silně kyselá, C – kyselá, D – slabě kyselá

Region	Období	Orná půda				Trvalé travní porosty			
		A	B	C	D	A	B	C	D
Jihočeský	1990–92	2,08	6,52	13,54	45,04	5,43	10,40	14,14	36,03
	1993–98	2,79	9,12	16,78	53,52	7,01	12,62	15,78	43,89
	rozdíl	0,71	2,60	3,24	8,48	1,58	2,22	1,64	7,86
Středočeský	1990–92	1,05	3,56	7,61	30,05	4,68	10,47	14,36	40,41
	1993–98	1,56	3,79	8,58	34,69	5,12	10,26	16,17	49,26
	rozdíl	0,51	0,23	0,97	4,64	0,44	-0,21	1,81	8,85
Západočeský	1990–92	1,32	6,48	16,01	53,56	4,87	9,21	16,33	48,58
	1993–98	1,93	7,38	17,07	59,43	10,34	11,91	18,56	43,15
	rozdíl	0,61	0,90	1,06	5,87	5,47	2,70	2,23	-5,43
Východočeský	1990–92	0,96	3,10	9,00	44,10	7,20	8,50	13,10	40,73
	1993–98	1,37	3,67	9,26	46,35	7,13	8,56	14,47	45,09
	rozdíl	0,41	0,57	0,26	2,25	-0,07	0,06	1,37	4,36
Česká republika	1990–92	1,23	4,20	9,69	36,27	6,82	10,74	14,48	37,14
	1993–98	1,47	4,78	10,63	40,03	7,15	10,98	15,97	42,49
	rozdíl	0,24	0,58	0,94	3,76	0,33	0,24	1,49	5,35

Tabulka II

Průměrné hodnoty pH/KCl a přístupného vápníku ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) v orných půdách jihočeského regionu ve srovnávacím období 1990–1992 a 1993–1998 podle údajů ÚKZÚZ Brno

Okres	pH/KCl			Přístupný vápník		
	1990–1992	1993–1998	rozdíl	1990–1992	1993–1998	rozdíl
Český Krumlov	6,3	6,0	-0,3	2 063	1 945	-118
Pelhřimov	6,0	5,7	-0,3	1 696	1 736	+40
Prachatice	6,1	5,9	-0,2	2 154	1 952	-202
Jihočeský region	6,0	5,9	-0,1	1 743	1 861	+118

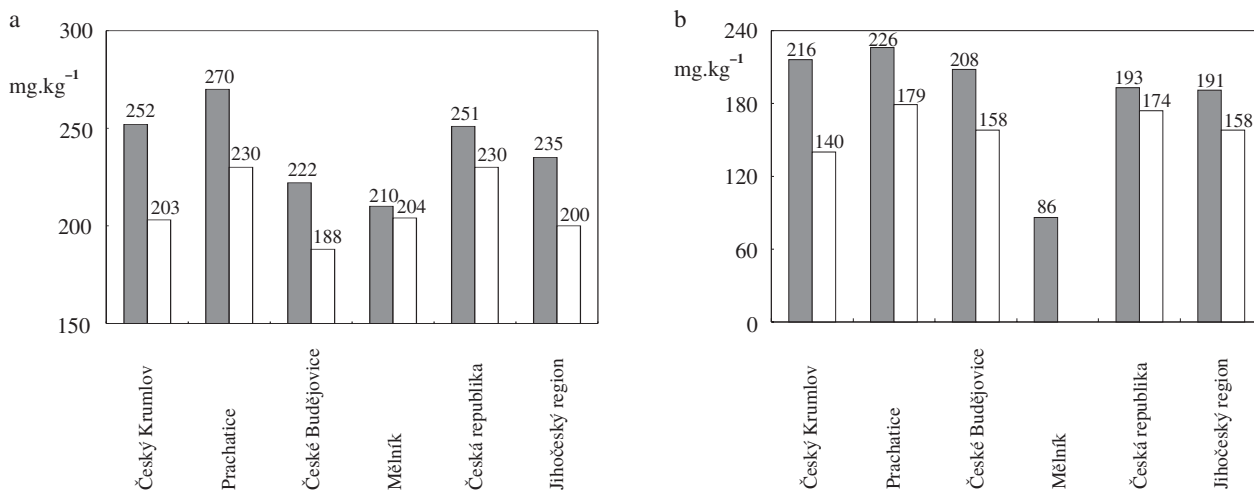
vyšší, což je při relativně krátkém časovém intervalu 3–6 let výsledek šokující, i když v průměru ČR jsme se změnami půdního pH nadmíru spokojeni. Podívejme se do tabulky II na změny pH/KCl orných půd v jednotlivých okresech jihočeského regionu.

Změny pH/KCl se často dávají do souvislosti s elucí vápníku a překvapivě malé okyselení půd v celé České republice se vysvětluje dvěma příčinami: sníženým okyselovacím efektem aplikovaných průmyslových hnojiv, hlavně dusíkatých, protože v současnosti používá čs. zemědělství zhruba jen 30 % čistých živin NPK proti stavu hnojení v roce 1987; další příčinou je podle některých autorů dostatečná zásoba půdního vápníku, který se stále uvolňuje z hrubě mletých vápenců, aplikovaných v dobách vysoké intenzity vápnění – do roku 1990 (cit. ¹³). Je to jistě jedna z mnoha příčin. Z tabulky II je zřejmé, že v okrese Pelhřimov došlo k poměrně rychlému okyselení půd a obsah přístupného vápníku se v těchto půdách dokonce zvýšil, i když je nutno vidět, že jeho celkové množství v těchto půdách je v průměru nižší. Z tabulek však lze jedno-

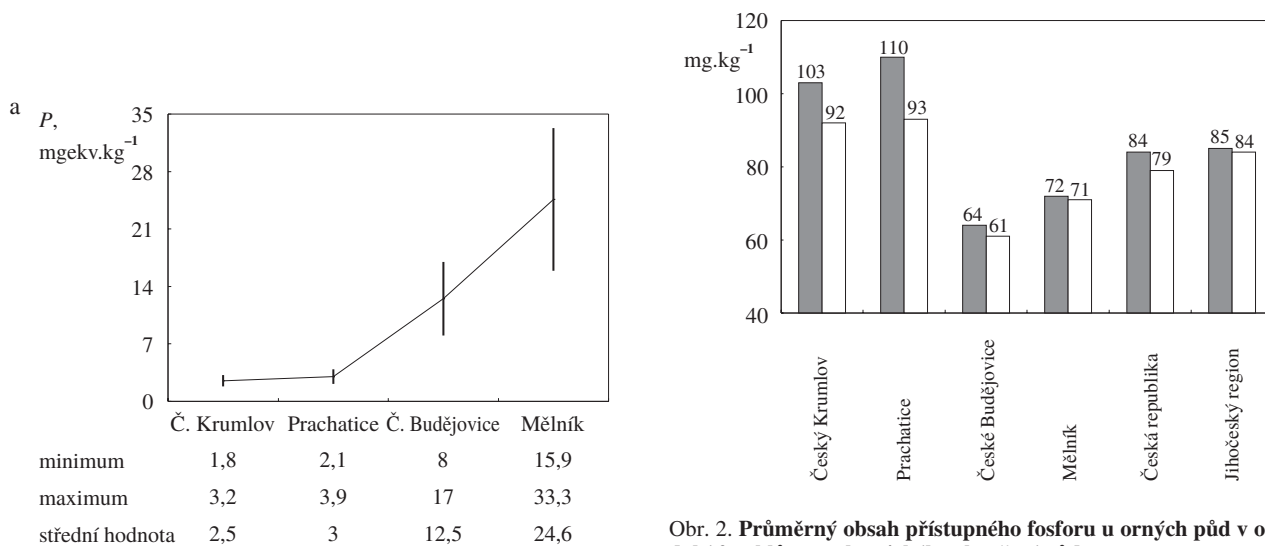
značně vyvodit závěr, že okresy s podhorskými a horskými polohami významně ovlivňují úroveň rychlého okyselování půd vzhledem k celým regionům a že v půdách těchto okresů dochází k úbytku výměnného vápníku. Zvlášť je to markantní v půdách pod trvalými travními porosty.

3.2. Úbytek přístupných živin ^{6,9,11,13}

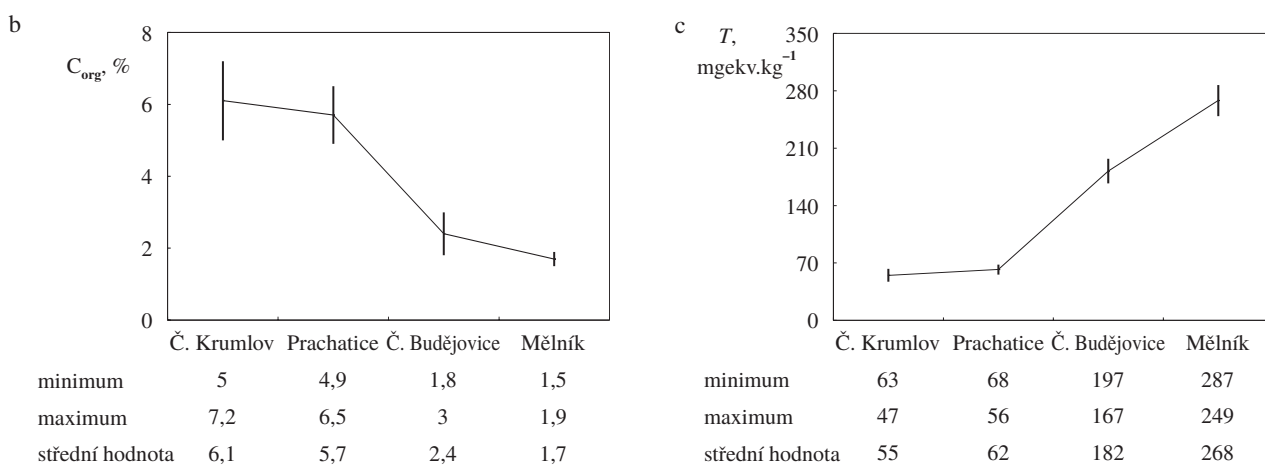
Prudký pokles intenzity hnojení (v roce 1987 byla spotřeba základních živin NPK $238 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ zemědělské půdy, v roce 1991 jen $65 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ a v roce 1998 jen $73,2 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ zemědělské půdy) vede pochopitelně ke snížení zásoby přístupných živin, fosforu a zvláště draslíku. Z obr. 1 a 2 je zřejmé, že pokles obsahu přístupných živin v okresech horských a podhorských poloh je mnohem výraznější a že zvláště úbytek draslíku pod trvalými travními porosty přes relativně krátké sledovací období je už zlověstný. Protože v celé České republice poklesl obsah přístupného draslíku pod trvalými travními porosty za toto období o $19 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, je zhoršení této situace v horských

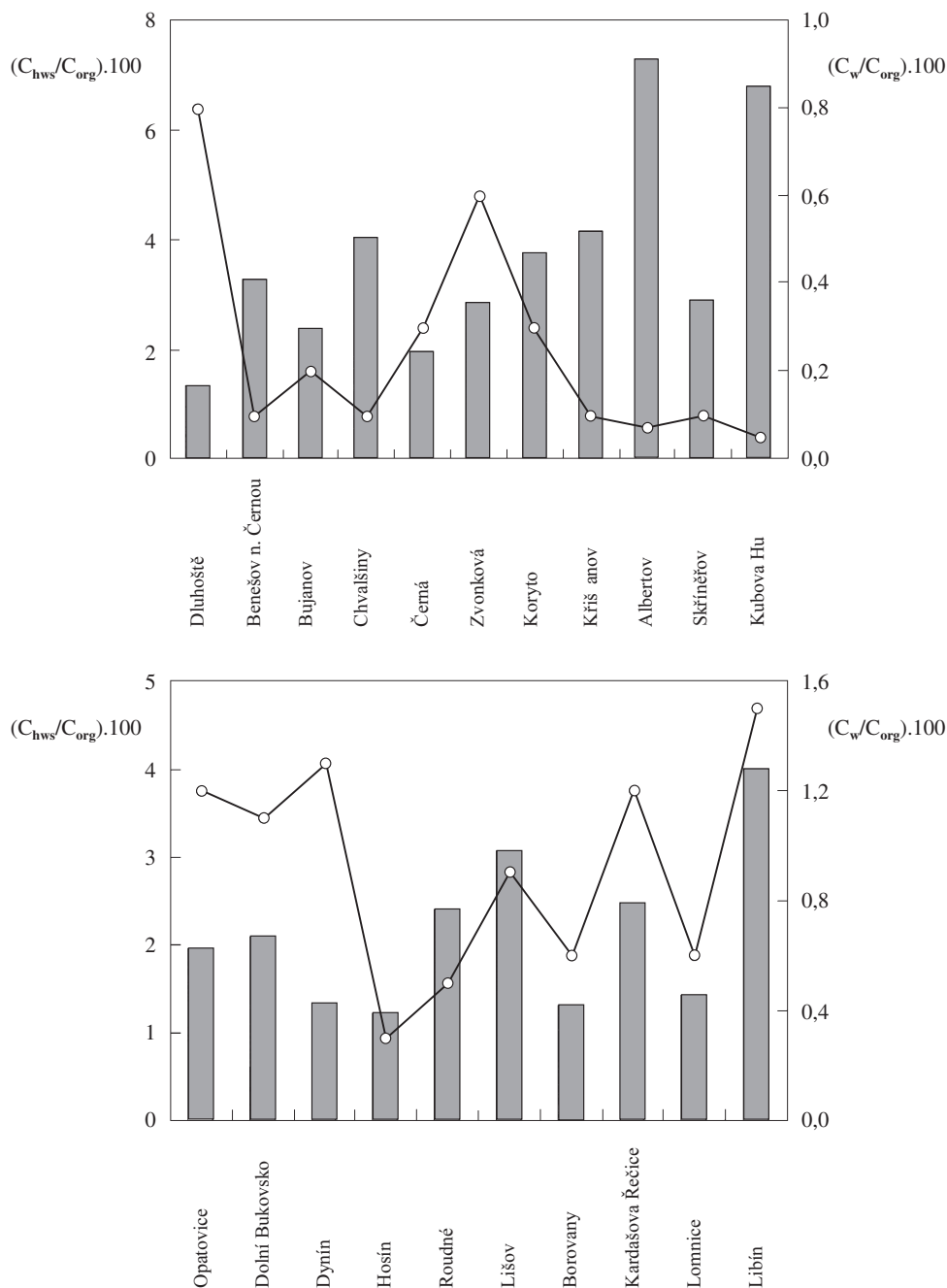


Obr. 1. Průměrný obsah přístupného draslíku půd pod trvalými travními porosty (a) a u orných půd (b) v období 2 cyklů agrochemického zkoušení půd



Obr. 2. Průměrný obsah přístupného fosforu u orných půd v období 2 cyklů agrochemického zkoušení půd

Obr. 3. Pufrovitost P půd (a), obsah C_{org} půd (b) a sorpční kapacita T u půdních vzorků (c) pod trvalými travními porosty vybraných okresů v roce 1999



Obr. 4. Poměr aktivního uhlíku C_{hws} a vodorozpuštěného uhlíku C_w k celkovému organickému uhlíku C_{org} půd pod trvalými travními porosty a) z horských a podhorských oblastí Šumavy a b) z úrodných vrchovinných oblastí okresu České Budějovice; ■ $(C_{hws}/C_{org}) \cdot 100$, ○ $(C_w/C_{org}) \cdot 100$

a podhorských polohách 2–3 násobné (na orných půdách zhruba 2 násobné) (cit.⁶).

3.3. Hodnoty prvků půdní úrodnosti^{9,11,12,18}

V obr. 3 je možno vidět stejný trend, pronikavě horší hodnoty dalších dynamických i konzervativních prvků půdní úrodnosti^{1,9,18} v okresech horských a podhorských poloh proti

polohám nížinným a vrchovinným. Nízká pufovinnost při vysokém obsahu C_{org} půd okresu Český Krumlov a Prachatice dokazuje, že organická hmota těchto půd má nízký stupeň humifikace. Potvrzují to i nízké hodnoty sorpční kapacity půd těchto okresů¹⁵.

V půdách horských a podhorských poloh pod trvalými travními porosty (TTP) v okrese Český Krumlov a Prachatice ve srovnání s relativně úrodnými půdami pod TTP v okrese

České Budějovice bylo zjištěno, že hodnoty celkového uhlíku C_{org} a aktivního organického uhlíku C_{hws} (cit.¹⁶) jsou relativně vyšší, naopak obsah vodorozpuštěného uhlíku C_w (cit.¹⁷) je výrazně nižší (obr. 4).

Snížení množství humusu a jeho zhoršená kvalita v půdních vzorcích půd horských a podhorských oblastí se podílí (proti srovnávací skupině vzorků půd úrodných vrchovinných oblastí okresu Č. Budějovice) na průměrném snížení sorpční kapacity o 33 %, snížení pH/KCl o 7,5 % a snížení zásoby přístupných živin – fosforu o 20 %, draslíku o 23 %, vápníku o 29 % a hořčičku o 22 %. Zvláště pokles obsahu přístupného fosforu je značný. (V celé České republice v půdách pod TTP obsah fosforu v rozmezí let 1992–1998 vůbec neklesl¹³ a ve srovnávací skupině půd okresu Č. Budějovice je v současnosti proti půdám pod TTP celé ČR zaznamenán pokles o pouhých 9 %.)

3.4. Zvýšení koncentrace přístupného železa Fe_{AV} a labilního hliníku Al_{LAB} a snížení mikrobiální aktivity půd^{6,10,11,19}

Počáteční respirace (1–3 dny) (cit.^{11,20,21}), bazální respirace (4–7 dnů) (cit.^{11,20,22}) i dlouhodobá respirace při 35denní inkubaci^{11,23} je v sérii půdních vzorků z horské a podhorské oblasti jihovýchodní Šumavy ve srovnání se vzorky půd z úrodné vrchovinné oblasti okresů České Budějovice a Třeboň výrazně nižší. V horských půdách dochází současně s poklesem respirací ke vzestupu „aktivního půdního uhlíku“ C_{hws} (cit.^{11,22,23}), což je nelogické. Zjistili jsme, že současně v těchto vzorcích výrazně vystupuje vysoký obsah přístupného železa^{11,24,25} nebo labilního hliníku^{11,25,26}, většinou obou kovů současně. Domníváme se proto, že neobvyklou mikrobiální nerozložitelnost frakce uhlíkatých zdrojů, charakterizovaných C_{hws} působí prosycení půdní organické hmoty soly železa a hliníku. Protože v půdních podmínkách horských poloh Šumavy neklesá pouze bazální respirace, ale vlivem nepříznivých podmínek, hlavně nízkého pH, také uhlík biomasy mikroorganismů C_{BM} (cit.^{11,27}), Hendrixův index biologické aktivity půdy²⁸ paradoxně neklesá, nebo relativně málo. Je tedy H_{BAP} pro hodnocení biologické aktivity půd v těchto extrémních podmínkách zcela nespolehlivý a zkrsluje kritický stav podhorských a horských půd.

4. Ekonomické zhodnocení dosažených výsledků

Dynamické prvky půdní úrodnosti půd horských a podhorských oblastí se s poklesem intenzity hnojení a vápnění v období 1988–1998 zhoršují 2–3× rychleji, než je průměr České republiky; soustavné vyrovnávání těchto dynamických prvků proto nebude ekonomicky únosné. I konzervativní prvky půdní úrodnosti jsou zde špatné^{6,9–12}.

S představami klasické intenzivní zemědělské výroby v oblastech LFA je nutno se rozloučit.

5. Návrh využití oblastí LFA v ČR

Obecně se uvádí, že oblasti LFA musí obsahovat soustavy hospodaření s extenzivním využitím půdy a s významnými

mimoprodukčními přínosy²⁹. Představa, že kromě podpůrných programů EU i vlády ČR bude obyvatelstvo LFA živit ochrana a tvorba krajiny, ochrana vodních zdrojů, agroturistika a ekologické zemědělství, je trochu málo přesvědčivá. Řešením by byl intenzivní chov skotu s produkcí mléka a masa, ale o tyto produkty není dostatečný obchodní zájem. Zvýšení počtu zvířat by zlepšilo uhlíkovou bilanci v půdě a zastavilo pokles půdní úrodnosti v těchto oblastech³⁰. Extenzivní zemědělská výroba znamená nevyužití sluneční energie, a je tedy a priori nevhodná³¹. Humidnější klima a nenáročnost některých trav na půdní podmínky vedly k návrhu využít oblasti LFA k produkci obnovitelných zdrojů energie^{2,32}. Kromě energetických plodin k přímému spalování³³ se zde uvažuje o výrobě methanu^{34–36} a jeho kogeneraci na elektrickou energii alternátory, poháněnými plynovými motory, někdy jen upravenými z vyřazených automobilů³⁷, anaerobním vyhníváním travní hmoty z nehojených ploch kofermentací s výkaly skotu³⁸. Odpady z anaerobní degrese by bylo nutno zpracovat na organominerální hnojiva³⁹, která by spolu s omezením spotřeby vnější energie ekonomicky, ekologicky i výrobně stabilizovala zemědělskou soustavu oblastí LFA (cit.⁴⁰).

6. Možnosti chemického průmyslu a výzkumu při využití oblastí LFA

Snaha přeměnit významnou část zemědělské výroby z produkce potravinářské na nepotravinářskou v celé ČR a zvláště v oblastech LFA bez pomoci chemie je nemyslitelná. Možnosti spolupráce lze stručně vyjmenovat takto:

- nepotravinářské využití klasických produktů živočišné výroby, především mléka,
- nepotravinářské využití klasických produktů rostlinné výroby, především obilnin, řepky, travní hmoty (zatím bohužel v této kategorii máme jen bionaftu z methylizovaného řepkového oleje a problematický bioethanol slabě konkurující syntetickému),
- energetické využití hmoty energetických plodin a technologie jejich zpracování (kromě klasických postupů přímého spalování a anaerobní degrese je zájem o moderní technologie pyrolytické, zvláště s produkcí vodíku⁴¹),
- výroba nepotravinářských produktů z netradičních zemědělských plodin, zvláště pro farmaceutický průmysl, např. imunogenní rostliny *Echinacea purpurea*⁴², adaptogenních rostlin *Hippophae rhamnoides*⁴³ a *Leuzea carthamoides*⁴⁴,
- výroba zušlechťených produktů z tradičních zemědělských plodin pro širokou spotřebu v průmyslu, např. nové typy levných modifikovaných škrobů, které by konkurovaly velkému dovozu pro potřeby potravinářského, textilního a papírenského průmyslu; výhodné by bylo k tomuto účelu využít obilnin, méně již brambor a kukuřice⁴⁵,
- využití organických odpadů k výrobě levných organominerálních hnojiv; současná minerální hnojiva jsou pro oblasti LFA vzhledem k výnosovosti příliš drahá a navíc využití jejich živin je nízké. Je nutno zvýšit bioenergetický potenciál půd^{30,46}, a to lze při nízkých stavech skotu (v ČR 0,34 VDJ.ha⁻¹, ve vyspělých zemích EU 1,2–2 VDJ.ha⁻¹) jedině organominerálními hnojivy (VDJ – velká dobytčí jednotka, tj. 1 kus skotu o hmotnosti 500 kg; ostatní zvířata se přepočítávají pomocí koeficientů).

7. Závěr

Stav prvků půdní úrodnosti v oblastech LFA našeho státu je špatný a nedostatkem finančních prostředků i malým zájmem o produkty živočišné výroby, a tím o zvýšení stavu skotu se dále zhoršuje. Nemá-li 48,83 % českého zemědělského půdního fondu (oblasti LFA) být závislé pouze na podporách vlády a EU, je pomoc chemického výzkumu a průmyslu českému zemědělství naprostou nutností. Tato pomoc by však byla neúčinná, kdyby se měla realizovat pouze formou vývoje a výroby minerálních hnojiv, pesticidů a ostatních agrochemikálií.

Zjištěné výsledky byly získány s finanční podporou grantu MŠMT, id kód: CEZ: J 06/98:122200002.

LITERATURA

1. Brodský L., Vaněk V.: *Sborník konference Racionální použití průmyslových hnojiv* (Brodský L., ed.), str. 84. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 1998.
2. Kudrna K., Šindelářová M.: *Coll. Sci. Pap. (Faculty of Agriculture Č. Budějovice) 18*, 113 (2001).
3. Kudrna K.: *Generální projektování zemědělských soustav*. VŠZ, Praha 1986.
4. Kolář L., Ledvina R.: *III. mezinárodní vědecká konference Agroregion 2000, České Budějovice, 30.8.–1.9.2000* (Vodička J., ed.), str. 221. Jihočeská univerzita, České Budějovice 2000.
5. Ministerstvo zemědělství ČR: *Situační a výhledová zpráva „PŮDA“*. Praha 1999.
6. Kolář L., Gergel J., Ledvina R., Kužel S.: *Farmář 7*, 30 (2001).
7. Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 327/1998 Sb. k zákonu č. 284/1991 Sb. *o pozemkových úpravách* (§8, odst. 8).
8. Ministerstvo zemědělství ČR: *Projekt EP 9397 Národní agentury zemědělského výzkumu*, Praha 1999.
9. Kolář L., Ledvina R., Kužel S., Šindelářová M.: *Coll. Sci. Pap. (Faculty of Agriculture Č. Budějovice) 17*, 47 (2000).
10. Kolář L., Kužel S., Šindelářová M., Ledvina R.: *Coll. Sci. Pap. (Faculty of Agriculture Č. Budějovice) 17*, 53 (2000).
11. Kolář L., Gergel J., Ledvina R., Kužel S., Šindelářová M.: *Rostl. Vyroba 46*, 543 (2000).
12. Kolář L., Gergel J., Ledvina R., Kužel S., Šindelářová M.: *Rostl. Vyroba 46*, 533 (2000).
13. Trávník K., Čermák P., Sušil A.: *Porovnání vývoje agrochemických vlastností půd ČR za období 1990–1992 a 1993–1998*. ÚKZÚZ Brno 1999.
14. Ledvina R., Kolář L., Kužel S., Šindelářová M.: *Coll. Sci. Pap. (Faculty of Agriculture Č. Budějovice) 17*, 65 (2000).
15. Ledvina R., Kolář L.: *III. mezinárodní vědecká konference Agroregion 2000, České Budějovice, 30.8.–1.9.2000* (Vodička J., ed.), str. 235. Jihočeská univerzita, České Budějovice 2000.
16. Körschens M., Schulz E., Böhm R.: *Zentralbl. Mikrobiol. 145*, 305 (1990).
17. Vaněk V., Němeček R., Najmanová J., Mrkvička J.: *Sborník konference Úloha organických hnojiv v současném zemědělství* (Daněk J., ed.), str. 75. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 1997.
18. Balík J., Vaněk V., Pavlíková V., Kolář L.: *Sborník konference Racionální použití průmyslových hnojiv* (Brodský L., ed.) str. 12. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 1998.
19. Kolář L., Ledvina R.: *III. mezinárodní vědecká konference Agroregion 2000, České Budějovice, 30.8.–1.9.2000* (Vodička J., ed.), str. 219. Jihočeská univerzita, České Budějovice 2000.
20. Apfelthaler R.: *Výzkumná zpráva č. 19/94. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně 1994*.
21. Kubát J., Nováková J., Mikanová O., Apfelthaler R.: *Rostl. Vyroba 45*, 389 (1999).
22. Weigel A., Kubát J., Körschens M., Powlson D. S., Mercik S.: *Arch. Acker-Pfl. Boden 43*, 123 (1998).
23. Schulz E.: *Arch. Acker-Pfl. Boden 41*, 465 (1997).
24. Lindsay W. L., Norwell W. A.: *Soil Sci. Soc. Am. J. 42*, 421 (1978).
25. Zbírál J.: *Analýza půd I a II. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 1995*.
26. James B. R., Clark C. J., Riha S. J.: *Soil Sci. Soc. Am. J. 47*, 893 (1983).
27. Vance E. D., Brookes P. C., Jenkinson D. S.: *Soil Biol. Biochem. 19*, 703 (1987).
28. Hendrix P. F., Beare M. H., Cheng W., Parmelee R. W., Coleman D. C., Crossley D. A.: *Intercol. Bull. 15*, 59 (1989).
29. Vokál B.: *III. mezinárodní vědecká konference Agroregion 2000, České Budějovice, 30.8.–1.9.2000* (Vodička J., ed.), str. 5. Jihočeská univerzita, České Budějovice 2000.
30. Kudrna K.: *Zemědělské soustavy*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1985.
31. Kudrna K.: *Zemědělské systémové inženýrství*. Centrum pro zemědělské soustavy, Kladno 1996.
32. Ledvina R., Kolář L., Kužel S., Šindelářová M.: *Proceedings of the 10th International Symposium: Biotechnology 2001, České Budějovice, 25–26 September 2001* (Řehout V., ed.), str. 157. Jihočeská univerzita, České Budějovice 2001.
33. Kratzsch G.: *Arch. Acker-Pfl. Boden 33*, 123 (1995).
34. Kolář L., Kužel S., Ledvina R., Šindelářová M.: *Proceedings of the 10th International Symposium: Biotechnology 2001, České Budějovice, 25–26 September 2001* (Řehout V., ed.), str. 159. Jihočeská univerzita, České Budějovice 2001.
35. Hauer I.: *Biogas im Praxisbetrieb*. ÖKL, Wien 1993.
36. Váňa J.: *Zpracování biomasy travních porostů na bioplyn*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně 1997.
37. Schulz H.: *Biogas – Praxis*. Ökobuch Verlag, Staufen bei Freiburg 1996.
38. Váňa J., Slejška A.: *Bioplyn z rostlinné biomasy*. ÚZPI, Praha 1998.
39. Kužel S., Kolář L., Ledvina R., Horáček J., Šindelářová M.: *Proceedings of the 10th International Symposium: Biotechnology 2001, České Budějovice, 25–26 September 2001* (Řehout V., ed.), str. 161. Jihočeská univerzita, České Budějovice 2001.

40. Kudrna K.: *Koncepce rozvoje regionu Šumava*. Jihočeská univerzita, České Budějovice 2000.
41. Honzík R., Ušák S.: *Sborník 5. konference: Energetické využití biomasy EKO PRAHA 97, 10.–12.6.1997* (Janál R., ed.), str. 4. VUSTE-APIS a Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 1997.
42. Bauer R., Wagner H.: *Echinacea*. Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1990.
43. Hlava B., Valíček P.: *Rostliny proti únavě a stresu*. Zemědělské nakladatelství BRÁZDA, Praha 1992.
44. Grinevitsch M. A.: *Informacionnyj poisk perspektivnykh lekarstvennykh rastěnij*. Nauka, Leningrad 1990.
45. Kodet J., Babor K.: *Modifikované škroby, dextriny a lepidla*. SNTL, Praha 1991.
46. Šindelářová M.: *III. mezinárodní vědecká konference Agroregion 2000, České Budějovice, 30.8.–1.9.2000* (Vodička J., ed.), str. 257. Jihočeská univerzita, České Budějovice 2000.

L. Kolář^a, S. Kužel^a, and J. Gergel^b (^a*Department of General Crop Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*, ^b*Research Institute for Soil and Water Management, České Budějovice*): **Perspec-**

tives of Czech Agriculture in Areas of Lower Productivity and Cooperation of Agriculture with Chemical Research and Industry

The Institute investigated in 1986–1987 the quality of water flowing away from nine small areas, which are parts of the Vltava and Malše catchment areas. Fifteen years later, the quality of running water in the same areas has been re-estimated, using the same methodology of sampling and laboratory tests. The aim of this investigation was to assess the impact of landscape management consisting in extensive grazing, decreasing the cattle density to a half, and the associated radical decrease in perennial fodder crops in crop rotations and the preference of technical crops, in particular rape (*Brassica napus* L.). Regarding the hydrological aspects, the transport of dissolved substances and of all cations and anions has decreased. The nitrate nitrogen fell to 66.3 % and the ammonium nitrogen even to 7.1 % of the previous values. On the contrary, the value of $CHSK_{Mn}$, expressing the proportion of slightly degradable organic substances, has increased. The C/N and N/P ratios increased. The saprobic index has decreased significantly especially in comparable spring periods. Variability has decreased in most cases.

*Zavedená farmaceutická firma
hledá do výzkumného oddělení*

absolventy VŠ – specialisty

na vývoj a validace analytických metod (HPLC, GC, titrace).
Praxe v oboru a znalost AJ nutná.

Žádosti s profesním životopisem zašlete na:
Interpharma Praha, a.s., Komořanská 955, 143 10 Praha 12,
fax: 02/41773235, e-mail: interpharma@interpharma-praha.cz

DEPOZICE A POHYB VYBRANÝCH LÁTEK V LESNÍCH EKOSYSTÉMECH S VAZBOU NA POTRAVNÍ ŘETĚZEC

HANA UHLÍŘOVÁ, VĚRA FADRHOŇSOVÁ,
MILAN BÍBA A VÁCLAV LOCHMAN

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Jíloviště-
-Strnady 136, 156 04 Praha 5
e-mail: uhlirova@vulhm.cz

Došlo dne 2.X.2001

Klíčová slova: depozice bulk, podporostní srážky, ionty vodíku, dusík, síra, těžké kovy, jedlé houby, humus, okyselení půd, vápník a hořčík, ionty hliníku, kvalita odtékající vody

Obsah

1. Úvod
2. Metody studia
3. Výsledky a diskuse
 - 3.1. Depozice
 - 3.2. Ovlivnění půdního chemismu s ohledem na rizikové látky
 - 3.3. Odtékající voda
4. Závěr

1. Úvod

Lesní ekosystém představuje z biologického hlediska společenství nižších organismů, rostlin a živočichů; jeho vývoj je však ovlivňován vnějšími vlivy jak po stránce klimatické, tak i chemické. Jedním z procesů, kterými se člověk podílí na ovlivňování lesních ekosystémů, je zvýšený přínos různých chemických látek z jeho činnosti, tzv. antropogenní ovlivnění zdravotního stavu lesů. Cizorodé látky se do lesů dostávají ve formě plyných sloučenin nebo aerosolů, nebo padají rozpuštěné v dešťových a sněhových srážkách, popřípadě v tuhé formě jako prachové částice.

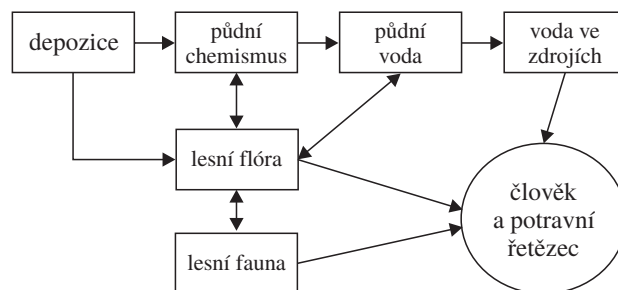
Depozice jsou všechny látky, které se z atmosféry usazují v lesním prostředí. Atmosférická depozice je tvořena mokrou depozicí, kdy jsou částice prachu, aerosoly a plyny „vymývány“ z atmosféry dešťovými či sněhovými srážkami a s nimi deponovány do lesních ekosystémů, a suchou depozicí, kdy pevné částice, oxidy síry a dusíku a aerosoly fluorovodíku a chlorovodíku a dalších sloučenin přímo ulpívají na vlhkém povrchu asimilačního aparátu nebo půdy nebo jsou přijímány listovými průduchy. Suchá depozice převažuje v případech období bez srážek a je větší v oblastech blíže ke zdrojům znečištění, kdy částice přecházejí přímo z nižších vrstev atmosféry na povrch listů, půdy apod. Na větší vzdálenosti jsou přenášeny hlavně střední a malé částice a aerosoly obsahující i plyné oxidy síry a dusíku, které se z oblaků či z vyšších vrstev atmosféry uvolní až se srážkami^{1,2}. Podíl suché depozice na volné ploše je poměrně malý, pro SO_x a NO_x se uvádí 15 %,

pro NH₃ 20 % a 20–30 % pro bazické kationty². Suchá a mokrá depozice na volné ploše tvoří dohromady depozici celkovou, která charakterizuje celkovou úroveň znečištění ovzduší.

V lesních porostech se analyzují tzv. podkorunové srážky, což je srážková voda pronikající korunami stromů. V této vodě jsou obsaženy látky, které se zachytily na povrchu listů nebo jehlic a větvi jako podstatná část suché depozice v porostu a byly srážkovou vodou smyty, a látky, které přicházejí přímo se srážkovou vodou (mokrá depozice), a částečně také látky, které se srážkami vymývají z listů nebo jehlic. Další složkou je stok po kmenech, neboli voda stékající po kmenech na povrch půdy, který je významný např. v porostech buku, jeřábu a břízy.

Chemické složení depozice závisí na několika faktorech – na úrovni znečištění ovzduší, a tím i na vzdálenosti od zdrojů znečištění, na meteorologických podmínkách (převládající proudění vzduchu, výskyt inverzních situací, horizontálních srážek apod.), na přírodních podmínkách (nadmožská výška, s níž souvisí množství srážek, a expozice terénu vůči proudění vzduchu), na charakteristikách lesních porostů (druh dřeviny, věk) a na charakteru vegetačního pokryvu půdy.

V uplynulých desetiletích významně ovlivňovaly lesní ekosystém především imise SO₂, NO_x, HF a prachové částice, v současnosti dominuje vliv NO_x. Je prokázáno, že působení „kyselých imisí“ negativně ovlivňuje lesní půdu a půdní mikroflóru. Změny půdního chemismu mohou způsobit uvolňování některých iontů kovů z jinak pevných komplexů a organických vazeb. Spolu s přímým vstupem těchto látek z depozic se takto zvyšuje i koncentrace jejich přístupných forem v půdě a půdním roztoku často až na hodnoty, které prokazatelně působí v lesním ekosystému toxicky, tzn. že ohrožují jak kořenový systém dřevin, bylinné patro, důležitou půdní mikroflóru, tak i kvalitu odtékající vody. Schematicky jsou tyto vazby znázorněny na obrázku 1. Jednotlivé složky ekosystému jsou proto sledovány i s ohledem na riziko průniku nebezpečných nebo nežádoucích látek do potravního řetězce. Pozornost je věnována zejména obsahu těžkých kovů v půdách a také v houbách a mechu, které jsou považovány za vhodné bioindikátory. K objasnění pohybu těchto látek v ekosystému přispívá i jejich sledování ve vodě srážek (celková depozice), v půdní vodě (nejčastěji pod humusovým horizontem) i ve vodě odtékající z lesního prostředí do vodních zdrojů.



Obr. 1. Vazba procesů v lesních ekosystémech na kvalitu potravního řetězce

Část látek se v ekosystému sorbuje v nezměněné podobě, část je biologicky a chemicky degradována. Podle rozsahu sorpce látek a biochemických změn v organismech může být lesní ekosystém mírně až vážně narušen a jeho narušení se promítne i do ostatních složek životního prostředí. Cílem tohoto článku je poukázat na vliv antropogenní zátěže na určité změny chemismu lesních půd, které nakonec ovlivňují potravní řetězce a kvalitu pitné vody.

2. Metody studia ovlivnění lesních ekosystémů

Metody studia vycházejí z monitoringu zdravotního stavu stromů, chemických změn v půdě, chemických změn v listových orgánech, zjišťování depozice látek v ekosystému a podílu intercepce korun na tomto procesu a ze zjišťování změn chemismu půdní vody a chemismu látek ve vodách odtékajících z lesního prostředí do vodních zdrojů.

Monitoring zdravotního stavu lesa se provádí v celé Evropě v projektu „ICP Forests“ započatém v roce 1986 na základě Úmluvy o dálkovém přenosu látek znečišťujících ovzduší přes hranice států (CLRTAP) jako reakce na neustálé zhoršování zdravotního stavu lesů. Postupy hodnocení jsou předepsány manuálem³. Na plochách intenzivního monitoringu lesních ekosystémů se sledují depozice pod korunami stromů a na volné ploše, v listnatých porostech dále chemismus stoku po kmeni, hlavně u buku. Pohyb a přeměny látek z depozice v lesním ekosystému je možné studovat jako změnu půdního chemismu a hlavně jako změny chemismu půdního roztoku. Složení půdního roztoku je rovněž limitujícím faktorem kvality vody odtékající z lesa do vodních zdrojů.

Na monitoring projektu ICP Forests úzce navazuje Ministerstvem zemědělství ČR garantovaný monitoring látek vstupujících do potravního řetězce, který zahrnuje sběr, analýzu a vyhodnocení toxických a zátěžových prvků v houbách a povrchových vodách odtékajících z lesních ekosystémů do zdrojů pitné vody.

K odběru vzorků srážkové vody na volné ploše byly použity polyethylenové nádoby s kruhovou záchytnou plochou 0,033 m², v porostech byla použita tři koryta z polyethylenu, každé se záchytnou plochou 0,4 m². Voda z nich byla sváděna do zásobních nádob umístěných v zemní sondě, aby byly vzorky chráněny před působením slunečního záření a tepla, hlavně v letním období.

Povrchová voda byla odebírána přímo z drobných vodních toků, pramenů a ostatních vodních zdrojů do plastových vzorkovnic.

Ve vzorcích srážkové a povrchové vody byly stanoveny následující parametry – pH, alkalita, vodivost, kationty Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺, NH₄⁺, Al³⁺, Mn²⁺, Fe³⁺, anionty NO₃⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, F⁻ a z kovů Cu a Zn. Tyto parametry jsou dány manuálem programu ICP Forests³. Hodnoty pH byly stanoveny potenciometricky, alkalita titračně do pH 4,5, NH₄⁺ spektrometricky a anionty (Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, F⁻) metodou iontové chromatografie. Kationty byly stanoveny na optickém emisním spektrometru s indukčně vázanou plazmou s ultrazvukovým zmlžovačem (OES-ICP).

Půdy byly odebírány v souladu s předepsanou metodikou ICP Forests³, odděleně organické horizonty a minerální horizonty. Přístupné kationty v minerálních horizontech byly stanoveny ve výluhu 0,1 M-BaCl₂, kovy v organických horizon-

tech ve výluhu lučavkou královskou, vše ze vzdušnosuchých vzorků a poté přepočítáno na sušinu (105 °C). Plodnice hub byly na místě sběru očištěny a do laboratoře dopraveny v papírových sáčcích. Po rozkrájení nerezovým nožem byly sušeny na plastových sítích sušičky určené pro sušení potravin. As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb a Zn byly stanoveny metodou OES-ICP, Hg analyzátořem na jednocelovém spektrometru AMA 254.

3. Výsledky a diskuse

3.1. Depozice

Vývoj depozice v ČR na plochách intenzivního monitoringu VÜLHM, kde se depozice sledují delší dobu a je možno porovnat dvě oblasti s různou úrovní imisního zatížení, znázorňují obr. 2–7. Experimentální plocha Želivka na okraji Českomoravské vrchoviny (povodí Pekelského potoka) představuje relativně čistou oblast a Moldava v Krušných horách oblast v minulosti silně imisně zatěžovanou s devastovanými lesními porosty. Na ploše Želivka, sledované od roku 1973, byl v sedmdesátých letech zaznamenán nárůst spadu kyselin (iontů H⁺) se srážkami a pokračoval až do první poloviny osmdesátých let, kdy na volné ploše (holé seči) dosahoval 1 kg.ha⁻¹.rok⁻¹ a v dospělém smrkovém porostu 2 kg.ha⁻¹.rok⁻¹. Postupný pokles v dalším období způsobil snížení depozice vodíkových iontů na konci devadesátých let na volné ploše pod 0,1 kg a v porostu smrku na hodnoty okolo 0,1 kg.ha⁻¹.rok⁻¹ (cit.⁴).

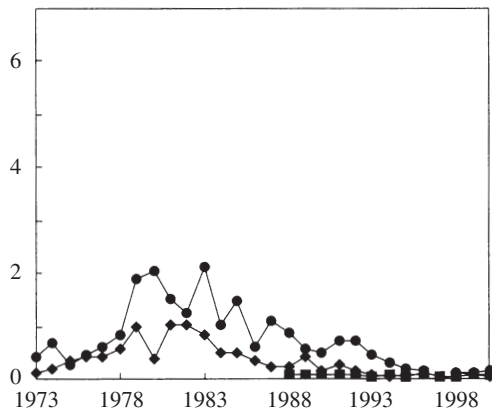
Ve stejných obdobích byl též nejvyšší roční spad SO₄²⁻, na volné ploše až 80 kg.ha⁻¹ a pod porostem >200 kg.ha⁻¹. Koncem devadesátých let a i v současnosti se pohybují roční depozice SO₄²⁻ na volné ploše okolo 20 kg.ha⁻¹ a pod porostem smrku okolo 50 kg.ha⁻¹.

Roční spad dusíku (NO₃⁻ + NH₄⁺) na volné ploše od poloviny osmdesátých let do poloviny devadesátých let překračoval 10 kg a v porostu 30 kg.ha⁻¹. V posledních letech kolísá na volné ploše okolo 10 kg.ha⁻¹ a pod porostem okolo 20 kg.ha⁻¹.

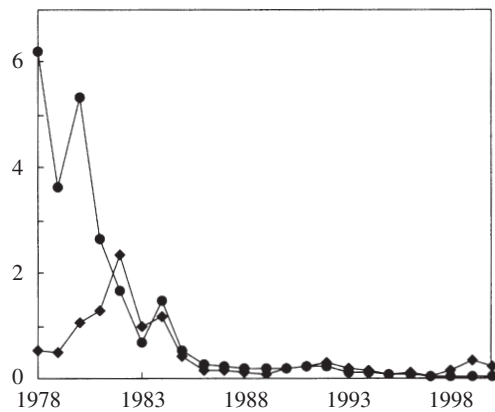
Na plochách Moldava na volné ploše (holé seči) přesahoval spad iontů H⁺ v letech 1981 až 1984 1,5 kg.ha⁻¹.rok⁻¹ a po roce 1990 poklesl na cca 0,2 kg.ha⁻¹.rok⁻¹. Největší depozice SO₄²⁻ na volné ploše byla zjištěna v letech 1981–1984 v množství >80 kg.ha⁻¹.rok⁻¹ a na konci devadesátých let poklesla na <40 kg.ha⁻¹.rok⁻¹. Rovněž spad dusíku (NO₃⁻ + NH₄⁺) se ve stejném období snížil z 15–20 kg na <10 kg.ha⁻¹.rok⁻¹.

V porostu smrku na Moldavě dosahoval v letech 1978–1980 roční spad kyselin více než 5 kg.ha⁻¹. Po smýcení porostu na seči (volné ploše) poklesl na úroveň volné plochy. Vývoj porostu jeřábu depozici vodíkových iontů nezvýšil, a ta je spíše nižší než na volné ploše. Roční spad SO₄²⁻ dosahoval v porostu smrku okolo 400 kg.ha⁻¹, koncem devadesátých let a v posledních letech je v porostu jeřábu nižší než 50 kg.ha⁻¹. Vysoká depozice dusíku (NO₃⁻ + NH₄⁺) v porostu smrku 40 kg.ha⁻¹.rok⁻¹ v letech 1978–1980 po jeho smýcení poklesla a od poloviny devadesátých let se v jeřábu pohybuje v rozmezí 10 až 20 kg.ha⁻¹.rok⁻¹ (cit.^{5,6}).

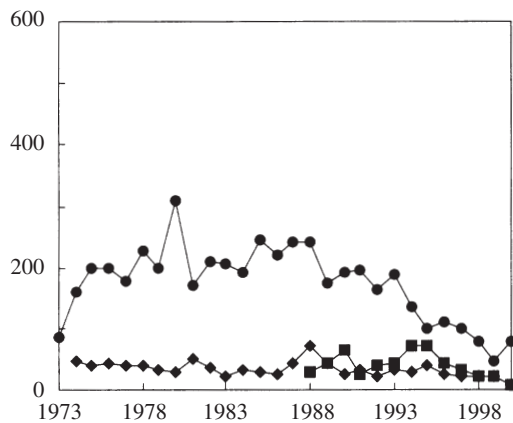
Hodnoty pH srážkové vody na Želivce se pohybovaly v letech 1973–78 v rozmezí 3,95–4,50 na volné ploše a 3,55–4,51 v porostu, nejnižší byly v období 1979–85 (mezi 3,80–4,35 na seči a 3,15–3,45 v porostu). Od poloviny 80. let dochází



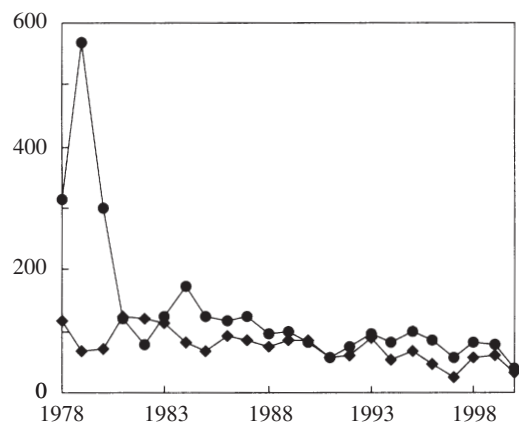
Obr. 2. Celková depozice vodíkových iontů na plochách Želivka ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$); ● smrkový porost, ◆ seč, ■ bukový porost



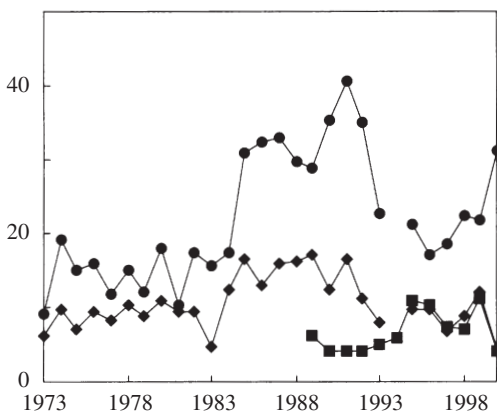
Obr. 3. Celková depozice vodíkových iontů na plochách Moldava ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$); ● porost, ◆ seč



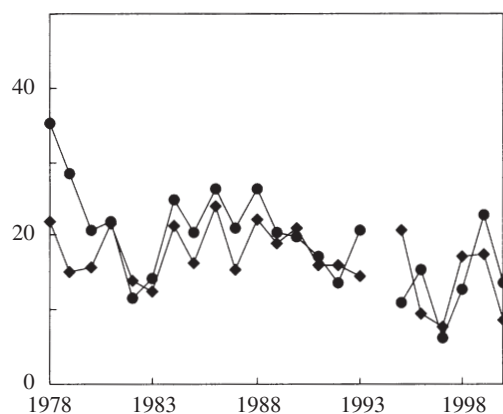
Obr. 4. Celková depozice síranů (SO_4^{2-}) na plochách Želivka ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$); ● smrkový porost, ◆ seč, ■ bukový porost



Obr. 5. Celková depozice síranů (SO_4^{2-}) na plochách Moldava ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$); ● porost, ◆ seč



Obr. 6. Celková depozice dusíku ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) na plochách Želivka ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$); ● smrkový porost, ◆ seč, ■ bukový porost



Obr. 7. Celková depozice dusíku ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) na plochách Moldava ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$); ● porost, ◆ seč

k nárůstu a v letech 1986–93 se hodnoty pH pohybovaly v porostu mezi 3,35–3,90 a na seči 4,15–4,85; v období 1994–2000 mezi 4,14–4,80 v porostu a 4,56–5,19 na seči. V roce 2001 byly hodnoty pH v porostu 4,61 a na seči 4,90. Na Moldavě byly hodnoty pH nejnižší v porostu smrku v letech

1978–80 (3,25–3,35), po smýcení se zvýšily na 3,60–4,20 v období 1981–84. Později se začal projevovat vliv narůstajícího jeřábu, hodnoty pH se v období 1985–94 pohybovaly mezi 4,05–4,95 a v období 1995–2000 mezi 5,10–5,42. Na volné ploše byly hodnoty pH v období 1978–80 mezi 4,05–

4,30, nejnižší pak byly v letech 1981–84 (3,70–4,05). Poté dochází ke snižování kyselosti srážkové vody, v období 1985–94 se pH pohybuje mezi 4,05–4,85 a v období 1995–2000 mezi 4,49–5,45. V roce 2001 byly hodnoty pH v porostu jeřábu 4,67 a na volné ploše 4,76.

Na ploše Želivka je patrné mírné zpoždění poklesu hodnot na přelomu osmdesátých a devadesátých let ve srovnání s oblastí intenzivně imisně zatěžovanou (Krušné hory-Moldava). Obdobný trend je vidět také z vývoje hodnot pH srážkové vody – pokles pH na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let a od počátku devadesátých let postupné snižování kyselosti srážkové vody. Depozice dusíku neklesá, na Želivce je po poklesu během osmdesátých let trend v posledním období spíše opačný. Také na Moldavě dochází v posledních letech k mírnému nárůstu. Vlivem vyšších srážkových úhrnů dosahuje spad dusíku ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) s podkorunovými srážkami v dospělých (starších) smrkových lesích horských poloh 20 a více $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$ (cit.^{7,8}).

Mezi toxické prvky vstupující do lesního prostředí patří těžké kovy (zejména Cd, Hg a Pb, ale i řada dalších z toxikologického hlediska pro lesní ekosystémy méně významných prvků jako např. As, Cu, Ni, Cr a Zn), které pocházejí jak ze zdrojů přírodního původu (zvětrávání minerálů, sopečná činnost apod.), tak z průmyslových výrob a mobilních zdrojů. Jako přenosová média vystupují vzduch a voda. Zejména v atmosféře mohou být pevné částice aerosolů i plynné organokovové sloučeniny přenášeny na velké vzdálenosti. Závažným aspektem emisí těžkých kovů je poměr jejich přírodního a antropogenního původu⁹.

Na imisích se podílí významnou měrou i dálkový přenos ze zahraničí¹⁰. Údajů o depozici těžkých kovů do lesních ekosystémů v České republice je celá řada^{11–14}, méně je známo o jejich dalším osudu.

Depozice těžkých kovů se vzhledem k nízkým koncentracím ve srážkové vodě sledují lépe pomocí vhodných bioindikátorů. Ve srážkových vodách se relativně přesně analyzují jen prvky, které se vyskytují ve vyšších koncentracích, viz tabulky I a II. Nejdleší pozorování je k dispozici na ploše Želivka, kde je patrná vyšší depozice kovů pod smrkovým porostem než na volné ploše a její pokles zejména pod porostem smrku v druhé polovině devadesátých let (pokles suchého spadu).

Pro těžké kovy se ukázaly nejvhodnějšími bioindikátory epifytické mechy^{12,13,15}, některé lišejníky a plodnice hub^{16,17}. Těžké kovy byly nalezeny také ve vnitřních orgánech i ve svalovině volně žijící zvěře – bažanti, prase divoké, daněk, jelen, liška, kuna, srnec, zajíc a další^{18,19}.

Při řešení úkolu Ministerstva zemědělství ČR „Monitoring cizorodých látek v lesních ekosystémech s vazbou na potravní řetězec“ byly v letech 1997–2000 sbírány plodnice jedlých druhů hub na vybraných plochách monitoringu projektu ICP Forests a v několika dalších lokalitách v hojně navštěvovaných rekreačních oblastech. Vyhodnocení obsahu rizikových elementů bylo porovnáno s hygienickými limity²⁰. Ukázalo se, že některé prvky výjimečně vykazují i nadlimitní obsahy (tabulka III). Plochy monitoringu jsou vždy součástí většího komplexu lesa, kde je omezena nebo i vyloučena doprava, která by obsah některých kovů (např. Cd a Pb) mohla významně ovlivnit. Obsah analytů v houbách z těchto ploch tak představuje převážně zátěž z dálkového přenosu a významných lokálních zdrojů.

Tabulka I

Roční depozice vybraných kovů na volné ploše Želivka ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$)

Období	Al	Cu	Fe	Mn	Zn
1973–77	–	–	0,239	0,212	0,545
1978–80	2,202	–	0,136	0,244	0,608
1981–85	1,277	–	0,153	0,190	0,677
1986–90	1,571	–	0,210	0,303	0,509
1991–95	0,821	–	0,120	0,186	0,274
1996–2000	0,153	0,028	0,103	0,241	0,255

Tabulka II

Roční depozice vybraných kovů ve starším porostu smrku na ploše Želivka ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{rok}^{-1}$)

Období	Al	Cu	Fe	Mn	Zn
1973–77	–	–	0,680	3,822	1,263
1978–80	3,001	–	1,059	5,869	1,606
1981–85	3,223	–	0,889	6,760	0,815
1986–90	3,550	–	0,773	4,179	0,960
1991–95	2,036	–	0,616	4,964	0,711
1996–2000	0,675	0,024	0,266	3,896	0,460

Tabulka III

Četnost překračování limitu pro těžké kovy v sušině hub (vyjádřeno v % celkového počtu vzorků)

Rok	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn	Počet vzorků
1998	0,0	8,0	0,0	0,0	8,0	0,0	1,0	0,0	136
1999	2,3	3,6	0,0	0,0	39,2	0,0	0,0	0,0	167
2000	2,4	11,2	0,0	0,0	33,5	0,0	0,8	0,0	251

Zmíněná vyhláška uvádí limity speciálně pro houby v přírodním stavu jen pro Cd, Hg a Pb. Pro ostatní prvky se užívají limity, které platí pro potraviny typu B (potravinové doplňky), kam se houby zařazují. Většina druhů čerstvých hub obsahuje až 90 % vody, takže koncentrace jednotlivých elementů v čerstvých houbách je na rozdíl od hodnot v sušině téměř desetkrát nižší. Za nebezpečné pro lidské zdraví můžeme tedy považovat jen ty vzorky hub, kde byl limit překročen více jak desetinásobně. Nejčtenější jsou případy překračování limitu pro suché houby u rtuti.

Vlivu těžkých kovů na lesní ekosystémy věnovali pozornost Augustin a Andreae²¹ ve své studii o kauzálních jevech a interakcích v lesním prostředí. Tento materiál navazuje na podrobnější studii zpracovanou rovněž pro projekt ICP Forests²². Z poznatků shrnutých v obou studiích vyplývá, že toxicita těžkých kovů velmi závisí na druhu organismu, na vlastnostech jednotlivých elementů, na způsobu příjmu a ještě na řadě dalších faktorů. Také mechanismy toxicity jednotlivých kovů se liší. Toxické koncentrace kovů bývají často

odvozovány od fyziologických poruch, jako je ovlivnění růstu, transpirace a alokace uhlíku. Mechanismus účinku souvisí s interakcí kovů s enzymy a se strukturálními změnami buněčných membrán. Organismy vystavené zvýšeným hladinám těžkých kovů se mohou buď vyhnout jejich příjmu, a tím i jejich stresovému působení, nebo je přijímat a postupně si na stres přivyknout. Cesty příjmu a odmítnutí mohou být následující²¹:

- aktivní výměna v rhizosféře,
- vazba kovů na vnitřní povrchy mykorrhizních hub a kořenových buněk,
- detoxifikace speciálními chelatačními agens nebo komplexem organických kyselin,
- zabránění přístupu vnějšími mykorrhizními vlákny nebo v kořenových appoplastech,
- distribuce xylemem (možná i floemem) k místu uskladnění a případně vyloučení.

Přímá adsorpce povrchem listů nebo jehličí je pro Cd zanedbatelná, pro Zn nízká a pro Pb vysoká.

U většiny sbíraných druhů hub tvoří hmotnost klobouků několiknásobek hmotnosti třenů, takže je možné tvrdit, že se na celkovém obsahu měřených prvků podílejí hlavně klobouky. U plodnic bedly vysoké a muchomůrky růžovky byla prokázána nejvyšší sorpce z prostředí u As, Cu, Pb a druhá nejvyšší sorpce u Hg a Zn. Důvodem nejvyššího příjmu je pravděpodobně velká plocha klobouku starších plodnic, které byly při sběru všech druhů upřednostňovány. Plocha i povrch klobouku muchomůrky růžovky jsou srovnatelné s plochou bedly vysoké a také poréznost klobouku je podobná. Další faktor, který sorpci významně ovlivňuje, je stanoviště. Na okrajích porostů a v proředěných porostech je přímá depozice některých kovů do půdy, a tím i na plodnice hub, vyšší než v zapojených porostech.

Na kvalitu podkorunových srážek má velký vliv druhová skladba porostu a jeho stáří. V listnatých porostech je depozice kyselých látek obecně nižší než v jehličnatých, protože listnáče jsou podstatnou část roku bez listů a v době olistění mají jednak menší zachytanou listovou plochu, jednak koruny vykazují vyšší schopnost tlumit protony výměnou za bazické kationty²³. Ve smrkových porostech je srážková voda pronikající korunami obohacována kyselými anoly ze suché depozice více než např. v porostech borových²⁴.

3.2. Ovlivnění půdního chemismu s ohledem na rizikové látky

Pod korunami stromů po smyvu srážkovou vodou dopadají na povrch půdy voda často mnohem více znečištěná než na volné ploše. Povrch asimilačního aparátu je v případě lesa 10–20 násobkem povrchu půdy bez vegetace²⁵. Lesní půdy jsou acidifikací ohroženy podstatně více než půdy zemědělské, a to nejen díky větší zachytané ploše (povrchu vegetace), ale také proto, že kyselá depozice může být v případě zemědělské půdy kompenzována a upravována agrotechnickými zásahy.

V posledních letech se často poukazuje na „degradaci“ lesních půd v rámci celé ČR. Tento pojem skrývá řadu chemických reakcí spojených s dlouhodobým okyselováním půd. Klíma²⁶ udává snížení hodnot pH svrchních organominerálních horizontů o 0,7 jednotek v regionu Moravskoslezských Beskyd v období 1950–1983. Dlouhodobější interval porovnání obsahu je tabulka IV. Z rozmezí udávaných hodnot je

Tabulka IV

Porovnání rozsahu hodnot půdní reakce napříč ČR mezi roky 1926 a 1995

Rok	Jehličnaté porosty		Listnaté porosty		Počet vzorků půd organo-minerální horizont A
	pH aktivní	výměnné	pH aktivní	výměnné	
1926	4,4–6,9	–	4,8–7,0	–	97 (cit. ²⁷)
1991	3,2–5,1	2,8–4,4	3,5–6,9	3,0–6,5	207
1995	3,5–4,7	2,9–4,1	–	–	108

Tabulka V

Rozložení dat do tříd pro výměnné pH (CaCl₂) a procento nasycení bázemi v organo-minerálních horizontech A všech typů půd (počet měření 107)

Třída	pH ^a		% nasycení bázemi ^a	
Nízká	<3,5	(32,7)	<10	(48,5)
Střední	3,5–4,5	(67,3)	10–22	(42,1)
Vysoká	>4,5	(0,0)	>25	(12,1)

^a Četnost pozorování v % je uvedena v závorkách

patrné snížení pH nejméně o 1 jednotku. Je však třeba dodat, že se nejedná o totožné porosty.

Tvorba slabých kyselin je přirozeným výsledkem chemických procesů v půdě, zejména při rozkladu organické hmoty. Tento proces je však velmi pomalý, v případě bazických půd je v rovnováze se zvětráváním matečné horniny a je v podstatě zanedbatelný. Acidifikací jsou ohroženy především přirozeně kyselé půdy v horských oblastech (horské smrčiny). Kyselou depozicí se do půd dostávají silné kyseliny, acidifikace probíhá rychle a je spojena s nárůstem koncentrace H⁺ v půdním roztoku a snížením koncentrací přístupných bazických živin v půdním sorpčním komplexu, hlavně Mg, Ca, K. Uvolněné bazické prvky jsou vymývány buď do hlubších vrstev půdy, kde jsou již pro kořeny nedostupné, nebo jsou odnášeny s odtékající vodou. U silně kyselých a chudých půd není možné tlumení iontů H⁺ vytěšňováním bazických kationtů ze sorpčního komplexu, proto dochází k uvolňování iontů Al³⁺, které jsou ve větší míře pro kořeny toxické²⁸. Uvolněné ionty Al³⁺ odcházejí potom do povrchových zdrojů pitné vody.

Jak bylo výše zmíněno, nebezpečí pro lesní půdy představuje v posledních letech především zvýšená depozice dusíku^{7,8}. Průměrná spotřeba dusíku z depozice se v lesních ekosystémech pohybuje okolo 10 kg·ha⁻¹·rok⁻¹. Množství závisí na stanovištních a porostních poměrech. Přibližně polovina dusíku, a ve znečištěných oblastech i více, přichází v amonné formě. Ionty NH₄⁺ jsou v půdě z části nitrifikovány a při tomto procesu jsou do půdního prostředí uvolňovány ionty H⁺ (cit.²⁹). Dochází-li k vymývání vzniklých iontů NO₃⁻ odtékající vodou do zdrojů, potom tyto změny přispívají k acidifikaci půdy a větší kontaminaci vody povrchových zdrojů nitráty. Proto také zdroje v horských lesích, kde jsou vyšší srážky a větší promyvnost půd, mají i vyšší koncentrace NO₃⁻ než zdroje v lesích nižších vegetačních stupňů. Větší schopnost

odčerpávat dusičnany z půdního roztoku mají listnaté porosty než jehličnany (prokázáno hlavně pro smrk)^{23,30}.

V lesích České republiky, kde převažují smrkové porosty, je vážným problémem další okyselování v důsledku stále vysoké depozice dusíku. Tabulka V shrnuje výsledky monitoringu půd projektu ICP Forests z roku 1995, ze kterých je patrné relativně vysoké zastoupení, tj. 32,7 % kyselých půd (organo-minerálního horizontu A) ve smrkových porostech a ještě vyšší zastoupení – 45,8 % půd s nízkým procentem nasycení tohoto horizontu bazickými kationty – Ca, K, Mg (cit.¹⁷).

Míru acidifikace ovlivňuje úroveň depozice (množství kyselých látek vstupujících do půdy), charakter matečné (podložní) horniny jako potenciálního zdroje bazických iontů a kvalita opadu, který spolu s podmínkami mikroklimatu působí na biologickou činnost půdních mikroorganismů, a ovlivňuje tak procesy humifikace a mineralizace. Dalším faktorem je i stupeň promyvnosti půdy a rozvoj přízemní vegetace, která odčerpává hlavně sloučeniny dusíku, a snižuje tak jejich vymývání. Nepříznivé formy humusu s vysokou akumulací organického materiálu, které se pomalu rozkládají (např. ve smrkových porostech), blokují bazické kationty přijaté stromy během růstu, tzn. že zaostává biologický koloběh.

Monitoring lesních půd v letech 1995/96 byl zaměřen i na stanovení těžkých kovů v organických horizontech. Stručný přehled o výskytu těžkých kovů udává tabulka VI. U téměř 29 % hodnocených ploch byla zjištěna vysoká akumulace Pb a u 69 % hodnocených stanovišť vysoká akumulace Cu. Na větším počtu ploch byly nalezeny i vyšší koncentrace As a Hg, pro které zatím chybí kritéria určení toxicity v lesním půdním prostředí.

Více než 30 % stanovišť vykazuje velmi nízké pH v rhizosféře, a tak se zvyšuje nebezpečí uvolňování pro kořeny toxických kovových iontů. Zjištěné těžké kovy jsou však organicky vázány a nemusí vždy představovat pro rostliny přímé nebezpečí. Tato „zásoba“ se stává nebezpečnou až při vytvoření podmínek, kdy se z organických vazeb uvolňují a stávají se v iontové podobě „dostupnými“ pro rostliny, půdní mikroflóru a mikrofaunu. Kovy „dostupnými“ pro rostliny jsou především kovové ionty v půdním roztoku, dále kovové ionty vázané na půdní koloidy, např. výměnný komplex. Dostupnost těžkých kovů závisí velkou měrou na půdních podmínkách, jako je pH, redox potenciál a množství a typ jílu a organické hmoty. Obecně platí, že dostupnost kovů v půdě se zvyšuje spolu s klesající hodnotou pH. Nejnížší koncentrace v půdních roztocích, při nichž byl zaznamenán vliv na pěstované kultury, byly tyto (v $\mu\text{g.l}^{-1}$): 20 pro Cd, 20–30 pro Cu, 100–200 pro Pb a 200–300 pro Zn. Pb, stejně jako Cr a Cu z půdních roztoků jsou obvykle přítomné jako organokovové komplexy; o těch je známo, že jsou pro rostliny s cévními svazky méně toxické než volné ionty³¹. Relativní toxicita v ekvimolárních koncentracích jednotlivých kovů v roztocích pro pěstování kultur se snižuje v tomto pořadí $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{methylrtuť}) > \text{Hg} > \text{Cd} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Zn}$ (cit.³²).

Těžké kovy mohou inhibovat rozvoj mykorrhizních hub a interakce mezi houbami a rostlinou, což může vést k nedostatečnému příjmu živin, kořenovým onemocněním a stresu statech. Některé mykorrhizní houby však mají vysokou kapacitu pro ochranu hostitelské rostliny před zvýšeným příjmem těžkých kovů. Právě s mykorrhizou souvisí zvýšená citlivost bylin a listnatých dřevin ke kontaminaci těžkými kovy ve srovnání s jehličnany s jejich více rozvinutou metal-tolerantní

Tabulka VI

Rozložení dat do tříd pro obsah těžkých kovů v organických horizontech lesních půd ČR. Zdroj projektu ICP Forests, VÚLHM 1996 (počet měření 108). Kritéria rozdělení podle Tylera³¹

Třída	Pb ^a [mg.kg ⁻¹]	Cd ^a [mg.kg ⁻¹]	Cu ^a [mg.kg ⁻¹]	Zn ^a [mg.kg ⁻¹]
Nízká ^a	<15 (0,0)	<0,35 (88,9)	<5 (0,0)	<35 (2,8)
Střední	15–150 (71,3)	0,35–3,5 (10,2)	5–20 (31,5)	35–300 (96,3)
Vysoká	>150 (28,7)	>3,5 (0,9)	>20 (68,5)	>300 (0,9)

^a Četnost pozorování v % je uvedena v závorkách ^b dvojnásobné pozadí

ektomykorrhizou. Účinky těžkých kovů se velmi liší mezi různými typy mykorrhizy. Kořeny citlivějších druhů dřevin a bylin mohou být inhibovány už při koncentracích 45 mg Zn a 19–34 mg Cu v kg půdy, tyto prvky jsou jako esenciální při příjmu upřednostňovány.

Přijaté kovy jsou ve dřevinách nejčastěji deponovány v kořenech a kmeni. Některé rostliny mohou akumulovat vysoké koncentrace, aniž by vykazovaly jakékoliv symptomy poškození, např. *Sambucus*, *Vaccinium spp.*, *Populus tremula* a další.

3.3. Odtékající voda

Chemické složení půdního roztoku má vliv na výživu lesních dřevin a vytváří prostředí pro jejich kořeny. Při průniku humusovým horizontem se obecně zvyšují koncentrace iontů H^+ a NH_4^+ a dalších biogenních prvků (K, Mg, Ca, P, Fe). Při spotřebě iontů H^+ v minerální půdě (rhizosféře) dochází k vytěsňování bazických kationtů. Při nedostatku bazických kationtů v sorpčním komplexu a současném okyselování půdního prostředí se do půdního roztoku uvolňují koncentrace Al^{3+} a v půdě se mohou tvořit komplexní sloučeniny SO_4^{2-} s hliníkem^{33,34}. Zatímco ještě v osmdesátých letech 20. století se koncentrace SO_4^{2-} v půdní vodě díky této vazbě snižovaly, v současnosti se i přes výrazný pokles depozice síry koncentrace síranů na mnoha místech ve vodě zdrojů zvyšují.

Nárůst koncentrací SO_4^{2-} ve vodě zdrojů imisemi zasažených oblastí po poklesu depozice sloučenin síry^{5,8} je vysvětlován jejich postupným uvolňováním z komplexních reverzibilních sloučenin hliníku s SO_4^{2-} v půdním prostředí, které vznikly v předchozím období^{33,34}. Tyto sloučeniny se akumulovaly především v hlubších půdních horizontech a minimálně ovlivňují přízemní vegetaci. Na povodích, kde převažuje přímý odtok srážkové vody do zdrojů a v minulosti nebyly vytvořeny podmínky pro tvorbu komplexních sloučenin SO_4^{2-} s oxidy hliníku (např. Šumavská jezera) nebo neprobíhá jejich rozpad, sleduje pokles koncentrací síranů ve vodě zdrojů snížení jejich spadu.

Vlastnosti půdního prostředí a v něm obsaženého půdního roztoku mají rovněž významný vliv na chemické složení vodních zdrojů. Voda těchto zdrojů je tvořena zpočátku převážně vodou podpovrchovou, vyvěrající ve formě pramenů, pramenních vývěřů a v lesních porostech častých pramenišť (lesní typy kategorie V). Po soustředění do drobných vodních toků je doplňována vodou z povrchového odtoku, který je

přímo závislý na výši a časovém i prostorovém rozložení srážek.

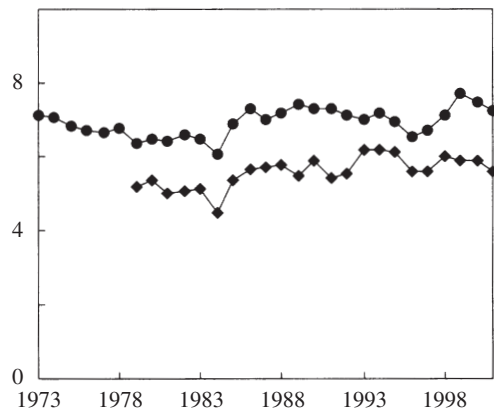
Antropicky podmíněné změny chemismu jednotlivých půdních profilů, kterými voda v průběhu podzemního a podzemního odtoku prochází, mají spolu s přímým vlivem depozic a transportem látek z povrchového odtoku odraz i v koncentraci jednotlivých sloučenin ve vodě. Chemické složení vody odtékající z lesnatých povodí je významné jak z hlediska jejího přímého využívání jako složky potravního řetězce, tak i z hlediska příznivého vlivu na prostředí vodních biocenóz a celospolečenského využití vodních zdrojů (závlahy, rekreační využití aj.).

Chemické složení odtékající vody na různých dlouhodobějších výzkumných plochách VÚLHM je sledováno spolu s monitoringem depozic a půd již celou řadu let. Při hodnocení vývoje chemismu vody povrchových zdrojů v horských zalesněných povodích je zřejmý nárůst průměrných hodnot pH počátkem devadesátých let oproti hodnotám stanoveným v osmdesátých letech. V dalším období podléhalo pH vody zdrojů výkyvům ovlivněným průtokem. Vyšší srážkové úhrny a povodňové situace zvyšují přímý (povrchový) odtok srážkové vody a snižují možnost spotřeby iontů H^+ v půdě a zvětralínovém plášti. Největší výkyv byl patrný na povodí s minerálně chudými půdami a podloží v zimě roku 1995/96.

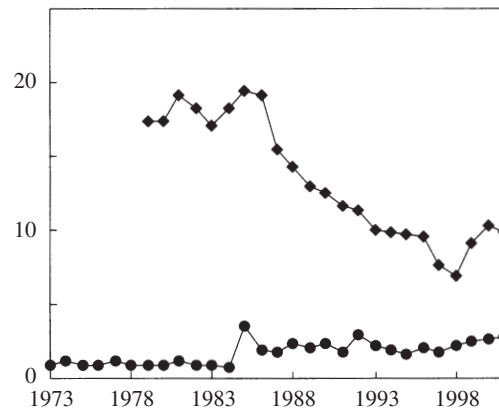
Na horských zalesněných povodích se v devadesátých letech také snižovaly koncentrace NO_3^- jako důsledek snížení depozice dusíku do lesních ekosystémů. Tento pokles v povrchových zdrojích se v druhé polovině devadesátých let téměř zastavil. Pokles koncentrace NO_3^- v posledním desetiletí se netýká zdrojů na objektu Želivka, kde je patrný spíše nárůst (průměrné roční koncentrace se pohybují v rozmezí 2–3 $mg.l^{-1}$). Lesní ekosystémy sledovaných povodí jsou schopny zadržet ročně 10 $kg.ha^{-1}$ dusíku přicházejícího se srážkami.

Během devadesátých let se projevil nejednotný trend ve vývoji koncentrací SO_4^{2-} ve vodách sledovaných povrchových zdrojů. V Beskydech se zejména na povodích se smýčecnými a obnovnými porosty koncentrace síranů snižovala na méně než 20 $mg.l^{-1}$. Na povodí U vodárny v Jeseníkách a v oblasti Šerlichu v Orlických horách se koncentrace SO_4^{2-} naopak zvyšovaly. Na Moldavě v Krušných horách v povodí s náhradními dřevinami vysazenými po smýcení porostů smrku na počátku osmdesátých let ve vodě pramene narůstaly koncentrace SO_4^{2-} až na $>20 mg.l^{-1}$ a v současné době mírně klesají. Ve vodě potoka v objektu Želivka je pozorován nárůst koncentrace síranů (obrázky 8–10). Na povodí Zdíkov (Šumava) a především na objektu Vojňov u Jindřichova Hradce se zřetelně projevil zvýšený spád iontů H^+ a SO_4^{2-} v zimě 1995/1996 poklesem pH a nárůstem síranů ve vodě. Tyto výkyvy doznivaly i v dalších letech a byly spojeny se zvýšenými koncentracemi hliníku³⁵.

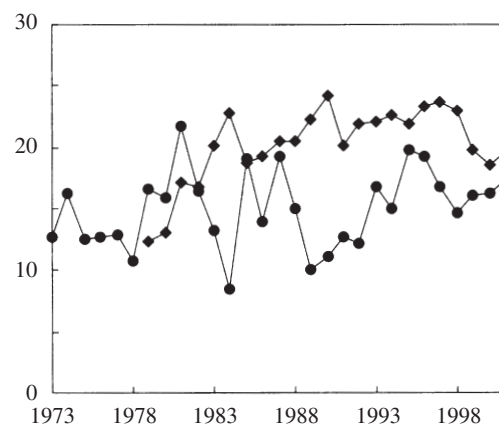
V průběhu let 2000–2001 proběhlo orientační šetření drobných vodních toků a pramenů ve většině z 41 lesních oblastí České republiky v rozsahu 150 vzorků. Cílem bylo posoudit jakost vody odtékající z lesních ekosystémů jako potenciálního zdroje vody pro další využití v krajině i v urbanizovaném prostoru. Tedy mimo jiné rovněž jako potenciální zdroj pitné vody v případech níže ležících vodárenských odběrů. Základem hodnocení jsou vybrané ukazatele dle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 376/2000 Sb. (cit.³⁶) z hlediska chemického složení vody. Nebyly hodnoceny fyzikální, biologické a mikrobiologické ukazatele.



Obr. 8. Vývoj hodnot pH vody odtékající z lesních porostů do zdrojů pitné vody; ● Želivka – potok, ◆ Moldava – pramen



Obr. 9. Vývoj koncentrací dusičnanů (NO_3^-) ve vodě odtékající z lesů do zdrojů pitné vody ($mg.l^{-1}$); ● Želivka – potok, ◆ Moldava – pramen



Obr. 10. Vývoj koncentrací síranů (SO_4^{2-}) ve vodě odtékající z lesů do zdrojů pitné vody ($mg.l^{-1}$); ● Želivka – potok, ◆ Moldava – pramen

Z hlediska acidity vody leželo 78,7 % vzorků v rozpětí normovaných hodnot pH 6,5–9,5 pro pitnou a povrchovou vodu vodárenských zdrojů, u 21,3 % vzorků bylo zjištěno pH

nižší než 6,5 (minimální hodnota pH 3,83). Jako závažné riziko je nutno hodnotit výskyt nízkých hodnot pH, které v mnoha případech navíc korespondují s vysokým obsahem hliníku. Jak již bylo uvedeno, hliník je uvolňován z půdního prostředí právě v důsledku okyselení a rozkladu komplexních sloučenin. Z pohledu kyselosti byly nejkritičtější lesní oblasti Jizerské hory (83 % vzorků s pH nižším než 6,5), Krkonoše a Krušné hory. U 59,4 % vzorků s pH nižším než 6,5 byla zároveň překročena mezní hodnota pro obsah hliníku ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$). Celkem byla mezní hodnota překročena u 14 % vzorků.

Z dalších prvků bylo již v mnohem menší míře zjištěno překročení normovaných ukazatelů u železa (18,7 %), hodnoty mědi, zinku, fluoridů, ani síranů nepřekročily ukazatele vyhl. 376/2000 Sb. v žádném případě. Koncentrace rtuti byla zjišťována v roce 2000 na omezeném souboru 44 lokalit. Ve všech případech byly výsledky negativní – koncentrace pod mezí detekce použité metody stanovení, tedy menší než $0,05 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$. Přesto jde o velmi významný údaj, neboť u analyzovaných vzorků hub bylo naproti tomu překročení obsahu rtuti zaznamenáno v řadě případů.

Koncentrace dusičnanů (NO_3^-) byly v odebraných vzorcích poměrně nízké. Mezní hodnota 50 mg.l^{-1} pro pitnou vodu nebyla překročena v žádném případě a dříve uváděná doporučená hodnota 15 mg.l^{-1} (pro kojeneckou vodu) byla překročena pouze v 9 % všech vzorků. Koncentrace amoniakálního dusíku (NH_4^+) byly rovněž nízké (průměr $0,093 \text{ mg.l}^{-1}$) a překročení mezní hodnoty $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ nebylo zaznamenáno.

V jednom případě bylo zjištěno překročení mezní hodnoty pro chloridy, celkový průměr je ale velmi nízký. Rovněž velmi nízké byly obsahy fosforu, zvýšené koncentrace byly zaznamenány pouze v lokalitách, kde je možné určité ovlivnění splachem ze zemědělských půd.

Specifickými prvky jsou z hlediska prováděného hodnocení hořčík a vápník. U hořčíku uvádí vyhláška doporučenou koncentraci nad 10 mg.l^{-1} a u vápníku doporučenou koncentraci nad 30 mg.l^{-1} . Zjištěné hodnoty u hořčíku jsou ale velmi nízké. Průměrná hodnota skutečně zjištěných koncentrací je pouze $6,9 \text{ mg.l}^{-1}$, nedosahuje tedy ani minimální doporučené hodnoty. Celkem 78 % vzorků má koncentraci Mg menší než doporučených 10 mg.l^{-1} . Ze zdravotního hlediska proto může být problémem spíše nedostatečný obsah tohoto prvku, deficitního ve výživě rostlin a zřejmě i člověka. Nejnižší průměrné koncentrace vykazují lesní oblasti Krkonoše, jihočeská pánev, Novohradské hory a Šumava. Průměrný obsah vápníku ve vzorcích byl $25,9 \text{ mg.l}^{-1}$. Hodnoty nedosahující doporučených 30 mg.l^{-1} byly zjištěny v 60,7 % vzorků, převážně v lesních oblastech pohraničních pohoří. Zde jde největší měrou stejně jako u hořčíku o vliv nízkého obsahu těchto prvků ve složení minerálního podloží a půd.

4. Závěr

Přírozně kyselé lesní půdy v ČR jsou ohroženy další acidifikací vlivem neustávající depozice kyselínovorných látek, i když současné depozice již nedosahují vysokých hodnot zaznamenaných v 80. letech minulého století. Spektrum depozic se v posledním desetiletí mění spíše ve prospěch dusíkatých látek oproti sirnatým, ale celkové zatížení půdy protony se výrazně nemění. Současná depozice těžkých kovů neznamená závažné riziko pro potravní řetězec, pouze u rtuti byla

zjištěna riziková akumulace v plodnicích jedlých hub. Acidifikace půd znamená neustálé nebezpečí uvolňování toxických iontů z půdního prostředí do půdního roztoku a jejich koloběh v lesním ekosystému a odtok do zdrojů pitné vody. Voda odtékající do zdrojů pitné vody je často kyselá s vyšším obsahem hliníku a chudá na hořčík, který je spolu s vápníkem z lesních půd již do značné míry vyplaven.

LITERATURA

1. Šantroch J.: *Vyhodnocení měření kvality ovzduší a srážek na regionálních stanicích za rok 1982–1984* (závěrečná zpráva). ČHMÚ, Praha 1985.
2. De Vries W., Reinds G. J., Deelstra H. D., Klap J. M., Vel E. M.: *Intensive Monitoring of Forest Ecosystems in Europe* (Technical report 1999), str. 173. Brussels, Geneva 1999.
3. *Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests* (PCCW-BFH, ed.). UN/ECE-CLRTAP, Hamburg 1998.
4. Lochman V.: *Lesnictví – Forestry* 43, 529 (1997).
5. Lochman V.: *Lesnictví – Forestry* 42, 437 (1996).
6. Lochman V., Šebková V.: *Lesnictví – Forestry* 44, 549 (1998).
7. Lochman V., Chlebek A., Jařabáč M.: *Zpravodaj Beskydy Vliv imisí na lesy a lesní hospodářství Beskyd*, str. 53. MZLU, Brno 1999.
8. Lochman V.: *Sborník Opočno 31.8.–1.9.2000*, str. 31. VÚLHM, Jíloviště-Strnady 2000.
9. Fara M., Kurfürst J.: *Sborník Ovzduší '97, Luhačovice*, 23.–26.3.1997, str. 27. Masarykova univerzita, Brno 1997.
10. Markert B., Herpin U., Berlekamp J., Ohlmann J., Grodzinska K., Mankovska B., Suchara I., Sievers U., Wec kert V., Lieth H.: *Sci. Total Environ.* 193, 85 (1996).
11. Rühling A.: *Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe – Estimations Based on Moss Analysis*, str. 53. Nord, 1994.
12. Sucharová J., Suchara I.: *Biomonitoring of the Atmospheric Deposition of Metals and Sulphur Compounds Using Moss Analysis in the Czech Republic. Results of the International Biomonitoring Programme 1995*, str. 183. VÚOZ, Průhonice 1998.
13. Sucharová J., Suchara I.: *Sci. Total Environ.* 223, 37 (1998).
14. Uhlířová H., Miovska B., Fabiánek P.: *Zprávy les. výzk.* 40(2), 27 (1995).
15. Uhlířová H., Lochman V., Šrámek V., Sovová Z.: *Chem. Listy* 92, 807 (1998).
16. Lepšová A., Mejstřík V.: *Sci. Total Environ.* 76, 117 (1988).
17. Uhlířová H., Hejdová J.: *Zprávy les. výzk.* 44(3), 1 (1999).
18. Bukovjan K.: *Výsledky kontroly a monitoringu cizorodých látek. Situace v roce 1995*, str. 72. MZe ČR, Praha 1995.
19. Bukovjan K.: *Ročenka MZe ČR 1996*, 78.
20. *Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb., Příloha č. 3: Kontaminující látky v potravinách*. Částka 99, str. 5553.

21. Augustin S., Andreae H.: *Cause-Effect-Interactions in Forest Condition. State of Current Knowledge*. UN/ECE/CLRTAP/ICP Forests, Hamburg 1998.
22. Andreae H.: *Ecological Impacts of Some Heavy Metals Related to Long-Range Atmospheric Transport*. UN/ECE ICP Forest. Sächsische Landesanstalt für Forsten, Hamburg 1996.
23. Lochman V.: *Práce VÚLHM* 82, 125 (2000).
24. Lochman V.: *Lesnictví – Forestry* 39, 58 (1993).
25. Míchal I.: *Ekologická stabilita*, str. 37. MŽP ČR, Praha 1994.
26. Klimo E., Kulhavý J.: *Air Pollution and Stability of Coniferous Forest Ecosystems*, str. 93. Vysoká škola zemědělská, Brno 1985.
27. Němec A., Kvapil K.: *Sborník výzkumných ústavů zemědělských 21/5*, str. 44. Ministerstvo zemědělství Republiky Československé, Praha 1926.
28. Ulrich B., Meyer R., Khanna P. K.: *Schriften. Forstl. Fak. Univ. Göttingen* 58, 2. vyd., str. 291. Sauerländer's Verlag, Frankfurt/M. 1981.
29. Khanna P. K., Ulrich B.: *Proc. Symp. Air Pollution and Stability of Coniferous Forest Ecosystems. Ostravice, October 1–5, 1984*, str. 23. Vysoká škola zemědělská, Brno 1985.
30. Rothe A., Kölling Ch., Moritz K.: *AFZ/ Der Wald* 6, 291 (1998).
31. Tyler G.: *SNV – Rep.* 4078. SNV, Solna 1992.
32. Godbold D. L.: *Water, Air, Soil Pollut.* 56, 823 (1991).
33. Alewell C., Matzner E.: *Water, Air, Soil Pollut.* 71, 155 (1993).
34. Manderscheid B., Matzner E., Meiwes K. J.: *Water, Air, Soil Pollut.* 79, 3 (1995).
35. Lochman V., Bíba M., Bucek J., Fadrhonsová V.: *Commun. Inst. For. Bohem.* 20, (2002), v tisku
36. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 376/2000 Sb., *kteřou se stanoví požadavky na pitnou vodu a rozsah a četnost její kontroly*, příloha 1.

H. Uhlířová, V. Fadrhonsová, M. Bíba, and V. Lochman (Research Institute of Forestry and Game Management, Prague): Deposition and Movement in Forest Ecosystems of Selected Substances with Connection to the Food Chain

Disturbance of equilibrium in forest ecosystems by high deposition of substances with acidifying action manifests itself in other environment components. The article deals with the effect of deposition on the forest ecosystem of selected substances which eventually affect the quality of the food chain and drinking water. The methods of study of affecting forest ecosystems start with determination of deposition of substances into the ecosystem and the contribution of treetop interception to the process as well as determination of the effect of chemical changes in soil on the quality of the soil solution and of the water flowing off the forest environment into water resources. The quality of that water is evaluated from the chemical composition in accord with the regulation of the Ministry of Health No. 376/2000. The content of heavy metals in mushrooms as a part of the food chain is evaluated in relation to hygienic limits (regulation of the Ministry of Health No. 298/1997).

NÁVRAT HOUBY, JEŽ DALA VZNIKnout JMÉNU TRICHOHECENY

MARTIN ŽABKA^a a ALEXANDR JEGOROV^b

^aZemědělská fakulta, Jihočeská univerzita, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, ^bIVAX CR a.s., Výzkumná jednotka, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
e-mail: mزابka@centrum.cz, alexandr_jegorov@ivax-cr.com

Došlo dne 14.III.2002

Klíčová slova: mykotoxiny, trichotheceny, roseotoxiny, destruxiny

Obsah

1. Úvod
2. Výskyt mykotoxinů
3. Trichotheceny
4. Roseotoxiny a destruxiny
5. Závěr

1. Úvod

Aktuálním trendem v oblasti výroby zemědělských komodit a následně potravin se stala produkce kvalitních, a především zdravotně nezávadných produktů. Tento trend do značné míry souvisí i se sledováním obsahu exogenních toxických látek, mezi nimiž důležité místo bezesporu zaujímají mykotoxiny.

Po 11. září 2001 získalo téma mykotoxinů i jinou neblahou aktuálnost v souvislosti s jejich možným zneužitím k teroristickým cílům. Jednou z doposud nejvýznamnějších skupin mykotoxinů jsou trichotheceny¹. S instrukcemi, jak se zachovat při jejich zneužití, se dnes lze setkat na webových stránkách četných amerických nebo britských úřadů. Takovéto varování rozhodně není liché, neboť z válečné historie jsou známy případy užití substance zvané „žlutý déšť“, jejíž základ byl tvořen některými trichotheceny a jež byla pravděpodobně užita při konfliktech v Laosu, Kambodži a následně i v Afghánistánu². I když jsou tyto látky předmětem mezinárodní konvence o biologických zbraních (The Biological Weapons Convention), existuje i podezření na jejich použití ve válce v Koreji a Perském zálivu³⁻⁷. Přibližně 50leté historii objevení účinku trichothecenů a speciálně houbě, jež dala vzniknout jménu této skupiny látek, je věnován tento článek.

2. Výskyt mykotoxinů

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, vyvolávající různé toxické syndromy nazývané souhrnně mykotoxikózy. Mykotoxiny se vyskytují na všech úrovních potravního řetězce⁸, ke kontaminaci

může docházet už v době pěstování na poli, stejně tak i během skladování⁹. Bennet (1987) (cit.¹⁰) definoval mykotoxiny jako přírodní produkty hub, které evokují toxickou odezvu organismu už i ve velice malých koncentracích; z tohoto důvodu je jakákoliv kontaminace toxinogenními houbami potenciálně značně nebezpečná. Nejvíce známé mykotoxinogenní druhy náleží do rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*¹¹, nicméně v poslední době vystupují do popředí i další zástupci, jako jsou rody *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Trichoderma* a *Trichothecium*. Všechny tyto houby se obecně vyskytují v půdě a ve formě spór pak běžně ve vzduchu¹². Mezi významné skupiny mykotoxinů jsou řazeny: aflatoxiny, trichotheceny, námelové alkaloidy, zearalenony, ochratoxiny, sterigmatocystin, cyklopiazonová a peniciliová kyselina, patulin, citrinin, rubratoxiny, fumonisiny a tremorgeny.

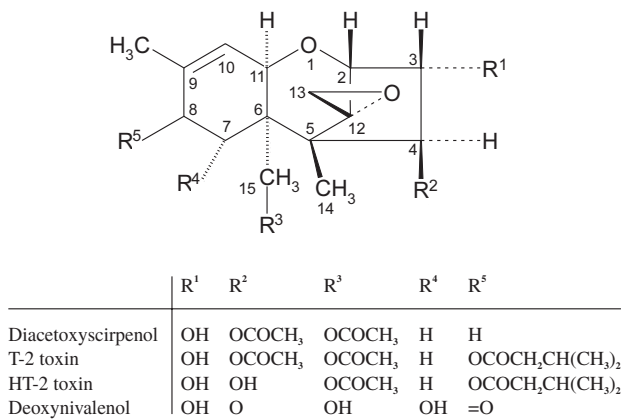
Důsledky expozice organismu mykotoxinům jsou známy u lidí i zvířat už z dávné minulosti, kdy byly některé otravy (ergotismus) živnou půdou pro šíření náboženských pověr, stejně tak z minulosti poměrně nedávné, např. úmrtí 17 000 lidí v důsledku alimentární toxické aleukie (ATA), vyvolané požitím kontaminovaného obilí za II. světové války v bývalém Sovětském svazu^{8,13}. Konečně i v dnešní době je škodlivý vliv mykotoxinů na populaci patrný⁶, a to hlavně v rozvojových zemích¹⁴.

3. Trichotheceny

Trichotheceny jsou jako skupina sekundárních metabolitů hub systematicky popisovány již od roku 1948, kdy byl na základě svých inhibičních vlastností¹⁵⁻¹⁸ objeven Freemanem a Morrissonem v houbách *Trichothecium roseum* (pers Fr.) Link¹⁹ první zástupce této skupiny nazvaný trichothecin²⁰. Producenti trichothecenů tvoří dnes již poměrně široké spektrum zástupců²¹ a od té doby bylo objeveno dalších asi 170 trichothecenů^{22,23}.

Z hlediska praktického výskytu trichothecenů v kontaminovaných potravinách je známo, že hlavním kontaminantem bývá deoxynivalenol. Jde naštěstí o jeden z méně toxických trichothecenů⁸. Hygienické limity v ČR pro tento mykotoxin jsou stanoveny pro obilí, rýži a kukuřici 2 mg.kg⁻¹ a pro mouku 1 mg.kg⁻¹. Pro jiné trichotheceny nejsou v ČR zákonné limity určeny²⁴.

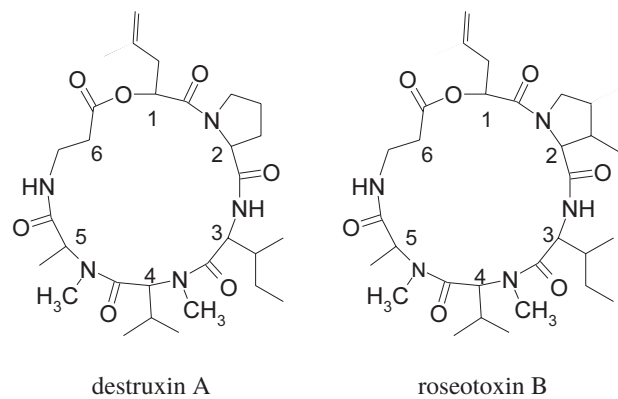
Trichotheceny jsou většinou charakterizovány jako tricyklické seskviterpeny se dvěma šestičlennými a jedním pětičlenným kruhem⁸. Většina z nich má dvojnou vazbu v poloze 9,10 a obsahuje epoxyskupinu v poloze 12,13 (cit.⁹). Mohou být rozděleny do čtyř typů (A, B, C, a D). Typ A se vyznačuje nepřítomností oxoskupiny v poloze 8 a příkladem je vysoce toxický HT-2 a T-2 toxin. Typ B je význačný přítomností oxoskupiny na C-8 a příkladem by mohl být deoxynivalenol (DON), nazývaný též vomitoxin. Skupina trichothecenů typu C je charakteristická další epoxyskupinou v poloze 7,8 nebo i 9,10 a lze sem zařadit například krotocin. Typ D obsahuje makrocycklus mezi C-4 a C-15 s několika esterovými vazbami, jehož příkladem je verukarin A (cit.^{8,9}).

Obr. 1. Struktura trichothecenů¹

Kontaminace organismu trichotheceny má za následek širokou paletu projevů. Vesměs jde o silné inhibitory syntézy proteinů a DNA (cit.¹). Při vystavení organismu účinkům trichothecenů může docházet k rozličným syndromům, například ke snížení příjmu nebo totálnímu odmítnutí potravy, k podráždění kůže až k dermálním nekrotázám, zvracení, průjmům a krvácivosti. Trichotheceny jsou popsány i jako imunopresory^{25–29}. Bez výjimky všechny trichotheceny vykazují větší či menší stupeň toxicity pro živočichy, vykazují i insekticidní efekt^{1,30}. Byla popsána i fytotoxická aktivita^{1,31}. Toxicita je vysvětlována především přítomností epoxyskupiny³². V minulosti se trichotheceny staly pro svou toxicitu předmětem zájmu vojenského výzkumu, který následně odhalil u některých zástupců (např. T-2 toxin) vlastnosti splňující předpoklady pro jejich bojové využití. Jedná se například o schopnost vyvolat poškození kůže a očí už od dávky několika ng–μg, vážné poškození nervové soustavy, respirační, gastrointestinální a hematologickou toxicitu spojenou s mnohostetností způsobů průniku do organismu^{33–35}.

Trichothecium roseum je celosvětově rozšířená patogenní houba³⁶ hojně se vyskytující na různém ovoci³⁷ i lískových oříšcích³⁸, v našich podmínkách pak především na jablkách³⁹. Trichotheceny izolované z hub *Trichothecium roseum* (trichothecin) nebo *Stachybotris cylindrospora*⁴⁰ vykazovaly antifungální aktivitu spojenou s inhibicí konkurenčních hub^{20,41}. Farmakologicky zajímavou fungicidní aktivitu, která není doprovázena cytotoxickými účinky, vykazují např. trichotheceny izolované z houby *Trichoderma harzianum*⁴². Trichotheceny překvapivě nevykazují žádnou nebo téměř žádnou aktivitu vůči různým bakteriím nebo kvasinkám^{42,43}. Byly u nich však zjištěny antivirální účinky, a to jak u rostlinných virů (tobacco necrosis virus, TNV)⁴⁴, tak virů účinných u člověka (Epstein-Barr virus EBV-EA, Herpes simplex virus)^{45–47}. Velmi zajímavá je i velmi vysoká aktivita některých trichothecenů na malárii⁴⁸. Na skupinu trichothecenů se tedy v celku nelze dívat pouze jako na toxiny, ale mezi různými účinky těchto látek lze nalézt i medicínsky využitelné aktivity.

Analýza trichothecenů je dnes již rutinní záležitostí. Podkladem pro většinu současných metod je metoda, kterou zavedl Scott (1970) (cit.⁴⁹). Dodnes se tato metoda v různých modifikacích uplatňuje při detekci velkého množství mykotoxinů. Jako další metodu pro stanovení lze zmínit např. detekci

Obr. 2. Struktury destruxinu A a roseotoxinu B (cit.⁶¹)

destruxin A: ¹ 2-hydroxypent-4-enová kyselina, ² Pro, ³ Ile, ⁴ MeVal, ⁵ MeAla, ⁶ β-Ala
 roseotoxin B: ¹ 2-hydroxypent-4-enová kyselina, ² 3-Me-Pro, ³ Ile, ⁴ MeVal, ⁵ MeAla, ⁶ β-Ala

pomocí kultur na agarových plotnách, kterou představil Filtenborg a Frisvad (1980) (cit.⁵⁰). Základem metod je dnes užití TLC, HPLC nebo pokročilých metod GC-MS nebo HPLC-MS. Navíc jsou komerčně používány i metody založené na kitech využívajících imunodetekci nebo afinitní chromatografii⁵¹.

4. Roseotoxiny a destruxiny

Trichothecium roseum produkuje jak již zmíněné trichotheceny, tak méně známé roseotoxiny a destruxiny⁵². Roseotoxiny a destruxiny po chemické stránce náleží do skupiny cyklických depsipectidů⁵³. Termín cyklické depsipectidy poprvé užil Shemyakin (1960) (cit.⁵⁴) a představuje cyklické peptidy skládající se z aminokyselin a hydroxykyselin. Peptidová vazba je tudíž v místech napojení hydroxykyseliny nahrazena esterovou vazbou. O cyklických depsipectidech lze hovořit jako o široké skupině látek s mnoha různými biologickými účinky. Byly u nich objeveny například insekticidní^{55,56} nebo protivirové⁵⁷ účinky a také např. cytotoxicita k leukemickým buňkám⁵⁸.

Roseotoxiny jsou skupinou mykotoxinů originálně produkováných pouze patogenní houbou *Trichothecium roseum*⁵². Roseotoxiny jsou složeny z pěti aminokyselin a jedné hydroxykyseliny a vyznačují se přítomností neobvyklé aminokyseliny *trans*-3-methylprolinu. Popsány byly roseotoxiny A, B a C, které byly pojmenovány dle retence na silikagelu^{52,53,59}, a roseotoxin S lišící se počtem hydroxykyselin v cyklu⁶⁰.

Destruxiny jsou roseotoxinům příbuzné hexadepsipectidy^{61,62} obsahující jednu α-hydroxykyselinu. Jedinou odlišností je substituce *trans*-3-methylprolinu u roseotoxinů prolinem u destruxinů⁶³. Destruxiny jsou produkovány houbou *T. roseum* a několika dalšími většinou entomopatogenními houbami^{55,64–68}. V současnosti je známo okolo 30 destruxinů. Předpokládá se, že tato skupina metabolitů je pravděpodobně syntetizována extraribosomovým multienzymatickým systémem⁶⁹, a právě tento aspekt je zřejmě příčinou velké rozmanitosti těchto metabolitů^{55,70}.

Biologická aktivita roseotoxinů a destruxinů byla a je i dnes předmětem výzkumu. Byla u nich zjištěna nezanedbatelná insekticidní^{55,64–66,71,72}, nematocidní⁷³, imunomodulační⁷⁴ nebo fytotoxická aktivita^{67,68} a neméně zajímavá toxicita testovaná na modelech teplokrevných živočichů⁷⁵. Lze zmínit i nedávno objevený kardiostimulační účinek roseotoxinu B a destruxinů A, B (cit.⁶¹).

Biologická aktivita cyklopeptideů tedy rovněž potvrzuje, že i zde jsou nalézány zajímavé a využitelné vlastnosti, a tudíž nelze na tyto látky pohlížet jen jako na mykotoxiny. Hranice mezi užitečností a toxicitou může být však značně úzká, jako je tomu i u jiných biologicky aktivních látek.

5. Závěr

Po mnoha letech od popisu prvního trichothecenu z houby *T. roseum* si dnes připomínáme tuto skupinu látek v nových souvislostech. Sekundární produkty hub mohou působit akutní i chronické otravy a stejně tak se mohou stát významnými léčivy. Přísloví s mincí o dvou stranách nás bezpochyby nutí ke snaze hlouběji a důkladněji těmto přírodním látkám porozumět.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant č. GA ČR 203/02/1417) a MSM JO6/98: 122200002.

LITERATURA

- Cole R. J., Cox R. H.: *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, str. 152. Academic Press, New York 1981.
- Fang Y.: *Chemical Agents Development in USSR*, překlad z čínštiny, Alexandria Va.: Defense Technical Information Center 1983.
- Heyndrickx A. (ed.): *First World Congress: New Compounds in Biological and Chemical Warfare: Toxicological Evaluation, Proceedings*. State University of Ghent and the National Science Foundation of Belgium, Ghent 1984.
- Marshall E.: *Science* 275, 745 (1997).
- Zilinskas R. A.: *J. Am. Med. Assoc.* 278, 418 (1997).
- Wannemacher R. W., Jr., Wiener S. L.: *Trichothecene Mycotoxins, Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare* (Sidell F. R., Takafuji E. T., Franz D. R., ed.), část I: *Warfare, Weapons, and the Casualty, Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare* (Zajtchuk R., Bellamy R. F., ed.). Office of the Surgeon General, Walter Reed Army Medical Center, Washington, D.C. 1997.
- Wannemacher R. W., Bunner D. L., Neufeld N. P., v knize: *Mycotoxins and Animal Foods* (Smith J. E., ed.). CRC Press, Boca Raton 1991.
- Velíšek J.: *Chemie potravin* 3, 205 (1999).
- Krska R., Baumgartner S., Josephs R.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 371, 285 (2001).
- Bennett J. W.: *Mycopathologia* 100, 3 (1987).
- Samson R. A.: *J. Med. Mycol.* 30, 9 (1992).
- Tobin R. S., Baranowski E., Gilman A. P., Kuiper-Goodman T., Miller J. D., Giddings M.: *Can. J. Public Health* 78, 1 (1987).
- Bilal V. I.: *Fuzarii*, str. 360. Naukova Dumka, Kiev 1977.
- Chasseur C., Suetens C., Michel V., Mathieu F., Begaux F., Nolard N., Haubruge E.: *Int. J. Orthopaedy* 25, 154 (2001).
- Whetzel H. H.: *Int. Nat. Sci. Bull.* 5, 3 (1909).
- Boning K.: *Phytopathology* 6, 113 (1933).
- Koch L. W.: *Sci. Agric.* 15, 80 (1934).
- Greaney F. J., Machacek J. E.: *Sci. Agric.* 15, 377 (1935).
- Seifert K. A., Seize G. L., Savard M. E.: *Mycologia* 89, 250 (1997).
- Freeman G. G., Morrison R. I.: *Nature* 162, 30 (1948).
- Betina V.: *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier, Amsterdam 1993.
- Grove J. F.: *Nat. Prod. Rep.* 5, 187 (1988).
- Grove J. F.: *Nat. Prod. Rep.* 10, 429 (1993).
- Vyhlaška Ministerstva zdravotnictví ČR č. 298/1997 Sb.
- Miller J. D., Trenholm H. L.: *Mycotoxins in Grain*. Eagan Press, St. Paul 1994.
- Reiss J.: *Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer, Berlin 1986.
- Franck B.: *Angew. Chem.* 96, 462 (1984).
- Kidd M. T., Hagler W. M., Qureshi M. A.: *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 17, 385 (1995).
- Richard J. L., Pier A. C., Tiffany L. H.: *Mycopathol. Mycol. Appl.* 40, 160 (1970).
- Wright V. F., Vesonder R. F., Ciegler A., v knize: *Microbial and Viral Pesticides* (Kursak E., ed.), str. 559. Marcel Dekker, New York 1982.
- Brian P. W., Dawkins A. W., Grove J. F., Hemmig H. G., Lowe D., Norris G. L. F.: *J. Exp. Bot.* 12, 1 (1961).
- IPCS Environmental Health Criteria, Selected Mycotoxins, str. 105. WHO, Vammala 1990.
- Watson S. A., Mirocha C. J., Hayes A. W.: *Fundam. Appl. Toxicol.* 4, 700 (1984).
- Bunner D. L., Neufeld H. A., Brennecke L. H., Campbell Y. G., Dinterman R. E., Pelosi J. G.: *Clinical and Hematologic Effects of T-2 Toxin in Rats*. U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (DTIC ADA158874) 1985.
- Wannemacher R. W., Bunner D. L., Neufeld N. P., v knize: *Toxicity of Trichothecene and Other Related Toxins in Rabbits and Animals*, Mycotoxins and Animal Foods (Smith J. E., ed.). CRC Press, Boca Raton 1991.
- Gilman J. C.: *A Manual of Soil Fungi*. State College Press, Ames 1957.
- Hong C. X., Michailides T. J.: *Plant Dis.* 81, 112 (1997).
- Sipiahioglu H. N., Heperkan D.: *Food Microbiology* 17, 401 (2000).
- Betina V., Vaňková M.: *Biologia* 32, 943 (1977).
- Ayer W. A., Miao S.: *Can. J. Chem.* 71, 487 (1993).
- Goderedsen W. O., Vandegal S.: *Acta Chem. Scand.* 19, 1088 (1965).
- Corley D. G., Millerwideman M., Durley R. C.: *J. Nat. Prod.* 57, 422 (1994).
- Madhyastha M. S., Marquardt R. R., Masi A., Borsa J., Frohlich A. A.: *J. Food Prot.* 57, 48 (1994).
- Bawden F. C., Freeman G. G.: *J. Gen. Microbiol.* 7, 154 (1952).
- Iida A., Konishi K., Kubo H., Tomioka K., Tokuda H., Nishino H.: *Tetrahedron Lett.* 37, 9219, (1996).
- Okazaki K., Yoshizawa T., Kimura S.: *Agric. Biol. Chem.* 53, 1441 (1989).

47. Okazaki K., Yoshizawa T., Kimura S.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 56, 523 (1992).
48. Isaka M., Punya J., Lertwerawat Y., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y.: *J. Nat. Prod.* 62, 329 (1999).
49. Scot P. M., Lawrence J. W., van Walbeek W.: *Appl. Microbiol.* 20, 839 (1970).
50. Filtenborg O., Frisvad J. C.: *Lebensm. Wiss. Technol.* 13, 128 (1980).
51. Vicam: Firemní katalog „Mycotoxin Test Kits“ 2001.
52. Springer J. P., Cole R. J., Dorner J. W., Cox R. H., Richard J. L., Barnes C. L., van der Helm D.: *J. Am. Chem. Soc.* 106, 2388 (1984).
53. Engstrom G. W.: *J. Agric. Food Chem.* 26, 1403 (1978).
54. Shemyakin M. M.: *Angew. Chem.* 72, 342 (1960).
55. Gupta S., Roberts D. W., Renwick J. A. A.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1989, 2347.
56. Tamura S., Takahashi N., v knize: *Naturally Occurring Insecticides* (Jacobson M., Crosby O. G., ed.), str. 499. Marcel Dekker, New York 1971.
57. Yeh S. F., Pan W., Ong G. T., Chiou A. J., Chuang C. C., Chiou S. H., Wu S. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 65 (1996).
58. Morel E., Pais M., Turpin M., Guyot M.: *Biochem. Pharmacother.* 37, 184 (1983).
59. Engstrom G. W., DeLance J. V., Richard J. L. Baetz A. L.: *J. Agric. Food Chem.* 23, 244 (1975).
60. Flesh P., Stockinger G.: *Weinwissenschaft* 42, 111 (1987).
61. Tsuno A., Kamijo M., Takemoto N., Sato Y., Ajisaka K.: *J. Antibiot.* 50, 1007 (1997).
62. Jegorov A., Havlíček V., Sedmera P.: *J. Mass Spectrom.* 33, 274 (1998).
63. Suzuki A., Kuama S., Kodaira Y., Tamura S.: *Agric. Biol. Chem.* 30, 517 (1966).
64. Kodaira Y.: *Agric. Biol. Chem.* 25, 261 (1961).
65. Suzuki A., Taguchi H., Tamura S.: *Agric. Biol. Chem.* 34, 813 (1970).
66. Pais M., Das B. C., Ferron P.: *Phytochemistry* 10, 715 (1981).
67. Ayer W. A., Pena-Rodrigues L. M.: *J. Nat. Prod.* 50, 400 (1987).
68. Buchwaldt L., Jensen J. S.: *Phytochemistry* 20, 2311 (1991).
69. Peeters H., Matha V., Roberts D. W.: *Proc. Int. Conf. Biopesticides, Theory and Practice* (Jegorov A., Matha V., ed.), str. 169. ČSVTS, České Budějovice 1990.
70. Traber R., Hofman H., Loosli H. R., Ponelle M., Wartburg A.: *Helv. Chim. Acta* 70, 13 (1987).
71. Dowd P. F., Cole R. J., Vesonder R. F.: *J. Antibiot.* 41, 1868 (1988).
72. Jegorov A., Matha V., Hradec H.: *Comp. Biochem. Physiol. C* 35, 97 (1992).
73. Kawazu K., Murakami T., Ono Y., Kanzaki H., Kobayashi A., Mikawa T., Yoshikawa N.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 57, 98 (1993).
74. Huxham I. M., Lackie A. M., McCorkindale A. J.: *J. Insect Physiol.* 35, 97 (1989).
75. Richard J. L., Tiffany L. H., Pier A. C.: *Mycopathol. Mycol. Appl.* 38, 313 (1969).

M. Žabka^a and A. Jegorov^b (^a*Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*, ^b*IVAX CR Co., Research Unit, České Budějovice*): **Comeback of the Fungus That Gave Name to Trichothecenes**

The investigation of mycotoxins is the topic of current concern in food production at present, when the food quality is often replaced by only quantitative criteria of production. Special attention attracts the potential use of mycotoxins in terrorist attacks. In contrast, some of the compounds can find interesting pharmaceutical use. The paper is dedicated to the 55th anniversary of discovery of trichothecenes, which were first found in the *Trichothecium roseum* fungus appearing as a natural contaminant in some agricultural commodities.

TĚŽKÉ KOVY V PŘÍRODĚ A JEJICH TOXICITA

ZDENĚK KAFKA A JANA PUNČOCHÁŘOVÁ

Ústav chemie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Zdenek.Kafka@vscht.cz

Došlo dne 28.I.2002

Klíčová slova: těžké kovy, zdroje těžkých kovů, ekotoxicita, životní prostředí

Obsah

1. Úvod
2. Základní pojmy
3. Zdroje těžkých kovů
4. Průnik těžkých kovů do živých organismů
5. Toxicita těžkých kovů
6. Toxické působení jednotlivých těžkých kovů
 - 6.1. Olovo
 - 6.2. Arsen
 - 6.3. Selen
 - 6.4. Měď
 - 6.5. Zinek
 - 6.6. Kadmium
 - 6.7. Rtuť
 - 6.8. Chrom
 - 6.9. Nikl
7. Závěr

1. Úvod

Těžké kovy provázejí lidstvo zřejmě po celou dobu jeho existence¹. Existují záznamy o použití olova z doby okolo 2000 let př.n.l., hojně byl tento kov používán i v době antiky. Ve starém Egyptě byl využíván např. arsen jako aditivum do barev. Velmi dlouho je známé i škodlivé působení některých kovů na člověka a ostatní organismy², některé sloučeniny olova, antimonu a mědi označuje jako jedy už Ebersův papyrus (cca 1500 let př.n.l.), jeden z nejstarších existujících souborů lékařských záznamů. Naopak řada kovů byla objevena mnohem později. Příkladem může být kadmium, které bylo poprvé získáno až v r. 1817 ze zinkové rudy, ve které se vždy vyskytuje jako doprovodný prvek. Lze proto předpokládat, že kovy patří k nejdéle známým toxickým látkám. V ekosystémech se mohou těžké kovy pohybovat specifickými cestami svých biogeochemických cyklů. Z těchto cyklů v různých momentech vystupují a kumulují se velmi často např. v půdách nebo v živých organismech. S mobilitou kovu je úzce spjata rozpustnost sloučenin ve vodě – čím je sloučenina rozpustnější, tím je mobilita kovu vyšší. U rozpuštěných látek je podstatné, zda jde o nestálou hydratovanou iontovou sloučeninu nebo

o stabilní komplex. Důležitá je také rozpustnost sloučenin těžkých kovů v kyselinách, zejména v kyselině sírové a dusičné, které jsou často přítomné v životním prostředí. Při nadměrně vysoké kyselosti vodních srážek, případně prosakující vody, se mohou sloučeniny těžkých kovů vymývat z půdy, pronikat do rostlin a stromů a ohrožovat zdroje pitné vody. Na druhé straně je však nutné připomenout, že toxicita souvisí s dosažením určité prahové koncentrace daného kovu v organismu. Ve stopových koncentracích je řada kovů pro organismy dokonce nezbytná. Většinou jde o esenciální prvky jako měď, zinek, chrom nebo železo, které jsou např. součástí některých enzymů a jejichž nedostatek se může projevit závažným onemocněním. Výrazný zájem o kovy a jejich chování v životním prostředí je vyvolán zejména jejich rozsáhlým průmyslovým využitím. Z toho také vyplývá neúměrné zatěžování životního prostředí stále se zvyšujícím množstvím produkovaných odpadů, které často obsahují tento typ znečišťujících látek v nadlimitním množství.

2. Základní pojmy

Ke kovům se řadí asi osmdesát prvků periodické soustavy, z nichž je přibližně třicet označováno jako kovy toxické, případně těžké. Termíny stopové kovy (trace metals), těžké kovy (heavy metals) a toxické kovy (toxic metals) jsou často navzájem zaměňovány³. Používají se pro skupinu kovových prvků, které představují určité riziko pro biotiku. Termín stopové kovy se vztahuje na kovy, které jsou přítomné v organismu nebo v životním prostředí ve velmi nízkých koncentracích odpovídajících několika částicím v milionu částic okolního prostředí, řádově tedy v jednotkách ppm (v lidském organismu např. zinek, chrom a železo). Jako těžké kovy jsou označovány kovy, jejichž specifická hmotnost je vyšší než 5 g.cm^{-3} (např. kadmium, rtuť, olovo). Toxické kovy jsou takové kovy, které při určitých koncentracích působí škodlivě na člověka a ostatní biotické složky ekosystémů. Ekotoxikologická terminologie upřednostňuje v případě kovů nebezpečných pro biotiku termín těžké kovy a do této skupiny zahrnuje především měď, zinek, kadmium, rtuť, olovo, chrom, nikl, mangan a železo, k nimž navíc přiřazuje polokovy selen a arsen.

V přírodě se kovy vyskytují jako ryzí nebo ve formě solí. V určitých nízkých koncentracích jsou přirozenou součástí zemské kůry. Lokálně se mohou vyskytovat mnohonásobně vyšší přirozená množství kovů, většinou jde o zakonzentrování těchto prvků v příslušných rudách. Sloučeniny kovů zahrnují všechna skupenství; jsou mezi nimi tuhé látky, kapaliny i plyny a mohou tvořit i aerosoly. V životním prostředí se kovy pohybují v geochemických a biologických cyklech. Prostřednictvím biologických cyklů přecházejí do živých částí ekosystémů, do organismů. Migrační cykly kovů mohou být přirozené (přírodní) nebo mohou mít antropogenní původ. V případě některých kovů, např. rtuti, začínají množství kovu migrujícího antropogenními způsoby převažovat nad přirozenými cestami migrace. Některé mikroorganismy, zejména

Tabulka I
Mezní hodnoty koncentrací těžkých kovů v půdě

Těžký kov	Mezní koncentrace [mg.kg ⁻¹ sušiny]	
	běžné půdy	písky, hlinité písky a štěrkopisky
Olovo	60	55
Arsen	20	15
Měď	60	45
Zinek	120	105
Kadmium	0,5	0,4
Rtuť	0,3	0,3
Chrom	90	55
Nikl	50	45

Tabulka II
Mezní hodnoty koncentrací těžkých kovů v kalech (pro použití na zemědělské půdě)

Těžký kov	Mezní koncentrace [mg.kg ⁻¹ sušiny]
Olovo	200
Arsen	30
Měď	500
Zinek	2500
Kadmium	5
Rtuť	4
Chrom	200
Nikl	100

půdní, umožňují vstup toxických kovů do komplexů s organickými látkami, ty mohou být z hlediska toxicity nebezpečnější než původní forma kovu (např. methylrtuť). Vzhledem k tomu, že na rozdíl od látek organických kovy nikdy nedegradují, je třeba počítat s jejich postupnou akumulací v životním prostředí.

Z toxikologických údajů zabývajících se situací v ČR jsou závazné ukazatele pro hodnocení půd a kalů, které jsou obsahem příloh č. 2 a č. 3 k vyhlášce č. 382/2001 Sb. Ministerstva životního prostředí ČR. Mezní hodnoty koncentrací vybraných těžkých kovů v půdách a kalech vymezující maximální hodnoty koncentrací, po jejichž překročení by mohlo dojít k poškozování funkcí půdy a složek životního prostředí, jsou uvedeny v tabulkách I a II.

3. Zdroje těžkých kovů

Vzhledem k mnohostrannému využití nejrůznějších sloučenin těžkých kovů existuje mnoho zdrojů⁴⁻⁸ a možností úniku těchto nebezpečných látek do všech složek životního prostředí. Jedná se o různá odvětví průmyslu i zemědělství, která mohou být jak lokálními, tak i celoplošnými zdroji těžkých kovů. Přehled nejdůležitějších zdrojů kontaminace těžkými kovy, které se nejčastěji vyskytují v životním prostředí, je uve-

Tabulka III
Nejdůležitější zdroje kontaminace životního prostředí těžkými kovy

Těžký kov	Zdroje kontaminace
Olovo	úpravny rud, hutě, rafinerie, chemický průmysl, akumulátory, pigmenty do barev, olovnaté sklo, přísady do glazur, zemědělství (hnojiva, insekticidy), spalování fosilních paliv, automobilový provoz (používání olovnatého benzínu)
Arsen	zpracování rud, aditiva do skla, zemědělství (hnojiva, insekticidy), kouření, léčiva pro veterinární medicínu, ochranné prostředky na dřevo
Selen	zpracování rud, komunální odpady, spalování fosilních paliv, povrchové úpravy kovů, polovodiče
Měď	elektrotechnický materiál, slitiny (mosazi, bronzy), komunální odpad, chemický průmysl, zemědělství (fungicidy), měděné dráty a plechy
Zinek	galvanizace, pigmenty do barev a keramických glazur, slitiny (mosazi, bronzy), zemědělství, komunální odpad, kouření
Kadmium	doprovodný kov v zinkových a olověných rudách, zemědělství (fosfátová hnojiva), pigmenty pro barvy a plasty, baterie, spalování fosilních paliv, kouření
Rtuť	zpracování rud, zemědělství (herbicidy, fungicidy), elektrochemie, katalytické procesy, baterie, lékařství (teploměry, zubní amalgamy), spalování fosilních paliv
Chrom	chemický průmysl, pigmenty do barev, ochranné prostředky na dřevo, zpracování kůže, výroba cementu, pokovování, slitiny, spalování fosilních paliv
Nikl	úpravny rud, hutě, rafinerie, baterie, pokovování, slitiny, kosmetické přípravky (šampony, laky na vlasy), kouření

den v tabulce III. Z uvedených údajů je zřejmé, že řada těchto kovů pochází ze shodných odvětví antropogenní činnosti. Jde např. o některé výrobní procesy s rizikem intoxikace kovy, jako je zpracování rud zahrnující jejich drcení nebo mletí, při kterém vzniká prach, dále tavení způsobující horečku z kovů (horečka slévačů) nebo pražení, při kterém vznikají páry a dýmy kovů ohrožující dýchací ústrojí. Do životního prostředí se v těchto případech dostává zejména olovo, arsen, selen, kadmium, rtuť a nikl. Jiné průmyslové procesy mohou způsobit kontaminaci životního prostředí kromě již uvedenými kovy také sloučeninami chromu. Příkladem takových procesů je spalování fosilních paliv, kdy může do atmosféry unikat pestrá směs látek obsahujících sloučeniny olova, selenu, kadmia, rtuti a chromu často v nadlimitních koncentracích. Podobným zdrojem kontaminace těžkými kovy může být i zemědělská výroba. Jde např. o využití průmyslových hnojiv, zejména fosfátových, při jejichž aplikaci se do půd dostává především kadmium nebo olovo a dále využití pesticidů (herbicidů, insekticidů a fungicidů) nezbytných pro zamezení poklesu zemědělské produkce, které se vyznačují rovněž nadměrným obsahem olova, arsenu, mědi, kadmia a rtuti. Jiné

zdroje kontaminace jsou naopak charakteristické pro určitý kov, např. chrom je uvolňován z roztoků používaných jako konzervační prostředky pro ochranu dřeva, případně jako činidlo pro zpracování kůže, nebo rtuť, která se využívá v elektrochemických procesech nebo v lékařství. Častým zdrojem expozice těžkými kovy, zejména kadmia a niklu, je také tabákový kouř. Původně hlavní zdroj kontaminace životního prostředí sloučeninami olova, pocházející z výfukových plynů spalovacích motorů, by se měl zavedením používání bezolovnatého benzínu významně omezit.

4. Průnik těžkých kovů do organismů

Ionty těžkých kovů mohou přecházet do organismů, přičemž hlavními vstupními branami jsou dýchací ústrojí, trávicí ústrojí a kůže, v případě teratogenních a embryotoxických látek i placenta. Ionty jsou do těla vstřebávány a po určité době pronikají do krve, jejímž prostřednictvím jsou transportovány na různá cílová místa v organismu. Při transportu je kov v některých případech obsažen přímo v červených krvinkách, nejčastěji však ve specifických bílkovinách krevní plazmy (např. v α -2-makroglobulinu nebo v β -2-mikroglobulinu). Jako cílové jsou označovány orgány, které jsou příslušným kovem ovlivňovány nebo je v nich kov ukládán. Ovlivnění specifických cílových orgánů jednotlivými kovy^{9,10} je uvedeno v tabulce IV.

Nejvíce vnímaví k toxickému působení těžkých kovů jsou staří lidé a malé děti. Rychlý růst buněk a jejich rychlé dělení v dětském organismu navíc znamená při xenobiotické zátěži i riziko genotoxických efektů. Poškození organismu je přímo úměrné době, po kterou jsou ionty kovu v organismu přítomny. Z tohoto důvodu se pro každý kov zjišťuje hodnota jeho biologického poločasů. Je to doba, za kterou tělo vyloučí polovinu naakumulované toxické látky. Hodnoty biologických poločasů pro jednotlivé kovy se od sebe značně liší. U arsenu, chromu a kobaltu se jedná o hodiny až dny, zatímco u kadmia a olova jde o dvacet až třicet let. U iontů rtuti činí biologický poločas pouze několik dní, jedná-li se o vyloučení z krve. Hodnota biologického poločasu se však prodlužuje na několik měsíců, pokud jde o tělo jako celek. V řadě případů je biologický poločas silně ovlivněn i formou, v jaké se kov v organismu vyskytuje. Chemická forma kovu a jeho mocnost určují jak míru absorpce, tak distribuci kovu v organismu, často i typ a sílu toxického efektu. Příkladem mohou být alkylosloučeniny, jako je methylrtuť nebo tetraethylolovo, které mají lipofilní charakter, a proto se v ochranných myelinových vrstvách nervových vláken rozpouštějí lépe než anorganické soli těchto kovů.

Množství toxického kovu se často měří v krvi, moči a ve vlasech. Výhodou stanovení ve vlasech je možnost sledování vlasu po segmentech, a tedy s upřesněním, jak tělo vstřebávalo toxikant v různých časových úsecích.

Dispozici lidského těla absorbovat kovy mohou ovlivnit stravovací návyky, a to jak pozitivně, tak negativně. Tak např. vitamin C významně snižuje absorpci kadmia a olova, pravděpodobně proto, že zvyšuje absorpci železa, které je jejich antagonistou. Naopak konzumace mléka absorpci některých kovů zvyšuje. Vedle složení potravy je vstřebávání kovů organismem ovlivněno i jinými faktory, např. konzumací alkoholu nebo kouřením, jejichž škodlivost v souvislosti s toxi-

Tabulka IV
Ovlivnění cílových orgánů jednotlivými těžkými kovy

Těžký kov	Cílový orgán
Olovo	dlouhé kosti, mozek, játra, ledviny, placenta
Arsen	centrální nervový systém, kůže, vlasy
Kadmium	ledviny, játra, varlata
Rtuť	mozek, játra, ledviny, imunitní systém
Chrom	plíce, játra, ledviny, pohlavní orgány, kůže
Nikl	plíce, srdce, imunitní systém, kůže

citou těžkých kovů byla mnohokrát potvrzena. Cigaretový kouř obsahuje kromě řady jiných složek i některé toxické kovy (kadmium, nikl) a ovlivňuje negativně především funkci plic. Alkohol vedle jiných škodlivých účinků zasahuje rušivě do hospodaření organismu s minerálními látkami. Přídavek chelatačního činidla může naopak přispět ke snížení nebo zamezení toxického účinku vazbou kovu do iontového komplexu. Pokles toxicity se v tomto případě projevuje zejména u kovů, které se v organismu hromadí, tzv. kumulativních kovů.

5. Toxicita těžkých kovů

Toxické účinky těžkých kovů jsou mnohostranné¹¹⁻¹³. Těžké kovy mohou být příčinou zažívacích potíží, různých dermatitid, nepříznivých změn v krevním obraze, poškození důležitých orgánů (mozku, jater, ledvin), rakovinných procesů atd. Určující veličinou pro metabolické chování a toxické působení kovu je jeho biologický poločas. Protože ionty kovu působí škodlivě uvnitř buněk, je jejich negativní působení nejpřesněji vyjádřeno dávkou kovu, která do jednotlivých buněk pronikne. Konkrétně jsou negativně ovlivňovány specifické biochemické procesy (např. enzymatické reakce) a poškozena cílová místa, zejména buněčné membrány a organely. Toxický efekt kovu je obvykle výsledkem interakce mezi volným iontem a cílovým místem. Toxicita na celulární úrovni je určena i dalšími faktory, např. chemickou formou iontu, oxidačním stavem kovu nebo jeho ligandovou vazbou. Vazbou na buněčné membrány brání ionty kovu (např. mědi, kadmia, rtuti, olova) transportním procesům přes buněčné stěny, a blokují tak přísun živin do buněk. Velkou roli při tom hraje tvarová podobnost molekuly nebo částice obsahující kov s molekulou látky, která je pro buňku potřebná. Tato tvarově podobná uskupení jsou označována jako molekulární mimikry.

Kovy vytvářejí elektrofilní kationty. Pro většinu těchto kationtů je typická silná afinita k síře, a proto atakují např. thiolové –SH skupiny v enzymech, čímž dochází k již zmíněnému potlačení nebo zkrácení enzymatických funkcí. Kationty těžkých kovů se rovněž velmi ochotně navazují i na karboxylovou skupinu –COOH a aminoskupinu –NH₂, které jsou charakteristické např. pro látky související s genetickou informací. Afinita k fosfátové skupině způsobuje, že těžké kovy v organismech srážejí fosfátové biosloučeniny nebo katalyzují jejich rozklad. Velmi nebezpečná je schopnost kovů akumulovat se v různých tělních tkáních. Dlouhá retence těchto

xenobiotik nastává zvláště při akumulaci kovů v kostech, která je aktuální např. pro ionty olova nebo kadmia.

Velký rozdíl v toxicitě existuje mezi anorganickými a organickými sloučeninami kovů, a to jak v kvalitě, tak i v intenzitě toxického působení. Organokovové sloučeniny patří k nejtoxičtějším látkám, jsou lipofilní a procházejí snadno a nezměněny přes buněčné membrány. Jejich dealkylace na anorganické soli je velmi pomalá.

Akutní otravy sloučeninami kovů nebo kovy samotnými jsou většinou otravy profesní. Jde zejména o poškození plic (např. plicní fibrózy po nadýchání kovového prachu), různé dermatitidy (např. působení iontů chromu nebo niklu) nebo poruchy zažívacího ústrojí (téměř všechny těžké kovy). Při vstupu kationtů do organismu požitím je vstřebání kovů výrazně usnadněno kyselým prostředím v trávicím ústrojí.

Chronické otravy většinou znamenají těžké poškození postiženého organismu a jsou způsobeny především akumulací schopností kovů. Jedním z nejzávažnějších chronických účinků těžkých kovů je jejich karcinogenita. Karcinogenní účinky jsou dokonce v některých případech pokládány za určující pro přiřazení prvku do skupiny těžkých kovů. Kovy jsou karcinogenní ve formě svých iontů. V řadě případů však kationty kovů karcinogenní proces přímo nevyvolávají, ale často působí jako promotory nebo kokarcinogeny v součinnosti s karcinogenními organickými látkami, např. s polyaromatickými uhlovodíky. Karcinogenita je často doprovázena i účinky mutagenními (kadmium, olovo, selen, arsen, chrom, nikl) a embryotoxickými (olovo, rtuť zejména ve formě methylrtuti).

6. Toxické působení jednotlivých těžkých kovů¹⁴⁻²⁰

6.1. Olovo

Podobně jako rtuť patří i olovo k nejdéle známým a hojně využívaným těžkým kovům, což vedlo mimo jiné záhy i ke zjištění jeho toxických účinků.

Do současné doby nebyl zjištěn žádný esenciální význam olova. V lidském organismu se chová jako antagonist vápníku. Přibližně 90 % olova přijatého organismem se kumuluje v kostech, kde ovlivňuje negativně krevtvorbu (ruší syntézu hemoglobinu), a je proto příčinou anemických stavů. V období, kdy má tělo nedostatek vápníku (např. v období těhotenství), může se akumulované olovo z kostí mobilizovat, vstupovat do krevního řečiště a toxicky působit na další orgány. Dochází tak k poškození jater, ledvin a reprodukčního systému. Toxicky působí rovněž na nervový systém, zejména u dětí, kde může být příčinou jejich mentální retardace. Olovnaté ionty, podobně jako ionty dalších těžkých kovů, jsou karcinogenní. Olovo je zvláště nebezpečné pro těhotné ženy, protože podobně jako některé sloučeniny rtuti může přestupovat jinak velmi striktní ochrannou bariéru placenty a poškozovat nervový systém plodu nebo způsobit potrat. Pro lidský organismus je nejvíce rizikový vstup olova do organismu požitím, protože vede k nejvyšší zadrži tohoto xenobiotika (až 60 % přijatého množství oproti 30 % z inhalace). Jako antagonisté olova mohou působit preparáty na bázi zinku.

Do trofických řetězců se olovo dostává především z půdy absorpcí autotrofními organismy (obtížněji než kadmium). V přírodě existují některé typy rostlin, které jsou přístupné

příjmu značně vysokých koncentrací olova, aniž by byl poškozen jejich vývoj a růst. Autotrofy jsou následně konzumovány heterotrofními organismy a rezistentní ionty olova jimi přecházejí do dalších článků potravních cest. Byla zjištěna vysoká toxicita olova pro divoká zvířata.

Přes veškeré uvedené škodlivé účinky na lidský organismus je však olovo z celé skupiny těžkých kovů nejméně toxické vůči daňím (drobným koryšům), které jsou považovány za hlavní testovací organismy v monitoringu životního prostředí.

6.2. Arsen

Arsen se v životním prostředí vyskytuje v ovzduší, půdě i ve vodách²¹. V pitné vodě je přítomen ve formě svých rozpustných anorganických sloučenin. Organické komplexní sloučeniny mohou být součástí potravy mořských živočichů (koryšů). Používání pesticidů na bázi arsenu je důvodem přítomnosti tohoto polokovu v některých kulturních rostlinách, ale např. i ve vinných nápojích.

Arsen se vyskytuje jako doprovodný prvek nejčastěji v rudách mědi, stříbra a olova a při získávání těchto kovů z rud se uvolňuje do životního prostředí.

Sloučeniny arsenu jsou silně toxické s vysokou kumulativní schopností v organismech. Ukládají se v játrech a ledvinách, charakteristická je jejich akumulace ve vlasech, nehtech a kůži. Přestupují i přes jednu z nejpřísnějších ochranných bariér v těle – bariéru placenty, a mohou tak způsobovat teratogenní poškození plodu. Zasahují rovněž nervový systém. Otravu arsenem je možné identifikovat i senzoricke. Je totiž spojená s nadměrným rohovatěním kůže a její charakteristickou pigmentací (šedozelené zbarvení). Objevují se bílé proužky na nehtech a z dechu je cítit česnekový zápach. Obecně lze říci, že rozpustné anorganické sloučeniny arsenu jsou toxičtější než organické a trojmocná forma arsenu je nebezpečnější než pětimocná.

Podobně jako kationty ostatních těžkých kovů reaguje i trojmocný kationt arsenu s thiolovými skupinami enzymů. To je příčinou rušivých zásahů do metabolismu tuků a cukrů a následně blokace tvorby metabolické energie.

Arsen bývá označován jako protoplazmatický jed, protože může pronikat buněčnými membránami do protoplazmatického prostoru, a hluboce tak postihovat živou hmotu. Je klasifikován i jako kapilární jed, protože způsobuje propustnost stěn krevních kapilár.

Akutní otravy sloučeninami arsenu jsou spojeny s bolestmi hlavy, závratěmi a někdy velmi bouřlivými zažívacími potížemi, které mohou vyústit v selhání krevního oběhu a smrt organismu. Chronické otravy způsobují záněty kůže, trvalé zažívací potíže, aplastickou anémii a poškození nervového systému projevující se mimo jiné i mravenčením v končetinách. Nejzávažnějšími chronickými efekty jsou rakovina kůže a plic spojené s působením sloučenin trojmocného arsenu a dále účinky mutagenní a teratogenní.

Význačná je i ekotoxicita arsenu. Ve vysokých koncentracích je arsen toxický pro rostliny. Na polích ošetřovaných opakovaně pesticidy s obsahem arsenu se arsen zabudovává do půdy a způsobuje snížení úrodnosti kulturních rostlin, jako jsou např. ječmen nebo vaječnicka. Na arsen také citlivě reagují stromy. Na zvířata má trojmocný arsen teratogenní účinky a prokázána byla jeho škodlivost pro včely.

6.3. Selen

Selen patří mezi polokovy a pro významnou část biotiky se řadí k esenciálním prvkům. V lidském organismu je součástí metaloenzymů, působí jako účinný antioxidant²² a jeho přítomnost snižuje toxicitu kadmia, rtuti, methylrtuti, thalia a stříbra tím, že mění jejich metabolismus.

Selen je značně rozšířen v pedosféře, zvláště v sedimentárních typech hornin. Do životního prostředí se dostává při erozi půd a hornin a jeho přenos do biotiky je významně podpořen mikrobiální degradací.

Vyšší dávky selenu mohou působit toxicky, ale otravy lidí nejsou příliš běžné. Podstatně závažnější a frekventovanější jsou otravy zvířat, zejména skotu.

Do lidského organismu selen vstupuje prostřednictvím trofických řetězců jednak z obilných produktů, ale také z masných a mléčných výrobků. U člověka dochází k otravám selenem velmi zřídka. Příznaky těchto poměrně vzácných otrav jsou různé dermatitidy, poškození nehtů a zubů, vypadávání vlasů a zasažení nervového systému. Podstatně významnější je ekotoxicita selenu pro skot. K otravám většinou dochází v oblasti pastvin s podlozím obsahujícím vysoké koncentrace selenu. Rostliny na těchto podlozích poměrně snadno akumulují selen ve svých pletivech až do úrovně překračující práh toxicity pro pasoucí se skot. Zvířata pak trpí cirhózou jater, malformacemi kopyt, vypadáváním srsti, úbytkem váhy, ztrátou orientace v prostoru (chůze v kruzích) a mladí jedinci mohou oslepnout.

Biologicky dobře přístupnou formou selenu pro rostliny a zvířata jsou rozpustné selenany SeO_4^{2-} , které se běžně v přírodě za oxidačních podmínek v alkalickém prostředí tvoří. Anaerobní bakterie dokážou selenany redukovat na methylderiváty selenu, které jsou téžavé a mohou přecházet do atmosféry.

6.4. Měď

Měď je v životním prostředí zastoupena převážně ve formě svých rud, ale v některých případech i v ryzí formě a podobně jako zinek patří k esenciálním prvkům. Je součástí některých metaloenzymů, např. tyrosinasy, a její přítomnost je nutná pro funkci jiných, zejména oxidativních enzymů. Důležitá je rovněž pro bezchybný metabolismus železa v lidském organismu a její nedostatek může být příčinou zhoršené syntézy hemoglobinu a následně anemických stavů. Absorpci mědi organismem snižuje přítomnost zinku a kadmia v těle. Vyšší koncentrace mědi v organismu mohou vést naopak k vážnějším zdravotním potížím. Měď patří k akumulacím xenobiotikům a hromadí se především v játrech a kostní dřeni. Rozpustné soli mědi mohou kromě anemie způsobit i poškození jater a ledvin, případně zažívací potíže spojené s krvácením do zažívacího traktu.

Soubor zdravotních problémů souvisejících s chronickou akumulací mědi v játrech, ledvinách, mozku a oční rohovce je označován jako Wilsonova nemoc. Dochází k poškození uvedených orgánů a k jejich funkční nedostatečnosti.

Mankesova choroba je vyvolána negativním působením mědi na děti mladší než tři roky. U těchto dětí je poškozen nervový systém s následnou duševní i fyzickou retardací, v krajních případech končící smrtí.

Měď je nepříliš toxická pro zvířata a mírně toxická pro rostliny a řasy. Značnou toxicitu má tento kov pro nižší orga-

nismy typu plísní, bakterií a nižších hub. Z tohoto důvodu se používá zejména modrá skalice (síran měďnatý $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), někdy ve směsi s vápnem, jako fungicidní prostředek v zemědělství, např. k ošetření vinné révy.

6.5. Zinek

Je to relativně měkký kov namodralé barvy tvořící s ostatními kovy průmyslově důležité slitiny. Hojně využívané jsou zejména slitiny s mědí (mosazi) a slitiny s mědí a cínem (bronz). Dithiokarbamáty zinku byly používány při odvykací protialkoholní léčbě (antabus), avšak v současné době se od používání těchto preparátů upouští z důvodu podezření na jejich karcinogenitu.

Zinek patří k esenciálním prvkům, určitá nízká koncentrace tohoto prvku je nezbytná pro člověka, zvířata i rostliny. V organismech je součástí více než dvaceti metaloenzymů a dalších sto enzymů potřebuje zinek ke své funkci. Hraje také důležitou roli v metabolismu bílkovin a nukleových kyselin.

Metabolismus zinku mohou negativně ovlivnit některé léky. Jedná se zejména o chelatační činidla, ale také o některá antibiotika, např. penicilin.

Nedostatek zinku je závažný zvláště pro děti, u chlapců může způsobit poruchy při dospívání. Nedostatečná koncentrace zinku v těle může být příčinou neuropsychických abnormalit, dermatitid i vážného poškození imunitního systému. Velké expozice zinku mohou naopak vyvolat vážné zdravotní problémy. Rizikový je inhalační a orální vstup tohoto kovu do organismu. Po inhalaci par oxidu zinečnatého (většinou se jedná o profesní expozice) se s několikahodinovou latencí může projevit tzv. horečka z kovů. Typickými příznaky jsou únava, bolesti hlavy, kašel, vysoké teploty, dehydratace pocením a bílkoviny v moči. Příčinou je alergická reakce na bílkoviny denaturované právě působením dýmů oxidu zinečnatého. Tento typ intoxikace je známý i u řady dalších těžkých kovů, např. mědi, kadmia, rtuti, olova, niklu, cínu a železa.

Rozpustné sloučeniny zinku, např. síran zinečnatý nebo chlorid zinečnatý mají místní leptavé účinky. Jejich požití vyvolává žaludeční potíže, zvracení a průjemy.

Zinek je rozšířen ve všech abiotických médiích životního prostředí – atmosféře, půdě a vodě. Pro vodní organismy je zinek toxičtější než pro člověka, a to jak pro ryby, tak pro zooplankton. Efekt zinečnatých iontů je přitom větší v měkké vodě než ve vodě tvrdé. Rovněž fytoceenóza může být ve svém vývoji negativně ovlivněna vysokými koncentracemi zinečnatých iontů v půdním prostředí.

6.6. Kadmium

Je to měkký kov stříbritého lesku využívaný některými moderními technologiemi zejména pro svou vysokou odolnost vůči korozi. Na rozdíl od zinku, který často doprovází v různých zinkových rudách, však nepatří mezi esenciální prvky a na biotiku působí vysoce toxicky. Vzhledem k podobnému atomovému poloměru však může kadmium zinek nahrazovat v biochemických strukturách organismu, a tím může měnit jejich funkčnost (např. způsobit inaktivaci některých enzymů). Je jednou z příčin vysokého krevního tlaku, způsobuje poškození ledvin, reprodukčních orgánů, destrukci červených krvinek a může vyvolat i rakovinu plic. Kadmenné ionty jsou

rovněž příčinou křehnutí kostí, které při dostatečné akumulaci kadmia v těle vede až ke zborcení kostního skeletu.

Kadmium se vyskytuje přirozeně v půdě jako stopový prvek, přičemž kontaminací může být jeho koncentrace více než tisíckrát zvýšena. Některé průmyslové rostliny fungují jako hyperakumulátory kadmia, a mohou tudíž ve svých plechách tento kov oproti půdě mnohonásobně zakonzentrovat (např. sója, pšenice, některé druhy zeleniny). Jednou z těchto rostlin je i tabák, a to je příčinou nezanedbatelného výskytu kadmia v cigaretovém kouři. Kadmium je podobně jako ostatní těžké kovy značně kumulováno vyššími houbami, především hřibovitými. Tento kov se rovněž velmi dobře začleňuje do trofických řetězců. Soli kadmia mohou být vymyty z půd do vodního prostředí, kde se kadmium jeví jako vysoce toxický prvek vůči vodní biotice. Ve zvýšené míře kumulují kadmium ve svých organismech někteří mořští živočichové, zejména mušle, ústřice a krabi. V menší míře hromadí tento kov ryby.

U testovaných zvířat byly zaznamenány teratogenní účinky kadmia, přičemž bylo zjištěno pozitivní antagonistické působení zinku a selenu, které toxicitu kadmia snižovaly.

6.7. Rtuť

Patří k nejdéle známým toxickým kovům²³. Z hlediska toxikologického je velmi důležitá forma, ve které se rtuť vyskytuje. Charakteristickým toxickým působením se od sebe odlišují kovová rtuť, páry rtuti, anorganické sloučeniny rtuti a organické sloučeniny rtuti. Toxicita je navíc přímo ovlivněna délkou expozice. Rtuť se vyznačuje velmi silnou afinitou k síře. Proto se pevně váže na thiolové skupiny bílkovin včetně enzymů, a negativně tak ovlivňuje jejich funkčnost. Rovněž se váže na sérový albumin a hemoglobin, a tím poškozuje krevní buňky. Vazba rtuti na buněčné membrány může inhibovat aktivní transport živin, zejména cukrů, membránami a zvyšovat permeabilitu membrán pro draslík. Následkem nedostatečného transportu cukru do mozkových buněk může dojít k energetickému deficitu v těchto buňkách. Zvýšená propustnost membrán pro draslík způsobuje poruchy přenosů nervových impulzů z mozku.

Elementární rtuť je po požití často vyloučena bez dopadu na organismus. Jedná se o nejméně toxickou formu rtuti. Nebezpečí spočívá v možnosti převedení kovové rtuti methanogenními bakteriemi na velmi toxickou metylrtuť. Navíc se kovová rtuť kontinuálně odpařuje do ovzduší.

Páry rtuti jsou po nadechnutí rychle adsorbovány do krevního oběhu, kterým jsou dopraveny do cílového orgánu, mozku. Mírné expozice způsobují poškození centrálního nervového systému, které může vyvolat únavu, podrážděnost, nespavost, poruchy jemné motoriky včetně třesu končetin a poruchy paměti. Silné expozice mohou mít až smrtící účinek následkem závažného poškození plic.

Anorganické sloučeniny rtuti jsou mírně toxické, přičemž sloučeniny jednomocné rtuti (rtuťné) jsou obecně méně škodlivé než sloučeniny rtuti dvojmocné (rtuťnaté), především z důvodu jejich menší rozpustnosti ve vodě i v kyselém prostředí. Zvláště vnímavé jsou vůči účinkům rtuti děti, podobně jako v případě olova. Právě u dětí mohou být rtuťné sloučeniny příčinou tzv. růžové nemoci. Jde o hypersenzitivní reakci na tento typ látek způsobující hypersekreci potních žláz, světlouplachost, horečku, charakteristicky zbarvenou vyrážku (odtud název nemoci), otoky prstů, zduření mizních a slezinných

uzlin a rohovatění s následným olupováním pokožky. Anorganické sloučeniny rtuti mohou poškozovat rovněž ledviny. Pomocí mikroorganismů je lze převést na toxicitější organické sloučeniny rtuti.

Methylrtuť patří mezi nejnebezpečnější sloučeniny rtuti a vzniká z anorganických sloučenin působením methanogenních bakterií v anaerobním prostředí, např. v sedimentech sladkých i slaných vod. Protože je rozpustná ve vodě i v tucích, zůstává ve vodním prostředí, odkud přechází snadno do rybího masa. Methylrtuť v rybím masu je vydatným zdrojem rtuti pro potravní řetězec vedoucí až k člověku, přičemž v jednotlivých člancích řetězce dochází k jejímu zakonzentrování. Toxicita methylrtuti vyplývá především z její schopnosti přestupovat dvě z nejpřísnějších ochranných bariér v lidském organismu – plodovou placentu a hematocentrickou bariéru mezi krví a mozkem. Z tohoto důvodu patří methylrtuť mezi embryotoxické a mutagenní látky, a je tudíž nebezpečná zejména pro těhotné ženy, protože může vyvolat poškození plodu nebo spontánní potrat. Toxicitá je rovněž pro malé děti. U nich způsobuje především smyslové poruchy až úplné selhání některých funkcí (hluchota, slepota, ztráta chuti). U dospělých jedinců pak může vyvolat třes těla.

V ekosystémech je rtuť přítomna hlavně ve vodním prostředí, převážně ve formě již zmiňované methylrtuti. Sladkovodní i mořské ryby (např. tuňák, žralok) mají schopnost značně kumulovat rtuť ve svých tkáních. Od určité koncentrační hranice je pak pro tyto organismy toxická, přičemž sladkovodní organismy jsou méně odolné vůči tomuto kovu než organismy mořské. Příčinou je určitý obsah selenu v mořské vodě, který je antagonistou rtuti. Rtuť poškozuje i řasy a bezobratlé organismy, z nichž nejcitlivější vůči toxickým účinkům je dafnie.

V půdách, zejména humózních, je rtuť vázána do značně stabilních komplexů s organickými složkami. To je také příčinou nízké dostupnosti rtuti pro rostliny. Vyšší obsah rtuti byl však zaznamenán např. u některých obilnin.

6.8. Chrom

Vzhledem ke svým vlastnostem má chrom široké průmyslové využití. V živých organismech je ve stopovém množství významným esenciálním prvkem, a to zejména ve formě chromitého kationtu Cr^{3+} , na rozdíl od chromu šestimocného, který je klasifikován jako silně toxická látka. Sloučeniny šestimocného chromu jsou významné karcinogeny (vedou k rakovině plic), některé mají i mutagenní účinky, poškozují játra a ledviny a způsobují vnitřní krvácení. Mohou být rovněž příčinou alergických reakcí, projevujících se vesměs jako závažné dermatitidy.

Šestimocný chrom je klasifikován jako jeden z nejvýznamnějších kontaminantů životního prostředí, zejména atmosféry, ale i ostatních abiotických složek, jako je pedosféra a hydrosféra. Na rozdíl od chromitého kationtu, šestimocný kation Cr^{6+} je v životním prostředí velmi mobilní, a to zvláště v půdních vodách. Příznivou okolností je jeho možná detoxikace na Cr^{3+} některými organickými látkami, které mají redukční účinky. Pro většinu rostlin je šestimocný chrom značně toxický, při vysokém obsahu chromu v půdě klesá její úrodnost. Toxicita k rostlinám je ale pozitivní v tom smyslu, že se chrom obvykle neakumuluje v potravních řetězcích. Některé rostliny (včetně průmyslových, např. obilí) mohou přijmout

určitou koncentraci chromu z půdy, ale většinou ji zadrží ve svém kořenovém systému, a chrom tak nepřechází do dalších pletiv tvořících nadzemní části. Podle některých autorů rostliny vstřebávají chrom pouze v chelátované formě, a nikoliv anorganické sloučeniny chromu rozpuštěné v půdním prostředí.

Z potravin obsahují zvýšené množství chromu např. některé druhy koření, nerafinovaný cukr a maso. Malá množství chromu byla zjištěna v rybách, ovoci a rostlinných olejích.

6.9. Nikl

Nikl vykazuje výrazné toxické účinky na lidský organismus v některých sloučeninách, jako je chlorid, dusičnan, fosforečnan nebo síran. Zejména prach vznikající při zpracování různých niklových nebo poniklovaných součástí může být příčinou vzniku rakoviny plic nebo rakoviny nosní a krční sliznice. Mutagenita tohoto kovu však byla prokázána pouze u testovaných zvířat. Kontakt pokožky se sloučeninami niklu může vést k závažným dermatitidám, které mohou přecházet až do formy chronických ekzémů. Chronické otravy mají za následek poškození srdečního svalu, ledvin a centrálního nervového systému. Ženy jsou obecně k negativnímu působení tohoto kovu vnímavější než muži. Nezanedbatelným zdrojem niklu v lidském organismu mohou být i poniklované hlavice umělých kloubů a podobně jako u kadmia i kouření.

Nikl se může vyskytovat jako kontaminační složka ve všech typech abiotického prostředí – v atmosféře, hydrosféře i v pedosféře. Jeho zdrojem mohou být metalurgické provozy, ale i spalovny komunálního odpadu.

Kontaminace vodního prostředí niklem nebývá příliš výrazná, přičemž vodní řasy a bezobratlí živočichové kumulují tento kov více než ryby. Sladkovodní organismy jsou vůči toxicitě nikelnatých iontů obvykle citlivější než organismy mořské. V akvatických trofických řetězcích může docházet ke kumulaci niklu.

Znečištění půd niklem může být oproti vodám významnější s výrazným negativním dopadem na související fytoocenózu. Jde zejména o lokality v blízkosti hutí a rafinerií niklu, kde dochází často k úplné devastaci přirozené vegetace. Proto nikl obvykle nevstupuje do trofických řetězců vycházejících z autotrofních organismů.

7. Závěr

Kovy jsou v životním prostředí doslova všudypřítomné. Člověk kovy ani nestvořil, ani je nemůže chemicky destruovat. Může ale významně přispět jak k jejich zvýšené mobilitě v životním prostředí, tak k jejich lokální akumulaci v určitých částech zemského ekosystému. Sledování a hodnocení jejich obsahu v jednotlivých složkách životního prostředí se tudíž stává stále významnějším.

LITERATURA

1. Klassen C. D.: *Casarett and Doull's Toxicology*. Mc

- Graw-Hill Comp., Health Professions Division, New York 1996.
2. Manahan S. E.: *Environmental Chemistry*. Lewis Publishers, Boston 1990.
3. Harte J., Holdren Ch., Schneider R., Shirley Ch.: *Toxic A to Z*. University of California Press, Berkeley 1991.
4. Cockerham L. G., Shane B. S.: *Basic Environmental Toxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton 1994.
5. Kafka Z., Punčochářová J.: *EKO 1998*(5), 15.
6. Kafka Z., Kuraš M.: *Fresenius Environ. Bull.* 3, 407 (1994).
7. Kafka Z., Punčochářová J., Kuraš M.: *Toxicol. Environ. Chem.* 49, 57 (1995).
8. Kafka Z., Kuraš M.: *Encyclopedia of Environmental Control Technology*, sv. 10. *Heavy Metals in Soils Contaminated from Different Sources* (Cheremisinoff P. N., ed.), kap. 6, str. 175. Gulf Publ. Comp., Houston 1997.
9. Sborník přednášek *Mid America Toxicology Course*. National Institute of Public Health, Centre of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Prague and University of Kansas Medical Center, Kansas City 1994.
10. Nurnberg H. W.: *Pollutants and Their Ecotoxicological Significance*. Wiley, New York 1985.
11. Francis B. M.: *Toxic Substances in the Environment*. Wiley, New York 1993.
12. Kafka Z., Punčochářová J., Švadlenka J., Kuraš M.: *Toxicol. Environ. Chem.* 63, 119 (1997).
13. Sova Z.: *EKO 1997* (1), 17.
14. Marhold J.: *Přehled průmyslové toxikologie – anorganické látky*. Avicenum, Praha 1980.
15. Hommel D. G.: *Handbuch der gefährlicher Güter*. Springer, Berlin 1992.
16. Valenta V.: *Nika 1990* (3–4), 39.
17. Manahan S. E.: *Toxicological Chemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton 1992.
18. Weiner E. R.: *Application of Environmental Chemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton 2000.
19. Landis W. G., Ming-Ho Yu: *Introduction to Environmental Toxicology (Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems)*. Lewis Publishers, Boca Raton 1995.
20. Albert A.: *Xenobiosis: Foods, Drugs and Poisons in the Human Body*. Chapman and Hall, London 1987.
21. Pertold Z.: *Vesmír* 92, 323 (1998).
22. Kvíčala J., Lapčík O.: *Vesmír* 95, 193 (2002).
23. Heyrovský M.: *Vesmír* 94, 135 (2000).

Z. Kafka and J. Punčochářová (*Department of Environmental Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Toxicity of Heavy Metals in Nature**

A survey is given of heavy metals most frequently occurring in the environment, which are the main cause of its pollution. Attention is especially paid to potential penetration of heavy metals into the organism, their toxicity and affecting specific target organs. The sources of the environment contamination with particular heavy metals and their toxic effect on biotics are discussed.

VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE NA PRINCIPU MALDI-TOF PRO STUDIUM PROSTOROVÉ STRUKTURY PROTEINŮ

VOJTĚCH KADLČÍK, MILAN KODÍČEK
a MARTIN HASSMAN

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: kadlcikv@email.cz, milan.kodicek@vscht.cz,
martin.hassman@vscht.cz

Došlo dne 11.IV.2002

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, MALDI-TOF MS, prostorová struktura proteinů

Obsah

1. Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF
2. Charakterizace proteinů proteolytickým štěpením
3. Výměna vodíkových a deuteriových iontů
4. Specifické modifikace aminokyselinových zbytků
5. Identifikace posttranslačních modifikací
6. Disulfidová struktura proteinů
7. Přímá detekce nekovalentních komplexů
8. Závěr

1. Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF

V současné době dochází k prudkému nárůstu využití nových metod hmotnostní spektrometrie v oblasti biochemie. Jednou z nejvýznamnějších je v tomto směru metoda na principu MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight – MALDI-TOF MS).

Vzorek pro MALDI-TOF hmotnostní analýzu se připravuje smícháním analytu s přebytkem matrice, což je obvykle slabá organická kyselina. Směs se pak nanese na desku, která se po vysušení vzorku zasune do evakuovaného MALDI-TOF přístroje (obr. 1). K desorpci a ionizaci vzorku dochází ozářením krystalů směsi laserovým pulzem. Význam matrice spočívá v tom, že silně absorbuje laserové záření; teplotní relaxace excitovaných molekul matrice vede k jejímu vypařování, čímž dochází i k přechodu netěkavých molekul analytu do plynné fáze. Zároveň matrice působí jako ionizační činidlo, jelikož protonuje nebo deprotonuje analyt; nejčastěji přitom vznikají molekuly analytu s jednotkovým nábojem. Matrice i intenzita laserového záblesku jsou voleny tak, aby nedocházelo k fragmentaci molekul analytu.

Hmotnost iontu může být obecně určena změřením jeho rychlosti po urychlení v elektrickém poli. V TOF spektrometru se měří čas letu iontu převážně v oblasti s nulovým elektrickým polem po dodání definované kinetické energie. Pulzní laser používaný v MALDI je přitom ideální pro spojení s TOF spektrometrem, neboť přesně určuje okamžik vzniku iontu.

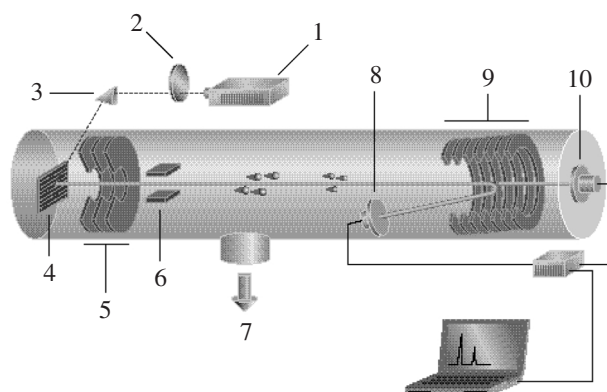
Detektor umístěný na konci separátoru pak měří čas letu každého iontu. Vzhledem k tomu, že částicím se stejným nábojem je urychlením v elektrickém poli dodána stejná kinetická energie, pohybují se lehké ionty rychleji než těžké. Vztah mezi dobou letu a hmotností iontu je popsán v rovnici (1), kde t je doba letu, U urychlovací napětí, z náboj iontu a m hmotnost iontu. Ze vztahu vyplývá, že skutečně měřenou veličinou není hmotnost, ale poměr hmotnost/náboj pro každý iont. Konstanta v rovnici (1) je pro každé měření určena kalibrací.

$$t = konst. \times \sqrt{\frac{m/z}{U}} \quad (1)$$

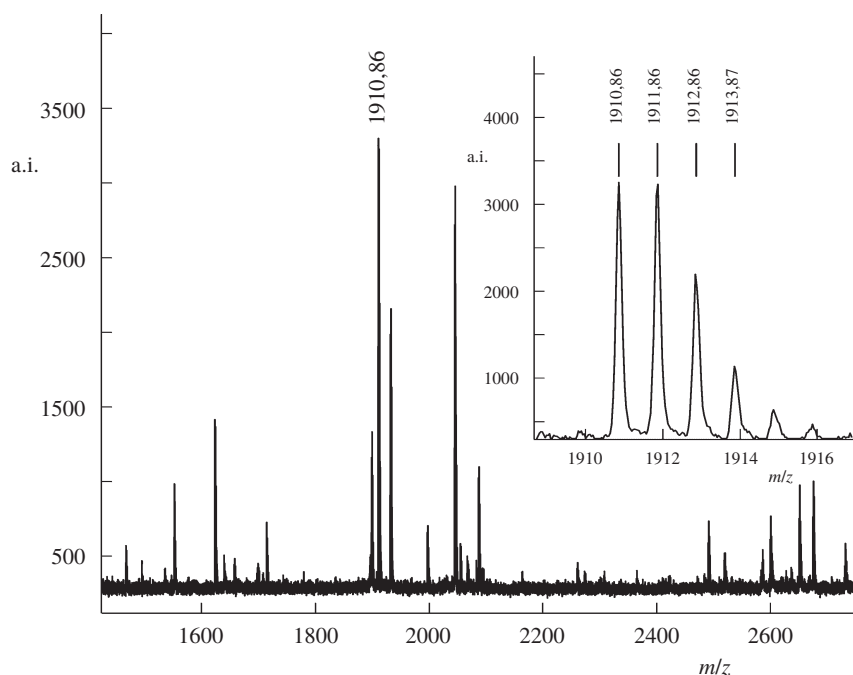
Současné MALDI-TOF spektrometry obsahují další prvky, které významně zvětšují rozlišení přístroje: zpožděnou extrakci iontů (delayed ion extraction) a reflektor. Zpožděná extrakce iontů, která spočívá v malém časovém posunu mezi desorpci vzorku (zábleskem laseru) a aplikací urychlovacího napětí, do značné míry vyrovnává rozdíly v původních rychlostech iontů, které vznikají v průběhu desorpce. Optimální časový posun ovšem závisí na hmotnosti iontu, proto nelze celý hmotnostní rozsah měřit najednou s maximálním rozlišením.

Reflektor využívá elektrostatického pole pro odrazení iontů na druhý detektor v malém úhlu k původnímu směru letu. Rozlišení se zvyšuje jednak prodloužením dráhy letu, jednak zaostřovacím efektem, neboť ionty se stejným poměrem hmotnost/náboj, ale vyšší kinetickou energií, proniknou hlouběji do reflektoru, čímž se prodlouží doba letu vůči iontům s nižší kinetickou energií. Měření v reflektorovém módu je velmi vhodné zejména pro detekci peptidů s molekulovou hmotností menší než 5000 Da. Dosahuje se zde fascinující přesnosti, dovolující bezpečně rozlišit molekuly lišící se např. o jeden neutron (izotopové rozlišení, obr. 2).

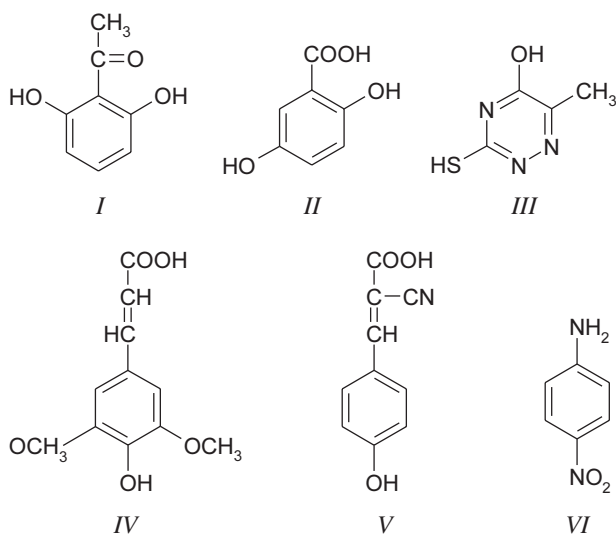
Zrod techniky MALDI-TOF MS lze datovat do roku 1989, kdy spojení ionizátoru MALDI a hmotnostního separátoru



Obr. 1. Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru; 1 – laser, 2 – regulační filtr, 3 – optický hranol, 4 – deska se vzorkem, 5 – urychlovací napětí, 6 – deflektor, 7 – vakuové pumpy, 8 – reflektorový detektor, 9 – reflektor, 10 – lineární detektor



Obr. 2. Příklad MALDI-TOF hmotnostního spektra. Lidský sérový albumin po redukcí disulfidových můstků, zablokování thiolových skupin jodacetamidem a štěpení trypsinem. Ve výřezu izotopové rozlišení peptidového iontu (MH⁺) o hmotnosti 1910,86 Da



Obr. 3. Strukturální vzorce matricí zmiňovaných v tomto článku; 2,6-dihydroxyacetofenon (I), 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (II), 6-aza-2-thiothymin (III), 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-skořicová kyselina (IV), α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (V), *p*-nitroanilin (VI)

TOF poprvé použili R. Beavis a B. Chait. Historie obou komponent je ale mnohem delší. Spektrometry TOF se začaly používat v 50. letech, ale kvůli špatnému rozlišení nebyly dále rozvíjeny, a na vývoji techniky MALDI začali její autoři F. Hillenkamp a M. Karas pracovat v roce 1971 (cit.¹). Jejich snaha byla motivována cílem vytvořit hmotnostní spektrometr pro měření spekter proteinů. Původní návrh, vypařování plazmy organického vzorku vysoce výkonným laserem, byl opu-

těn. V roce 1980 ale autoři poprvé upozorovali vliv matrice, když se podařilo současně zaznamenat spektrum alaninu a tryptofanu za podmínek, kdy očekávali pouze desorpci tryptofanu. Ten v dané směsi ovšem fungoval jako matrice pro alanin. Další vývoj šel cestou hledání nejvhodnější kombinace frekvence laseru a matricí, přičemž dnes nejpoužívanější dusíkový laser s vlnovou délkou 337 nm se v přístrojích objevil až po roce 1989; struktury matricí, o nichž je zmínka v tomto přehledu, jsou uvedeny na obrázku 3. Zvyšování rozlišení separátoru TOF bylo umožněno rozvojem digitální techniky, přelomovým okamžikem pak bylo znovuobjevení a využití zpožděné extrakce iontů v roce 1995.

V oblasti biologických věd je MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie v současné době využívána především k detekci a identifikaci proteinů², sekvenaci DNA (cit.³), identifikaci bodových mutací⁴, sekvenaci peptidů⁵ a identifikaci bakteriálních kmenů⁶.

Ke studiu prostorové struktury proteinů byla zpočátku technika MALDI-TOF MS využívána pouze ojediněle, avšak postupně bylo vyvinuto několik metod, přičemž téměř každou z nich lze použít ke studiu několika úrovní struktury proteinů (např. struktura aktivního místa enzymu nebo vazebného místa proteinu, posttranslační modifikace, stabilita proteinů, odhad prostorové struktury, tvorba nekovalentních komplexů). Z tohoto důvodu je následující přehled tříděn převážně podle principu metody s příklady jednotlivých použití.

2. Charakterizace proteinů proteolytickým štěpením

Základem pro identifikaci bílkoviny nebo získání podrobnějších informací o její struktuře pomocí MALDI-TOF MS je

specifické enzymové nebo chemické štěpení proteinu a měření hmotnostních spekter proteolytických štěpů. Jednotlivým píčkům ve spektru pak lze přiřadit sekvence peptidů, a to porovnáním hmotností štěpů získaných experimentálně s hmotnostmi odvozenými na základě znalosti primární struktury proteinů a štěpicích míst. Z tohoto důvodu je proteolytické štěpení součástí téměř všech dále uvedených metod. Nicméně už z průběhu samotného štěpení lze získat – vzhledem k jednoduchosti postupu – velmi zajímavé poznatky o stabilitě a konformaci proteinů. Nativní bílkoviny jsou obvykle odolné proti proteolýze, ale odolnost významně klesá již při částečném rozbalení molekuly^{7,8}. Studium časové závislosti proteolýzy lysozymu a cytochromu c v různých koncentracích guanidinydrochloridu bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací denaturačního činidla se nejen urychluje proteolýza, ale mění se také složení uvolňovaných fragmentů⁹. To umožňuje zřetelné rozlišení denaturačních stavů i při malých změnách koncentrace denaturačního činidla.

Obdobná metoda byla využita pro studium konformace Cdk inhibitoru p21 (cit.¹⁰), kdy bylo zjištěno, že koncentrace denaturačního činidla nemá vliv na průběh proteolýzy, a protein tudíž nemá rigidní strukturu. Omezením popsanych metod je samozřejmě stabilita proteolytického enzymu při denaturačních podmínkách, případně je nutné zohlednit pokles jeho aktivity.

Metody proteolytického štěpení bylo také využito při detekci konformačních změn UDP-N-acetylglukosaminolpyruvyltransferasy při vazbě substrátu¹¹, kdy dochází ke zvýšení odolnosti vůči štěpení způsobeném snížením flexibility proteinu.

Poněkud odlišnou aplikací této metody je mapování epitopu antigenu limitovanou proteolýzou komplexu antigen–protilátka¹². Protilátka blokuje přístup k epitopu, peptid tvořící epitop proto není na rozdíl od zbytku molekuly štěpen. Po odstranění proteolytických fragmentů a disociaci komplexu lze peptidy, účastnící se na výstavbě antigenní determinanty, s výhodou analyzovat technikou MALDI-TOF MS.

3. Výměna vodíkových a deuteriových iontů

Isotopová výměna se běžně používá při získávání informací o struktuře peptidů a bílkovin. Principem této metody je skutečnost, že amidové protony proteinu se mohou vyměňovat s protony rozpouštědla. Pokud rozpouštědlo obsahuje deuteriové ionty, dochází k izotopové výměně, ta je přitom rychlejší v povrchových amidových skupinách. Kromě NMR je hlavní detekční technikou výměny hmotnostní spektrometrie na principu elektropray ionizace (ESI MS). MALDI-TOF MS byla pro detekci výměny vodíkových iontů za deuteriové použita poprvé v roce 1998, modelovým proteinem byla cAMP-dependentní proteinkinasa¹³. Deuterace byla provedena přidávkou D₂O a po okyselení roztoku byl protein štěpen pepsinem. V kyselém prostředí je omezena zpětná výměna izotopů, která snižuje reprodukovatelnost experimentu, a díky tomu se podařilo detegovat zastoupení deuteria v jednotlivých proteolytických fragmentech, a tak odhadnout intezitu kontaktu jednotlivých částí molekuly proteinu s rozpouštědlem. Jiným přístupem k omezení zpětné výměny je použití deuterované matrice¹⁴. Metody výměny H/D bylo také použito pro detekci konformačních změn peptidů bradykininu, melittinu a hormo-

nu stimulujícího α -melanocyty při přidávku D₂O do roztoků uvedených peptidů v různých organických rozpouštědlech¹⁵. S rostoucí polaritou rozpouštědla docházelo k rozvolňování struktury peptidů, a tím i k intenzivnější izotopové výměně.

Stejně výsledky jako výměna H/D poskytuje postup opačný, kdy je protein plně deuterován za denaturačních podmínek a po renaturaci dochází k výměně D/H. Výhodou této metody je, že zpětná výměna neovlivňuje negativně výsledek, ale na druhou stranu je omezena na proteiny s vratnou denaturací¹⁴. Výměny D/H bylo využito k identifikaci vazebných míst pro ATP a inhibitor cAMP-dependentní proteinkinasy¹⁶. Protein je deuterován, zpětná výměna probíhá za přítomnosti ligandů. Po okyselení je protein štěpen pepsinem a proteolytické fragmenty analyzovány MALDI-TOF MS. Části peptidového řetězce, které se účastní vazby, jsou méně přístupné rozpouštědlu, zpětná výměna probíhá pomaleji a obsah deuteria v nich zůstane vyšší.

4. Specifické modifikace aminokyselinových zbytků

Použití MALDI-TOF MS pro detekci chemických reakcí představuje rychlou a efektivní metodu pro určování prostorové struktury proteinů. Obecný postup lze popsat následujícími kroky¹⁷: chemická modifikace proteinů, odstranění přebytku modifikačního činidla, štěpení proteinu specifickou proteasou, měření hmotnostních spekter proteolytických fragmentů a určení míst modifikace, interpretace dat ve vztahu k prostorové struktuře proteinu.

Modifikace histidinových zbytků v rhM-CSF- β (Recombinant Human Macrophage Colony-Stimulating Factor β) pomocí diethylpyrokarbonátu bylo využito ke zjištění úlohy histidinů v interakci ligand–receptor¹⁸. Tryptické štěpy rhM-CSF- β byly identifikovány MALDI-TOF MS, správnost identifikace byla ověřena Edmanovým odbouráváním po rozdělení na HPLC. Modifikace histidinových zbytků byla doprovázena 80–90 % ztrátou vazebné aktivity, což dokázalo účast histidinových zbytků ve vazebné interakci. Reaktivita jednotlivých histidinových zbytků s modifikačním činidlem se zvyšovala s jejich povrchovou dostupností vypočtenou na základě krystalografických údajů. Modifikační specifita diethylpyrokarbonátu a vliv reakčních podmínek pak byly testovány na inzulinu a angiotensinu II (cit.¹⁹). Studie ukázala, že již v malé molekule inzulinu jsou významné rozdíly v reaktivitě histidinových zbytků, které lze vysvětlit rozdílnými strukturálními povrchovými rysy. K detekci modifikací byla kromě MALDI-TOF MS použita ESI MS.

Chemické modifikace lysinových zbytků pomocí anhydridu kyseliny jantarové a jejich detekce MALDI-TOF MS bylo využito pro rozlišení konformačních stavů nativního a ve vodě rozpuštěného porinu *Rhodobacter capsulatus*^{20,21}. Bylo zjištěno, že při modifikaci nativního porinu dochází k sukcinylaci tří lysinových zbytků na vnitřní straně kanálu, zatímco modifikace ve vodě rozpuštěného porinu vede k sukcinylaci tří jiných lysinových zbytků, které jsou v nativním proteinu nepřístupné. Rentgenovou krystalografií bylo ověřeno, že modifikace nezpůsobuje změnu prostorové struktury porinu.

MALDI-TOF MS byla také testována pro detekci peptidů obsahujících nitrovaný tyrosin²². Předchozí výzkumy ukázaly, že hladina nitrovaných proteinů se zvyšuje při některých one-

mocněních, např. při Alzheimerově chorobě a atherosklerose. Modelové peptidy byly vytvořeny tryptickým štěpením hovězího sérového albuminu nitrovaného tetranitromethanem. Ukázalo se, že nitrované peptidy poskytují při měření specifickou sérii iontů, jejichž vznik je dán chemickými přeměnami nitrofenolu během desorpce a ionizace.

Informaci o vzájemných vzdálenostech povrchových aminokyselin lze získat použitím bifunkčních činidel, která vedou k prokřížení aminokyselinových zbytků. Bifunkční činidla pro lysin byla použita např. pro získání informací o struktuře CMP-NeuAc syntetasy, HIV-1 integrasy¹⁷ a acetylcholinového receptoru²³. Jako bifunkční činidlo byl použit bissulfosukcinimidylsuberát, respektive dimethylsuberimát. Bifunkční činidla mohou vytvářet i mezimolekulové vazby, přítomnost náhodně spojených peptidů by ovšem ztěžovala hmotnostní analýzu. Proto byla po modifikaci reakční směs přečištěna gelovou chromatografií²³.

Jako bifunkční činidla pro cysteinové zbytky byly testovány deriváty arsenitých kyselin²⁴ (melarsen oxid, 4-aminofenylarsenitá kyselina a pyridinyl-3-arsenitá kyselina), a to na redukovaném hovězím pankreatickém inhibitoru trypsinu a redukovaném peptidu oxytocinu. Proteolytické štěpení po modifikaci bylo provedeno přímo na MALDI-TOF terči přidáním roztoku enzymu. Nejlepším z použitých činidel se ukázal být melarsen oxid z důvodů vysoké rozpustnosti a také poměrně vysoké molekulové hmotnosti.

Obdobně lze MALDI-TOF MS použít pro určení míst modifikace u proteinů, které byly pro další použití stabilizovány prokřížením. Příkladem je identifikace míst modifikace oxyhemoglobinu, ve kterém byly lysinové zbytky prokříženy bis(3,5-dibromosalicyl) sukcinátem²⁵. Význam takto upravených hemoglobinů spočívá v možném využití jako krevní náhrady.

Metodu detekce chemických modifikací pomocí MALDI-TOF MS lze, podobně jako metodu proteolytického štěpení, využít k mapování epitopů²⁶. Výhodou metody modifikačních reakcí však je, že umožňují charakterizaci konformačních epitopů, nikoliv pouze lineárních. Jako modelový systém byl použit lysozym vaječného bílku a odpovídající monoklonální protilátka typu IgM. Použitými modifikačními reakcemi byla jodace tyrosinu, acetylace lysinu a modifikace argininu 1,2-cyklohexandionem. Epitop byl identifikován na základě rozdílů mezi modifikací komplexu antigen–protilátka, ve kterém jsou aminokyselinové zbytky epitopu chráněny proti modifikaci protilátkou, a modifikací samotného lysozymu. Přesnost vymezení epitopu je dána hustotou modifikovaných aminokyselin na povrchu proteinu a počtem provedených modifikací.

5. Identifikace posttranslačních modifikací

MALDI-TOF MS je také využívána k detegování proteinů modifikovaných *in vivo*, tedy k identifikaci posttranslačních modifikací. Určení míst posttranslačních modifikací pak přispívá k poznatkům o prostorové struktuře proteinů. Nutnou podmínkou je opět znalost primární struktury proteinů. MALDI-TOF MS a ESI MS byly použity k určení míst fosforylace a glykosylace hovězího chromograninu A z dřeneš nadledvinek²⁷ na základě porovnání hmotností proteolytických štěpů nativního a defosforylovaného nebo deglykosylovaného chromograninu A. Směs tryptických štěpů proteinu byla vzhledem

k velkému počtu štěpicích míst pro jednoznačnou identifikaci peptidů příliš složitá, proto bylo nejprve provedeno štěpení bromkyanem, rozdělení na koloně s reverzní fází a poté tryptické štěpení. Takto zjednodušené směsi bylo již možné přímo analyzovat hmotnostní spektrometrií.

Fosforylační místa kaseinomakropeptidu byla identifikována MALDI-PSD-MS (PSD – post source decay) (cit.²⁸). Ukázalo se, že fosforylované serinové zbytky jsou během PSD nestabilní, ztrácejí fosfátovou skupinu a fosfoserin se mění na dehydroalanin, který je ve spektru detegován. To je rozdíl oproti fosfotyrosinu, který je při PSD stabilní. Jiným příkladem je porovnání fosforylace parafusinu *in vivo* a *in vitro* peptidovým mapováním proteinu pomocí MALDI-TOF MS (cit.²⁹).

Jako příklad využití MALDI-TOF MS pro studium glykosylace lze uvést určení míst N-glykosylace a velikosti oligosacharidů kvasničné invertasy³⁰ nebo studium heterogenity glykosylace lidského interferonu γ (cit.³¹).

6. Disulfidová struktura proteinů

Disulfidová struktura proteinů je součástí jejich kovalentní struktury, ale zároveň vypovídá o prostorovém uspořádání proteinů, zejména u proteinů s velkým počtem disulfidových můstků. Disulfidovou strukturu proteinů s malým počtem cysteinových zbytků lze pomocí MALDI-TOF MS určit na základě analýzy proteolytických štěpů. Takto byly například identifikovány tři disulfidové můstky lidské β -hexosaminidasy B (cit.³²). Při vyhodnocování spekter proteolytických štěpů je ovšem nutné brát v úvahu zvláštní chování disulfidových vazeb během ionizace. Při použití α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny a 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny jako matric a při vyšších intenzitách laseru totiž dochází ke štěpení disulfidových vazeb a příslušné peptidy pak svými hmotnostmi odpovídají redukovaným³³.

Pro proteiny s velkým počtem disulfidových vazeb lze k jejich identifikaci využít kombinaci MALDI-TOF MS a N-koncové sekvenace peptidů. Touto metodou byla určena disulfidová struktura extracelulární domény lidského epidermálního receptoru pro růstový faktor, která obsahuje 25 disulfidových vazeb³⁴. Izolovaná doména byla štěpena bromkyanem a sérií proteas; po každém štěpení byly fragmenty izolovány pomocí HPLC a identifikovány hmotnostní spektrometrií a sekvenováním. Znalost disulfidové struktury umožnila navrhnout prostorový model domény.

7. Přímá detekce nekovalentních komplexů

MALDI-TOF MS byla dlouhou dobu považována za nevhodnou techniku pro detekci nekovalentních komplexů, a proto byla k tomuto účelu použita až v roce 1995 (cit.³⁵). Postupně se však metoda podařilo aplikovat k detekci komplexů protein–sulfonové barvivo^{36,37}, protein–kovový iont³⁵, protein–peptid^{35,38} a protein–protein^{38,39}. Hlavním problémem je zajistit, aby komplexy, které se tvoří v roztoku, byly zachovány i po vykrytalizování směsi vzorek–matrice na terči. Jak bude blíže popsáno dále, nejdůležitější obměnou standardního postupu přípravy vzorku je použití neutrální matrice nebo kyselé matrice neutralizované přidáním vzorku. Pro úspěšnou

detekci specifických komplexů protein–protein a protein–peptid je předpokladem zachování terciární struktury proteinu.

Komplexy několika modelových peptidů a proteinů se sulfonovými barvivy (Cibacron blue F3GA a Direct Yellow 50) byly detegovány pomocí MALDI-TOF MS za použití *p*-nitroanilinu jako matrice³⁶. Bylo dokázáno, že v komplexu interagují sulfonátový anion a kladně nabitě (bazické) postranní řetězce aminokyselin. Počet navázaných molekul barviva odpovídal počtu dostupných bazických skupin modelových molekul, a metodu je proto možno využít ke zjištění počtu povrchových bazických skupin proteinů. V návazné studii byla testována celá řada dalších sulfonátů³⁷. Zajímavé byly jednodušší sulfonáty (např. naftalen-1,5-disulfonová kyselina), které se vázaly pouze k argininu a kterých je tedy možné použít jako specifických „modifikačních“ činidel.

Neutrální roztok α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny byl použit jako matrice pro detekci komplexu zinečnatých iontů a zinek vázických peptidů (zinc finger peptides)³⁵. V kyselém prostředí totiž dochází k vytěsnění zinečnatého iontu z komplexu protony rozpouštědla. Ve stejné studii bylo použito neutrálního roztoku 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicové kyseliny jako matrice pro detekci komplexu enzym–substrát (aminopeptidasa I a peptid).

Další možností je použití 6-aza-2-thiothyminu jako matrice bez dalších organických rozpouštědel³⁸; pomocí níž byly detegovány nekovalentní komplexy RNasy S a dimerů některých peptidů (leucine zipper polypeptides).

Možnosti MALDI-TOF MS pro měření nekovalentních komplexů protein–protein byly studovány u proteinů tvořících v roztoku homooligomery (streptavidin, kvasničná alkoholdehydrogenasa a hovězí jaterní katalasa)³⁹. Jako nejvhodnější matrice se v tomto případě ukázal být 2,6-dihydroxyacetofenon rozpuštěný v tetrahydrofuranu (byl ale použit laser o vlnové délce 355 nm). Podařilo se detegovat tetramery všech tří proteinů, přičemž intenzita píku komplexu byla vždy větší než intenzita píku monomerů. Právě poměr intenzit je důležitý pro odlišení přirozených komplexů a aduktů, které běžně vznikají při měření. Intenzita píků těchto aduktů totiž bývá daleko menší než intenzita píku monomeru. Velmi zajímavou, ale těžko vysvětlitelnou skutečností, byla závislost charakteru spektra na způsobu měření. Pík komplexu byl totiž intenzivní jen při první stře laseru do jednoho místa; při dalších střelách jeho intenzita významně klesala. Přes úspěšnost detekce uvedených komplexů nelze popsání postup považovat za univerzálně použitelný, což lze ilustrovat skutečností, že se autorům nepodařilo detegovat velmi silný komplex streptavidin–biotin.

MALDI-TOF MS je také využívána k detekci komplexů protein–DNA. Jako matrice byly použity např. 6-aza-2-thiothymin⁴⁰ a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina⁴¹. Vzhledem k iontové povaze interakce protein–DNA je pro tvorbu komplexů opět určující zvolené pH (cit.⁴¹).

8. Závěr

Z uvedených příkladů vyplývá, že MALDI-TOF MS lze využít pro řešení širokého spektra problémů prostorové struktury proteinů. Výhodou těchto metod je zejména jejich rychlost a jednoduchost. Na druhé straně byly popsány metody často použity pouze pro omezený počet modelových proteinů

a aplikace na reálné problémy, případně spojení jednotlivých metod pro komplexní charakterizaci proteinů s neznámou strukturou, stále zůstává zajímavou výzvou.

Práce vznikla s podporou grantu Grantové agentury České republiky 203/02/0922.

LITERATURA

- Hillenkamp F., Karas M.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 200, 71 (2000).
- Lamer S., Jungblut P. R.: *J. Chromatogr., B* 752, 311 (2001).
- Wang B. H., Hopkins C. E., Belenky A. B., Cohen A. S.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 169/170, 331 (1997).
- Griffin T. J., Smith L. M.: *Trends Biotechnol.* 18, 77 (2000).
- Franzen J., Frey R., Holle A., Krauter K.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 206, 275 (2001).
- Baar B.: *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 193 (2000).
- Yang H. J., Tsou C. L.: *Biochem. J.* 305, 379 (1995).
- Fontana A., Zamboni M., Laureto P. P., Filippis V., Clementi A., Scaramella E.: *J. Mol. Biol.* 266, 223 (1997).
- Yang H. H., Li X. C., Amft M., Grottemeyer J.: *Anal. Biochem.* 258, 118 (1998).
- Kriwacki R. W., Wu J., Tennant L., Wright P. E., Siuzdak G.: *J. Chromatogr., A* 777, 23 (1997).
- Krekel F., Oecking C., Amrhein N., Macherous P.: *Biochemistry* 38, 8864 (1999).
- Water J., Deininger S. O., Macht M., Przybylski M., Gersgwin M. E.: *Clin. Immunol. Immunopathol.* 85, 229 (1997).
- Mandell J. G., Falick A. M., Komives E. A.: *Anal. Chem.* 70, 3987 (1998).
- Villanueva J., Canals F., Villegas V., Querol E., Avilés F. X.: *FEBS Lett.* 472, 27 (2000).
- Figueroa I. D., Russell D. H.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 719 (1999).
- Mandell J. G., Falick A. M., Komives E. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14705 (1998).
- Gibson B. W., Kuntz I. D., Tang N., Dollinger G., Oshiro C. M., Hempel J. C., Taylor E.: *PCT Int. Appl. WO* 2000-072004; *Chem. Abstr.* 134, 27293 (2001).
- Gocker M. O., Kalkum M., Yamamoto R., Schreurs J.: *Biochemistry* 35, 14625 (1996).
- Kalkum M., Przybylski M., Glocker M. O.: *Bioconjugate Chem.* 9, 226 (1998).
- Buhler S., Schnaible V., Glocker M. O., Michels J., Zeth K., Walte W., Przybylski M.: *Adv. Mass Spectrom.* 14, C017030/1 (1998).
- Walte W., Diederchs K., Przybylski M., Glocker M. O., Benz R., Breed J.: *NATO ASI Ser., Ser. C* 510, 239 (1998).
- Sarver A., Scheffler N. K., Shetlar M. D., Gibson B. W.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 439 (2001).
- Watty A., Weise C., Dreger M., Franke P., Hucho F.: *Eur. J. Biochem.* 252, 222 (1998).
- Happersberger H. P., Przybylski M., Glocker M. O.: *Anal. Biochem.* 264, 237 (1998).

25. Yang T., Horejsh D. R., Mahan K. J., Zaluzec E. J., Throck J. W., Gage D. A.: *Anal. Biochem.* **242**, 55 (1996).
26. Fiedler W., Borchers C., Macht M., Deininger S. O., Przybylski M.: *Bioconjugate Chem.* **9**, 236 (1998).
27. Bauer S. H. J., Zhang X., Dongen W., Clayes M., Przybylski M.: *Anal. Biochem.* **274**, 69 (1998).
28. Talbo G. H., Suckau D., Malkoski M., Reynolds E. C.: *Peptides* **22**, 1093 (2001).
29. Kussmann M., Hauser K., Kissmehl R., Brees J., Plattner H., Roepstorff P.: *Biochemistry* **38**, 7780 (1999).
30. Zeng C., Biemann K.: *J. Mass Spectrom.* **34**, 311 (1999).
31. Harmon B. J., Gu X., Wang D. I.: *Anal. Chem.* **68**, 1465 (1996).
32. Schuette C. G., Weisgerber J., Sandhoff K.: *Glycobiology* **11**, 549 (2001).
33. Patterson S. D., Katta V.: *Anal. Chem.* **66**, 3727 (1994).
34. Abe Y., Odaka M., Inagaki F., Schlessinger J., Kohda D.: *J. Biol. Chem.* **273**, 11150 (1998).
35. Woods A. S., Buchsbaum J. C., Worrall T. A., Berg J. M., Cotter R. J.: *Anal. Chem.* **67**, 4462 (1995).
36. Salih B., Zenobi R.: *Anal. Chem.* **70**, 1536 (1998).
37. Friess S. D., Zenobi R.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 810 (2001).
38. Glocker M. O., Bauer S. H. J., Kast J., Volz J., Przybylski M.: *J. Mass Spectrom.* **31**, 1221 (1996).
39. Cohen L. R. H., Strupart K., Hillenkamp F.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, 1046 (1997).
40. Lin S., Cotter R. J., Woods A. S.: *Proteins Suppl.* **2**, 12 (1998).
41. Tang X., Callahan J. H., Zhou P., Vertes A.: *Anal. Chem.* **67**, 4542 (1995).

V. Kadlčík, M. Kodíček, and M. Hassman (*Department of Environmental Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Utilization of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Study of Spatial Structure of Proteins**

MALDI-TOF MS, a technique developed in the late 1980's, is today a routine method for detection and identification of proteins but its utilization for study of spatial structure of proteins is ever-growing. The main approaches are detection of chemical and post-translational modifications of proteins, characterization of protein structure by proteolysis, detection of protium-deuterium ion exchange, characterization of the disulfide structure of proteins and direct detection of non-covalent complexes. MALDI-TOF is thus the technique that can replace some much more time-consuming and experimentally demanding methods but it can also afford information inaccessible by other methods.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYHODNOCENÍ KVALITY CUKROVKY POMOCÍ KRYSTALIZAČNÍCH TESTŮ S TĚŽKOU ŠTÁVOU

ZDENĚK BUBNÍK A PAVEL KADLEC

Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: zdenek.bubnik@vscht.cz

Došlo dne 23.IV.2002

Klíčová slova: výtěžnost cukru, kvalita cukrovky, krystalizační testy

Úvod

Jedním ze základních ukazatelů, jež charakterizuje úspěšnost získávání sacharosy z cukrovky, je výtěžnost bílého cukru. Z ekonomického pohledu je zapotřebí klást důraz na minimalizaci výrobních nákladů při maximální výtěžnosti. Na výtěžnost cukru má vliv celá řada faktorů, zejména technologická jakost cukrovky, technika použitá jak při sklizni, tak i při následném zpracování a technologická kázeň u zpracovatele v cukrovaru.

Technologickou jakostí cukrovky se rozumí komplex mnoha vlastností řepy, mezi které patří vedle chemického složení též vlastnosti biologické, fyzikálně-chemické i mechanické. Z biologických vlastností jsou to zejména: tvar, velikost a hmotnost bulvy, její vyzrállost, zdravotní stav, odolnost vůči skládkovým chorobám, aktivita enzymů (především invertasy) a mikrobiologická činnost. Z mechanických vlastností jsou důležité, jak z hlediska sklizně, dopravy a skladování, tak i vlastního zpracování: pevnost, pružnost a odpor k řezání. Konečně z fyzikálně-chemických vlastností se uplatňují při těžení a čištění šťávy pH řepné šťávy a její osmotický tlak.

Otázce technologické jakosti cukrovky se věnuje zvýšená pozornost jak ze strany pěstitelů, tak i cukrovarnických technologů u nás i v mezinárodním měřítku. Významné aktivity vyvíjí zejména mezinárodní organizace cukrovarnických technologů C.I.T.S., která má ustavenou sekci Technologická jakost cukrovky. Na zasedáních vědeckého výboru C.I.T.S., jsou pak prezentovány odborné referáty^{1,2} k tomuto tématu prakticky ze všech cukrovarnických významných zemí Evropy.

Chemické složení cukrovky má rozhodující vliv na kvalitu šťáv a je dáno zejména obsahem popelovin (tj. draselných a sodných solí), dusíkatých sloučenin (α -aminodusík, betain a jiné) a dále např. monosacharidů, organických kyselin aj. Z hlediska kvality cukrovky jsou nejdůležitější tzv. melasotvorné látky, jež mají schopnost zvyšovat rozpustnost sacharosy. Kvantitativně je melasotvornost (neboli míra zadržení cukru v melase) vyjádřena melasotvorným koeficientem ne-

cukrů MK . Je to bezrozměrné číslo vyjádřené hmotností cukru, kterou jednotka hmotnosti necukru zadržuje v melase. Z hlediska melasotvornosti se necukry rozdělují do tří skupin:

- silně melasotvorné ($MK > 2,4$)
- středně melasotvorné ($0,8 \leq MK \leq 1,1$)
- slabě melasotvorné ($MK < 0,8$)

K nejvíce melasotvorným necukrům patří sodík, draslík a α -aminodusík. Tyto látky se také nejvíce vyskytují v empirických vztazích, které jsou v různých zemích odvozovány s cílem kvantifikovat uvedené efekty. V našich předchozích pracích^{3,4} jsme uvedli přehled výpočetních vztahů, používaných pro výpočet teoretického zůstatku cukru v melase v závislosti na složení řepy a provedli rozbor dvou nejnámějších výpočetních vztahů, a sice Reinefeldova vzorce⁵ a nového Braunschweigskeho vzorce⁶.

Obecný tvar vztahu pro výpočet teoretického zůstatku cukru v melase v závislosti na koncentraci alkalických kovů a amidového dusíku lze vyjádřit rovnicí:

$$C_M = a [K + Na] + b [\alpha N] + c \quad (1)$$

kde C_M je teoretický zůstatek cukru v melase (hm.%, vztaženo na řepu), $[K + Na]$ – koncentrace iontů K^+ a Na^+ v řepě (mol/dt = mmol/100 g řepy), $[\alpha N]$ – koncentrace α -aminodusíku v řepě (mol/dt), a, b, c – empirické koeficienty.

Nejnámějším vztahem je Reinefeldův vzorec⁵:

$$C_M = 0,343 [K + Na] + 0,094 [\alpha N] - 0,31 \quad (2)$$

Výsledkem nákladného výzkumu, který byl organizován Zuckerinstitutem Braunschweig v Německu, byl tzv. nový Braunschweigskeý vzorec⁶ pro výpočet C_M , kde jako proměnné opět vystupují analytické hodnoty koncentrace iontů alkalických kovů a amidového dusíku v řepě:

$$C_M = 0,12 [K + Na] + 0,24 [\alpha N] + 0,48 \quad (3)$$

Vhodnost uvedených vztahů byla ověřována i pro naše podmínky⁴. Jak ukázaly vypočtené výsledky, pro aplikaci vztahů v podmínkách jiných zemí, a to platí i pro Českou republiku, je nezbytné provést zpřesnění vztahu rozsáhlým doplňováním provozních dat a jejich statistickým zpracováním nebo na základě vlastních experimentů.

V této práci shrnujeme rozsáhlé experimenty z oblasti hodnocení kvality cukrovky, které byly prováděny v minulém desetiletí na Ústavu chemie a technologie sacharidů VŠCHT ve spolupráci s VUC Praha, a. s. Výzkum byl založen na vlastní metodice, která vycházela z krystalizačních testů s těžkou šťávou. Dílčí výsledky výzkumu byly publikovány v několika předchozích sděleních⁷⁻¹⁰.

Experimentální část

Hlavní oblasti experimentální práce je možno shrnout do čtyř základních okruhů:

- vývoj metodiky na stanovení technologické kvality cukrovky,
- způsob výběru rajónů, odběru a zpracování vzorků,
- návrh, simulace a modelování krystalizačních postupů s těžkou šťávou, včetně vypracování potřebného software,
- vyhodnocení vztahů mezi teoretickým zůstatkem cukru v melase a složením cukrovky.

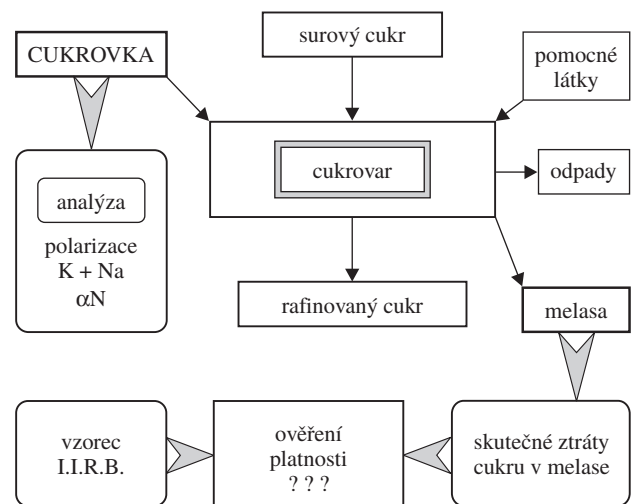
Vývoj a ověření metodiky byly základními a podmiňujícími parametry pro řešení zadaných cílů. Bylo nutno vyřešit především způsob vzorkování odpovídajících si vzorků řepy a těžké šťávy, navrhnout a realizovat krystalizační aparaturu včetně separačních a regulačních prvků, a konečně vyvinout software pro bilance, modelování, simulace, přípravu a vyhodnocování krystalizačních testů. Uvedený soubor úkolů byl řešen v průběhu celého projektu a na základě získaných výsledků byl neustále zpřesňován a zdokonalován. Celá metodika i její jednotlivé části a podpůrné programy byly již částečně publikovány^{8,9,11}, a proto budou v dalším textu zmíněny pouze hlavní principy.

Princip metody na stanovení technologické kvality cukrovky

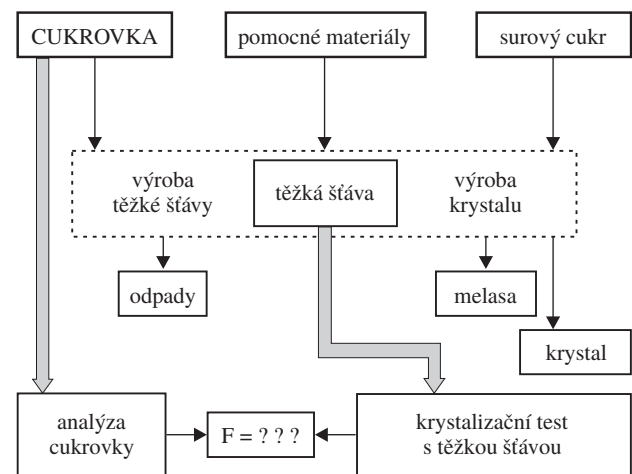
Základní úvahy při návrhu metody jsou graficky znázorněny na obrázcích 1 a 2. Na obrázku 1 je schematicky znázorněn standardní a dosud používaný postup zkoumání vlivu kvality řepy na výtěžnost v předcházejících pracích. Porovnání mezi složením řepy a odpovídající melasy je zatíženo značnou nepřesností, neboť časová diference mezi okamžikem zpracování řepy a získáním melasy je až několik dnů, což téměř znemožňuje získat zcela korespondující vzorky. Situace je dále zkomplikována faktem, že v některých cukrovarch je současně zpracováván surový cukr z jiných závodů a do procesu jsou vnášeny necukry s jiným složením. Tyto necukry též přecházejí spolu s řepnými necukry do melasy. Uvedené závěry vysvětlují příčiny velkých rozdílů mezi skutečnými ztrátami cukru v melase a mezi hodnotami vypočtenými z teoretických vztahů zahrnujících složení vybraných řepných necukrů, což ve svém důsledku brání uplatnění získaných poznatků v praxi.

Náš návrh řeší výše uvedené problémy způsobem, jenž je schematicky naznačen na obrázku 2. Jako meziprodukt plně charakterizující složení melasotvorných necukrů řepy a korespondující zpracovávané partii řepy, byla vybrána těžká šťáva. Zdržení mezi řepou a těžkou šťávou je jen několik hodin, a metoda tak umožňuje získat odpovídající si vzorky. Z dalších výhod je možno uvést, že složení necukrů není ovlivněno žádným cizím vstupem.

Hlavním procesem navržené metodiky je transformace těžké šťávy na melasu. Tento proces byl modelován podle skutečné průmyslové výroby v cukrovaru, tj. s cílem zachovat základní podmínky, při nichž výroba cukru probíhá. Podstatou procesu je dvoustupňová krystalizace, jejíž schéma je zobrazeno na obrázku 3. V prvním stupni probíhá krystalizace za izotermního odpařování, matečný sirob je po dosažení určité čistoty (příp. daného obsahu krystalů v cukrovině) odseparován a podroben analýze. Zbytek sirobu je podroben krystalizaci ve druhém stupni. Zde proces nejprve probíhá opět za izotermního odpařování a pak následuje chladicí krystalizace za atmosférického tlaku. Po dosažení rovnováhy se opět odseparuje matečný sirob (v tomto stupni odpovídá melase) a provede se jeho rozbor.



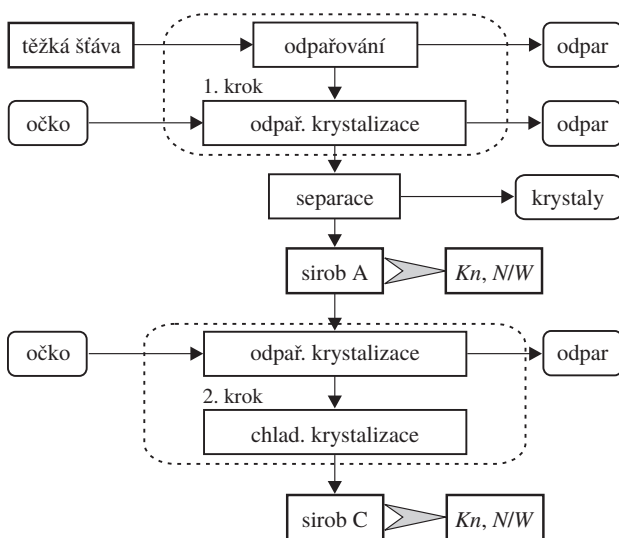
Obr. 1. Schéma postupu při vyhodnocování vztahu mezi složením řepy a výtěžností cukru



Obr. 2. Schéma metody navržené v této práci

Sacharizace S (rozpuštěná sušina v %) a polarizace P (obsah cukru v %) matečného sirobu v rovnovážném stavu, tj. rozpustnost sacharosy při dané teplotě a složení necukrů, je hlavním výstupem krystalizačních testů. Z těchto dat je vypočten koeficient nasycení Kn a poměr necukrů N/W . Koeficient nasycení Kn je definován jako poměr mezi rozpustnostmi sacharosy v technickém a v čistém cukerném roztoku při stejných podmínkách. Rozpustnosti jsou zde vyjádřeny jako hmotnostní poměry sacharosy a vody. Obsah nečistot, které se v cukrovarnictví nazývají necukry, se vyjadřuje jako hmotnostní poměr necukrů $N(\%)$ a vody $W(\%)$.

Pro každou zkoumanou těžkou šťávou je potřeba provést 6 až 8 krystalizačních testů v rozmezí koncentrací necukrů odpovídajících reálně dosahovaným hodnotám v praxi. Pomocí naměřených a vypočtených hodnot dvojic veličin Kn a N/W je pro každou těžkou šťávou vyhodnocen průběh tzv. rozpust-



Obr. 3. Navržené schéma krystalizačního procesu

nostní křivky (tj. závislost koeficientu nasycení Kn na poměru necukrů N/W):

$$Kn = A \cdot N/W + B + (1 - B) \cdot \exp(C \cdot N/W) \quad (4)$$

Další důležitou ideou navrženého postupu je výpočet čistoty melasy pro tzv. „standardní podmínky“, jež je možno definovat pro daný region (stát) a pro daný standardně používaný technologický postup výroby cukru. Pro podmínky České republiky navrhuje na základě dlouholetých technologických ukazatelů následující data: teplota $t = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, konečné přesycení matečného sirobu $Kp = 1,075$ a poměru necukrů $N/W = 2,4$. Koeficient přesycení Kp je definován jako poměr mezi koncentrací sacharosu v přesyceném a nasyceném cukerném roztoku. Koncentrace sacharosu jsou zde opět vyjadřovány jako hmotnostní poměry sacharosu a vody. V některých zemích EU je čistota při standardních podmínkách nazývána jako „Target Molasses Purity“ (TMP).

Hodnota stanovené čistoty melasy – TMP při zvolených standardních podmínkách je charakteristikou dané řepy a odpovídající těžké šťávy a může být tedy korelována s analytickými rozborů dané řepy a příslušné těžké šťávy. Bilančním výpočtem za použití vyhodnocené veličiny TMP a složení příslušné těžké šťávy je možno získat údaj o množství cukru v melase. Při zahrnutí výrobních ztrát, např. 0,6 hm.%, vztaženo na řepu, můžeme vypočítat výtěžnost bílého cukru z řepy. Vztahy získané v dostatečně rozsáhlého počtu měření umožňují pozvednout metodiku hodnocení kvality cukrovky na kvalitativně mnohem vyšší úroveň a poskytují řadu velmi cenných výstupů:

- nákup cukrovky podle skutečně získatelného cukru,
- ocenění sort cukrovky z hlediska šlechtitelského,
- volbu nejvhodnější odrůdy v daném rajonu,
- optimalizaci způsobu výživy cukrovky,
- vhodnost daného druhu cukrovky pro alternativní užití.

Způsob výběru rajónů, odběru a zpracování vzorků

Při výběru míst odběrů vzorků v cukrovarech bylo nutno brát v úvahu, zda výkup a zpracování cukrovky v cukrovaru jsou organizovány postupně podle jednotlivých pěstitelů. To znamená, že po určitou dobu (požadovány alespoň 2 směny) je zpracovávána řepa od jednoho dodavatele.

Dále bylo nutno sledovat, zda je v cukrovaru používán standardní způsob epurace (čištění šťáv), tj. bez změkčování šťáv výměnou iontů, bez přídavku MgO a dalších zásahů – např. přídavek fosforečnanu sodného na odparce, alkalizace šťáv a pod. Bylo nutno stanovit co nejpřesněji zdržení mezi vstupem řízků do extraktoru a výstupem odpovídající těžké šťávy z odparky.

Při vlastním odběru a zpracování vzorků se postupovalo následujícím způsobem:

- v době zpracování řepy od daného pěstitele byly po dobu 12 až 16 hodin odebrány v hodinových intervalech sladké řízky a po stanovené době zdržení po stejnou dobu a ve stejných intervalech vzorky těžké šťávy (1 kg šťávy za hodinu nebo 0,5 kg šťávy každých 30 minut),
- pro jednu vyhodnocovanou partii cukrovky se celkem odebralo 10 l šťávy, které se spojily do 1 vzorku. Pro lepší skladovatelnost byl vzorek konzervován formaldehydem a skladován v chladné místnosti,
- u řízků byla stanovena polarizace, α -aminodusík a popel, výluh byl dále skladován ve zmrazeném stavu pro pozdější stanovení obsahu alkalických kovů a zemin, betainu, redukujících látek (glukosy a fruktosy) a případně i dalších látek,
- u vzorků těžké šťávy byla stanovena sacharizace, polarizace a popel a část vzorku byla uchována pro další rozborů,
- byl sestaven grafický průběh jednotlivých sledovaných parametrů, a tím bylo možno zkontrolovat, zda se jedná o cukrovku s vyrovnanými vlastnostmi, a případně vyloučit část krajních vzorků.

Použité analytické metody vycházejí ze standardní metody pro cukrovarnické laboratoře¹².

Návrh, simulace a modelování krystalizačních postupů s těžkou šťávou včetně vypracování potřebného software

Rozhodujícím procesem celé vyvinuté metody jsou krystalizační testy s těžkou šťávou. Celý krystalizační proces i experimentální aparatura procházely během řešení projektu vývojem s cílem získat obecněji použitelnou metodu pro cukrovarnické laboratoře a dále zvýšit produktivitu práce, tj. zkrátit proces a provést v daném časovém úseku na daném zařízení co největší počet testů.

První návrh krystalizačního postupu zjednodušeným způsobem modeloval proces probíhající v průmyslových aparátech. Jednalo se o schéma, jehož blokový diagram je znázorněn na obrázku 3. V prvním stupni byl krystalizován sběrný vzorek těžké šťávy. Po zahuštění při $80 \text{ }^\circ\text{C}$ na přesycení 1,10–1,15 a zaočkování krystaly o střední velikosti 0,02–0,05 mm byla těžká šťáva navářena při stejné teplotě po dobu 4–5 h. Ze získané cukroviny (suspenze) byly odděleny 3 vzorky, které byly použity jako základ pro následné krystalizace ve druhém stupni. Krystaly byly tlakově odfiltrovány a získaný matečný

sirob byl použit k naváření ve druhém stupni, které probíhalo opět za podtlaku při 80 °C po dobu 3–6 h. Rovnovážného stavu pak bylo dosaženo následující chladicí krystalizací v závislosti na konečné čistotě matečného sirobu za 12–20 h. Po skončení pokusu byl nasycený matečný sirob separován na tlakovém filtru. Cílem tedy bylo získat 3 cukroviny, jejichž matečné siroby měly poměr necukry/voda v rozmezí hodnot 1,5 až 3,0 g necukrů na 1 g vody. Tento proces sice splnil zadané požadavky a byl úspěšně aplikován např. při řešení projektu⁷ GA ČR, ale na druhé straně byl velmi pracný a výsledná produktivita byla nízká. Vzhledem k výše popsaným důvodům byly studovány další krystalizační postupy. Jako nejlepší řešení byla vyhodnocena jednostupňová odpařovací krystalizace s periodickým odběrem tuhé fáze. Tato metoda⁸ zvýšila produktivitu práce na jedné laboratorní aparatuře na dvojnásobek, tj. během 1 týdne bylo možno provést na 1 zařízení krystalizační test se 4 různými těžkými šťávami.

Krystalizační aparatura a postup práce

Vyvinutá krystalizační aparatura umožnila studovat různé fáze a typy postupů při krystalizaci těžké šťávy i jiných technických cukerných roztoků, což umožnilo určitou optimalizaci při výběru a modifikacích navrhovaných postupů. Při těchto pracích byla získána řada cenných výsledků i v oblastech modelování a dynamické simulace procesů, vyhodnocování kinetických parametrů krystalizace a nukleace, počítačového monitorování a řízení krystalizačního procesu a hmotnostní a entalpické bilance procesů^{10,11,13}. Schéma použité laboratorní krystalizační aparatury a jeho podrobný popis, včetně pracovního postupu a způsobu odběru vzorků bylo detailně popsáno v práci⁸.

Postup při vyhodnocování výsledků

Z rozborů nasycených matečných roztoků byly vypočteny hodnoty koeficientů nasycení Kn a hmotnostního poměru necukrů a vody N/W . Regresní analýzou byly vypočteny koeficienty závislosti $Kn = f(N/W)$, nazývané též rozpustnostní křivka. Pomocí rozpustnostní křivky byla pro zvolené standardní podmínky vypočtena čistota „cílové“ melasy, TMP. Pro cukrovary v České republice byly navrženy podle dlouhodobých průměrných výsledků rozborů melas následující standardní podmínky: konečná teplota chlazení zadinové cukroviny 50 °C, koeficient přesycení $Kp = 1,075$ a hmotnostní poměr necukrů a vody $N/W = 2,4$ g necukrů na 1 g vody. Čistota TMP může sloužit buď přímo ke korelaci se složením např. těžké šťávy nebo může být použita k výpočtu teoretického zůstatku cukru v melase či výtěžnosti cukru z řepy nebo z těžké šťávy.

Výsledky a diskuse

Ověření metodiky na modelových vzorcích

O tom, že metodu krystalizačních testů je možné aplikovat na předpověď teoreticky dosažitelné výtěžnosti cukru z dané těžké šťávy, svědčí výsledky testů s modelovými roztoky těžké šťávy, ve kterých byl měněn obsah hlavních melasogenních necukrů – draslíku, sodíku, αN (reprezentovaného kyselinou

Tabulka I
Výsledky krystalizačních testů s modelovými roztoky těžké šťávy

Obsah látky [%]	Původní těžká šťáva	Přídavek			
		[K + Na] 100 %	[K + Na] 200 %	[Mg] 100 %	[αN] 100 %
K	0,47	0,94	1,41	0,47	0,47
Na	0,09	0,18	0,27	0,09	0,09
MgO	0,23	0,23	0,23	0,55	0,23
Kys. glutamová	0,030	0,030	0,030	0,030	0,060
Kys. asparagová	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006
Q_{TMS}	57,4	62,7	64,8	55,7	63,0

glutamovou a asparagovou) a také hořčíku. Výsledky jsou dokumentovány v tabulce I.

Přídavek melasogenních látek zvýšil rozpustnost sacharosu, což mělo za následek získání výsledného matečného sirobu o vyšší čistotě. Zdvojnásobení obsahu alkalických kovů vyvolalo zvýšení čistoty melasy z 57,4 na 62,7, ztrojnásobení obsahu těchto látek dále zvýšilo čistotu melasy na 64,8 %. Podobnou tendenci zvýšení čistoty vykázal též zdvojnásobený přídavek kyseliny glutamové a asparagové (zvýšení čistoty na 63,0 %). Opačný účinek prokázal přídavek MgO, kde výsledná čistota melasy poklesla na hodnotu 55,7 % oproti původnímu vzorku těžké šťávy.

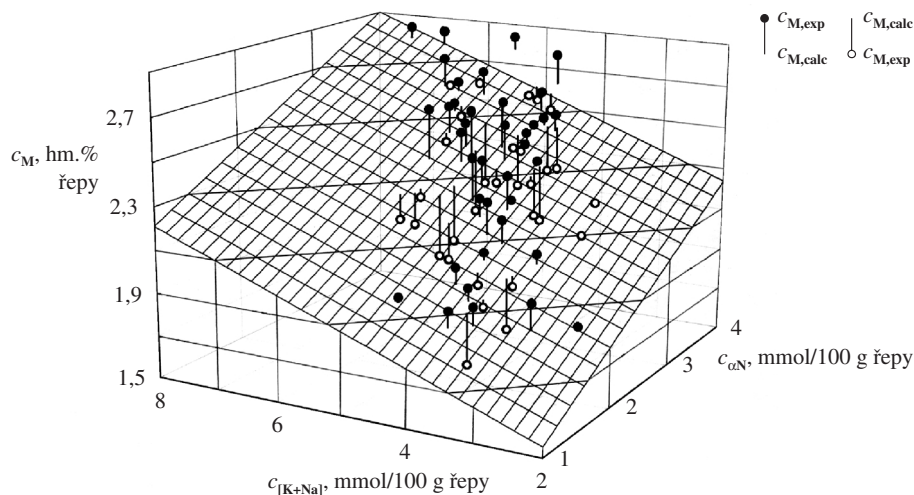
Vytvoření databanky pro pěstitele i zpracovatele cukrovky

Jedním z hlavních cílů práce bylo vyhodnotit vztah mezi teoretickým zůstatkem cukru v melase (výtěžností cukru) a složením cukrovky, pokud možno s co nejširším rozsahem platnosti. Proto bylo snahou vybrat cukrovary ve všech významných řepných rajónech Čech a Moravy. Měření probíhalo v následujících oblastech: severní Čechy (Žatecko), střední Čechy a Kolínsko, východní Čechy (Polabí), střední Morava (Haná), severní Morava a Slezsko.

Rozsáhlé experimenty byly prováděny v minulém desetiletí na Ústavu chemie a technologie sacharidů VŠCHT ve spolupráci s VUC Praha. Úvodní nejrozsáhlejší soubor dat byl získán při řešení grantového projektu⁷ GA ČR. Po ukončení projektu byla vzhledem k velké náročnosti pokusů v dalších letech prováděna jen jednotlivá měření určená k ověření získaných dat i v měnících se klimatických podmínkách. Celkem bylo odebráno 83 sérií vzorků řepy a těžké šťávy, což je dohromady více než 1700 vzorků. Jako série se rozumí 10 po sobě odebraných vzorků sladkých řízků a těžké šťávy, jež odpovídají jedné partii řepy – od jednoho dodavatele, z jednoho rajónu. Z každé série odebraných těžkých šťáv byl proveden jeden krystalizační test.

Vyhodnocení vztahů mezi výtěžností cukru z cukrovky a jejím složením

Výsledky rozborů odpovídajících si vzorků cukrovky a těžké šťávy a z krystalizačních testů s těžkou šťávou byly zpracovány statistickými metodami, především regresní a korelační



Obr. 4. Výsledky statistického zpracování naměřených dat pro závislost obsahu cukru v melase na obsahu draslíku, sodíku a α -aminodisíku

analýzou. Byly hledány a vyhodnocovány vztahy umožňující výpočet teoretického zůstatku cukru v melase (výtežnosti cukru) jako funkce složení rozhodujících melasotvorných necukrů obsažených v cukrovce (tj. koncentrace sodíku, draslíku a α -aminodisíku). Kromě těchto hlavních necukrů byl studován i vliv dalších látek, především betainu, redukujících látek (tj. glukosy a fruktosy) a některých kationtů. Obdobným způsobem byly hledány i vazby mezi složením cílové melasy a výtežností cukru z těžké šťávy.

Pro korelaci se složením cukrovky není hodnota čistoty cílové melasy TMP vhodná, protože nezahrnuje ztráty cukru ve výrobě. Proto bylo počítáno s poměrovými veličinami C_M nebo $C_{MT\check{S}}$ které udávají množství cukru přecházejícího do melasy. Obě uvedené veličiny byly vypočteny pomocí hmotnostní bilance za předpokladu, že množství necukrů v těžké šťávě a melase, jež z ní byla vyrobena, jsou z hlediska přesnosti těchto výpočtů shodné. Pro výpočet veličiny C_M je nutno dále uvažovat výrobní ztráty. Ve shodě se zahraničními zkušenostmi i naší praxí byla zvolena hodnota 0,6 % hmotnosti řepy.

V dalším textu budou uvedeny hlavní výsledky dosažené korelací.

Korelace mezi teoretickým zůstatkem cukru v melase C_M a složením cukrovky

Obsah draslíku a sodíku [K + Na] (mmol/100 g řepy)

Byla vyhodnocena závislost ve tvaru:

$$C_M = 0,19 [K + Na] + 1,38 \quad (5)$$

kde korelační koeficient $r = 0,60$, směrodatná odchylka $s = 0,23$ (10,1 %).

Konduktometrický popel A (%)

U této veličiny byla prokázána korelace a nalezený korelační koeficient dosáhl hodnoty 0,64, směrodatná odchylka $s = 0,28$ (12,1 %). Korelace byla provedena v návaznosti na

statistickou analýzu, která umožnila vyřadit data zatížená hrubou chybou, jejíž příčina nebyla během měření odhalena.

$$C_M = 6,01 A - 0,50 \quad (6)$$

α -Aminodisík αN (mmol/100 g řepy)

Průběh této závislosti ukazuje, že vliv α -aminodisíku je prokazatelný i při jeho samostatné korelaci s hodnotou C_M , a potvrzuje tak významný vliv tohoto necukru na výtežnost cukru:

$$C_M = 0,29 [\alpha N] + 1,47 \quad (7)$$

kde korelační koeficient $r = 0,74$ a směrodatná odchylka $s = 0,19$ (8,4 %).

Glukosa, fruktosa, vápník a betain

Pro doplnění této analýzy byly ještě zkoumány korelace mezi C_M a obsahy glukosy, fruktosy, vápníku a betainu v cukrovce. V žádném z uvedených vztahů se závislost prokázat nepodařilo.

Celkový výsledný vztah pro výtežnost

Koeficienty rovnice, vyjadřující závislost mezi teoretickým zůstatkem cukru v melase C_M a složením řepy byly vypočteny pro celý soubor experimentálních dat. Získaná výsledná rovnice má tvar:

$$C_M = 0,11 [K + Na] + 0,23 [\alpha N] + 1,10 \quad (8)$$

kde směrodatná odchylka $s = 0,17$ (7,4 %). Hodnoty naměřené i vypočtené z rovnice (8) jsou znázorněny v prostorovém grafu na obrázku 4.

Výsledky ukazují velmi důležitý závěr, že α -aminodisík má stoupající nepříznivý vliv na teoretický zůstatek cukru v melase, a tím na výtežnost cukru. Z číselných hodnot koefi-

cientů v rovnici (8) je zřejmé, že koeficient u $[\alpha\text{N}]$ je téměř dvakrát vyšší než u $[\text{K} + \text{Na}]$, což odpovídá dvojnásobně vyššímu efektu α -aminodusíku na výtěžnost, než je vliv koncentrace alkalických kovů.

Korelace mezi složením těžké šťávy a čistotou cílové melasy Q_{TMP}

U závislosti Q_{TMP} na koncentraci alkalických kovů $[\text{K} + \text{Na}]_{\text{TS}}$ v těžké šťávě byl vypočten korelační koeficient 0,65. Korelace mezi Q_{TMP} a obsahem redukujících látek RL, stejně jako mezi Q_{TMP} a obsahem betainu nebyla prokázána, korelační koeficient byl v obou případech menší než 0,3.

Korelace mezi složením těžké šťávy a teoretickým zůstatkem cukru v melase C_{MTS} (vztaženo na cukr v těžké šťávě)

Závislost veličiny C_{MTS} na koncentraci alkalických kovů $[\text{K} + \text{Na}]_{\text{TS}}$ v těžké šťávě se ukázala být, jak bylo očekáváno, ze všech sledovaných závislostí nejtěsnější. To dokazuje i hodnota korelačního koeficientu 0,70. U dalších sledovaných látek v těžké šťávě, tj. u betainu, redukujících látek a vápníku dosahovaly korelační koeficienty pouze hodnot nižších než 0,5.

Závěr

Pro vyhodnocení kvality cukrovky byla navržena a úspěšně ověřena experimentální metodika založená na krystalizačních testech s těžkou šťávou. Byl navržen standardní postup odběrů vzorků a jejich zpracování včetně programů pro přípravu, řízení a vyhodnocení testů. Metodiku je možno využít u šlechtitelů, pěstitelů i zpracovatelů cukrovky pro hodnocení technologické kvality cukrovky.

S využitím nově vyvinuté metodiky byla vyhodnocena kvalita cukrovky v různých rajónech ČR. Na základě dosažených výsledků je možno uvést tyto hlavní závěry:

- Statisticky byl prokázán vliv složení cukrovky a těžké šťávy na zůstatek cukru v melase, resp. závislost výtěžnosti cukru na koncentraci draslíku, sodíku a α -aminodusíku. Byla vyhodnocena rovnice umožňující vypočítat teoretický zůstatek cukru v melase ze složení cukrovky nebo těžké šťávy a dále i očekávanou čistotu cílové melasy.
- Významná korelace byla získána i mezi obsahem konduktometrického popela v cukrovce a těžké šťávě a výtěžností cukru.
- Vliv obsahu redukujících látek (glukosy a fruktosy), hořčičku a vápníku nebyl prokázán.
- Cukernatost řepy neprokázala statisticky významnou korelaci s výtěžností.
- Navzdory tomu, co vyplývá ze stávajících rovnic popisujících vztah mezi teoretickým zůstatkem cukru v melase, resp. výtěžností cukru, a složením cukrovky, byl nalezen výrazně stoupající vliv α -aminodusíku.

Při rozsáhlých experimentech byl získán cenný soubor dat, který má význam i jako dokument současného stavu kvality

cukrovky v ČR. Je možno získat i pohled na používané agrotechnické způsoby (např. hnojení), případně i na kvalitu různých odrůd a vliv půdních podmínek v daném rajónu. Všechny získané údaje jsou uloženy u autorů tohoto článku a jsou k dispozici jednotlivým závodům, pěstitelům i jiným zájemcům.

LITERATURA

1. *Proceedings of the 20th General Assembly of C.I.T.S., Munich, 26–30 June 1995*, str. 85. Verlag, Berlin 1996.
2. *Proceedings of the 21st General Assembly of C.I.T.S., Antwerp, 25–28 May 1999*. Verlag, Berlin 2000.
3. Brůhová P., Bubník Z., Kadlec P.: *Listy cukrov. rep. 111*, 153 (1995).
4. Kadlec P., Bubník Z.: *Listy cukrov. rep. 113*, 294 (1997).
5. Reinefeld E., Emmerich A., Baumgarten G., Winner C., Beiss U.: *Zucker 27*, 2 (1974).
6. Buchholz K., Märländer B., Puke H., Glattkowski H., Thielecke K.: *Zuckerindustrie 120*, 113 (1995).
7. Bubník Z.: *Závěrečná zpráva projektu GA ČR 510/93/0956* (1996).
8. Bubník Z., Kadlec P.: *12th Congress CHISA, Prague, 25–30 August 1996*.
9. Bubník Z., Kadlec P.: *Meeting of C.I.T.S., Marrakech, 15–18 June 1997*.
10. Bubník Z., Kadlec P.: *Proc. ACoFoP IV (Aut. Control of Food and Biological Processes). Gotenborg, 18–21 Sept. 1998*, str. 344.
11. Bubník Z., Kadlec P.: *Ind. Aliment. Agric. 113*, 536 (1996).
12. Friml M, Tichá B.: *Laboratorní kontrola cukrovarnické výroby*, díl A a B. VÚPP STIPP, Praha 1986.
13. Bubník Z., Kadlec P.: *12th International Conference on Crystal Growth ICCG-12, Jerusalem, 26–31 July 1998*. Book of Abstracts, str. 434.

Z. Bubník and P. Kadlec (*Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Quality Evaluation of Sugar Beet by Crystallization Tests with Thick Juice**

The article deals with the evaluation of sugar beet based on crystallization tests of thick juice. A standard methodology was developed of measuring the yield of sugar based on crystallization tests with thick juice, including programs for preparation, control and evaluation of tests and the relations between the composition of nonsugars in sugar beet and the sugar residue in molasses or the yield of sugar. The methodology can be utilized by cultivators and processors of sugar beet for evaluation of technological quality of sugar beet. A valuable result of the project is the extensive data bank of properties of sugar beet pertinent to current conditions of its cultivation in the Czech Republic. The data bank can be used by sugar beet cultivators, the sugar manufacture community and in projects dealing with new perspectives and potentials of sugar beet utilization.

OPTIMALIZACE METODY STANOVENÍ TRIMETHOPRIMU V PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK A MEDIKOVANÝCH KRMIVECH POMOCÍ HPLC

MICHAL DOUŠA

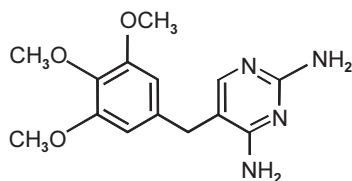
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Regionální laboratorní oddělení Plzeň
e-mail: michal.dousa@lo.zeus.cz

Došlo dne 13.VI.2001

Klíčová slova: HPLC, trimethoprim, krmivo, fluorescenční detekce

Úvod

Trimethoprim (obr. 1), 5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidin-2,4-diamin, se používá ve veterinární medicíně nejčastěji v kombinaci se sulfadiazinem, sulfadoxinem nebo sulfamethoxazolem v poměru 1:5 jako antibakteriální léčivo¹ a je účinný proti širokému spektru mikroorganismů. Jedním ze způsobů jeho podávání je jako součást finálního krmiva. Protože rezidua trimethoprimu mají nepříznivý vliv na člověka, zejména na chronicky nemocné, starší lidi a těhotné ženy, zaměřuje se většina analytických metod stanovení trimethoprimu na jeho stanovení ve vlastním léčivu nebo v dávce léčiva a dále ve zvířecích tkáních, mase a mléce²⁻⁷. Ke stanovení trimethoprimu ve vlastních léčivech nebo v dávce léčiva se používají spektrofotometrické metody⁸⁻¹⁰ nebo metody chromatografické^{11,12}. Metody stanovení trimethoprimu v krmivech se omezují většinou na simultánní stanovení trimethoprimu i příslušného sulfonamidu. Pro detekci 25 nebo 29 veterinárních léčiv používaných v krmivech jako profylaktika, resp. růstové stimulanty, byla aplikována metoda HPLC (cit.¹³). Hlavní výhodou této metody je rychlá identifikace jednoho nebo více těchto aditiv za použití dvou různých elučních systémů HPLC (gradientový a isokratický mód za použití mobilní fáze o složení acetonitril + voda + acetátový pufr) na reverzní fázi C8. K simultánnímu stanovení sulfadimidinu, sulfamethoxyypyridazinu a trimethoprimu v premixech těchto látek byla vypracována metoda HPLC s UV detekcí při 254 nm (cit.¹⁴). K extrakci trimethoprimu použili autoři přímo mobilní fázi acetonitril + 0,05 M-H₂SO₄ (11+39) a po naředění mobilní fáze se extrakt přímo použije k HPLC analýze v isokratickém módu. Metoda stanovení trimethoprimu a sulfadiazinu v medikovaných krmivech pro ryby byla



Obr. 1. Strukturální vzorec trimethoprimu

publikována v roce 1990 (cit.¹⁵). Sledovaná aditiva byla opakovaně extrahována methanolem a po spojení extraktů a naředění se extrakt použije přímo k HPLC analýze v isokratickém módu za použití mobilní fáze voda + acetonitril + HClO₄ (300+100+0,2) s UV detekcí při 230 nm. Jiná metoda stanovení trimethoprimu a sulfadiazinu v krmivech pro ryby používá extrakci 0,7 % trichloroctovou kyselinou v acetonu za působení ultrazvuku při 40 °C. Po naředění extraktu fosfátovým pufr (0,01 M-Na₂HPO₄, pH 3 + acetonitril (4+1)) se takto získaný extrakt použije přímo k HPLC analýze v isokratickém módu na reverzní fázi C18 za použití mobilní fáze 0,01 M-Na₂HPO₄, pH 2,8 (obsahující 0,1 % triethylaminu) + acetonitril (79 + 21) s UV detekcí při 270 nm. Jako interní standard se používá sulfadimidin. Výtěžnost metody je 100–105 % pro trimethoprim¹⁶. Nevýhodou obou předchozích metod stanovení trimethoprimu je velmi nízká hmotnost navážky vzorku použitého k analýze (1 g), která nemůže obsáhnout nehomogenitu finálního medikovaného krmiva při obvyklém dávkování trimethoprimu 32 mg.kg⁻¹. Navíc jsou obě předchozí simultánní metody stanovení trimethoprimu použitelné pouze pro koncentrace trimethoprimu vyšší než 250 mg.kg⁻¹. Z těchto důvodů jsme se rozhodli vyvinout takovou analytickou metodu, která by umožnila stanovení trimethoprimu v krmivech i pro nízké koncentrační úrovně trimethoprimu a zároveň snížila pravděpodobnost interference matrice.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepačce LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika). Přecházení extraktu bylo provedeno na separační jednotce Baker spe 12G System (J. T. Baker, USA) na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges C18 (500 mg), resp. OASIS poly(*N*-vinylpyrrolidon-*co*-divinylbenzen) (60 mg) (Waters, Milford, USA). Zakoncentrování extraktu bylo provedeno na koncentrátoru vzorků Termovap (ECOM, Česká republika). Odstředění extraktu bylo provedeno na laboratorní odstředivce Hermle Z 230 MR (Hermle, Gosheim, SRN). Všechna měření byla provedena na kapalinovém chromatografu, který se skládal z vysokotlaké pumpy W515, autosampleru W717 Plus Autosampler, spektrofotometrického detektoru W486, fluorescenčního detektoru W474 (vše Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Byla použita chromatografická kolona NovaPak C18, 4 μm, 3,9 × 150 mm (Waters, Milford, USA). pH roztoku bylo měřeno pH-metrem pH 526 (WTW, SRN) s kombinovanou skleněnou elektrodou, který byl kalibrován dvoubodovou kalibrací komerčně dodávanými pufrými CertiPUR pH 4,01 a pH 9,18 (Merck, SRN).

Chemikálie

Acetonitril a kyselina octová byly čistoty pro HPLC (J. T. Baker, USA), sodná sůl kyseliny hexan-1-sulfonové čistoty 98+ % (Sigma-Aldrich, USA), triethylamin p.a. (FLUKA, Švýcarsko), dichlormethan, methanol, kyselina sírová a chlorid sodný čistoty p.a. (Lachema Neratovice, Česká republika), octan sodný trihydrát, kyselina boritá, hydroxid sodný a kysel-

lina fosforečná čistoty UltraPure (Merck, SRN), *o*-ftaldialdehyd a 2-merkapt ethanol čistoty BioChemika (FLUKA, Švýcarsko).

Extrakční směs pro premixy byla připravena smísením 200 ml methanolu a 800 ml zředěné kyseliny sírové (0,15 mol.l⁻¹). Promývací činidlo pro extrakci na pevné fázi bylo připraveno smísením 5 ml methanolu a 95 ml vody. Extrakční roztok k extrakci kapalina–kapalina byl připraven smísením 450 ml zředěné kyseliny sírové (0,15 mol.l⁻¹) a 50 ml nasyceného roztoku chloridu sodného. Borátový pufr byl připraven rozpuštěním 2,47 g kyseliny borité ve 200 ml vody a pH bylo upraveno roztokem 1 mol.l⁻¹ NaOH na hodnotu 9,5. Derivatizační činidlo bylo připraveno rozpuštěním 100 mg *o*-ftaldialdehydu (OPA) v 9 ml methanolu; potom bylo přidán 1 ml borátového pufru, 100 µl 2-merkapt ethanolu a směs byla promíchána. Octanový pufr byl připraven rozpuštěním 19,05 g trihydrátu octanu sodného v 1000 ml vody a pH bylo upraveno kyselinou octovou na hodnotu 7,0.

Mobilní fáze I byla připravena smísením 170 ml acetonitrilu, 830 ml demineralizované vody (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, USA), 4 ml kyseliny fosforečné a 2 ml triethylaminu. V mobilní fázi se rozpustilo 0,9411 g sodné soli kyseliny hexan-1-sulfonové (0,005 mol.l⁻¹) a pH mobilní fáze se upravila triethylaminem na hodnotu pH 3,0.

Mobilní fáze II byla připravena smísením 180 ml acetonitrilu a 820 ml octanového pufru pH 7,0.

Kalibrační roztoky o koncentraci 4,0; 8,0; 16,0 a 40,0 mg.l⁻¹ byly připraveny postupným ředěním základního roztoku trimethoprimu (Riedel-deHaën, SRN) v methanolu o koncentraci 200 mg.l⁻¹ mobilní fázi.

Princip metody

Trimethoprim se extrahuje methanolickým roztokem kyseliny sírové nebo dichlormethanem pro premixy, resp. medikované krmné směsi. V případě premixů se extrakt se naředí, v případě finálních krmných směsí se přečistí reextrakcí zředěnou kyselinou sírovou a extrakcí na pevné fázi C18. Trimethoprim se stanoví na reverzní fázi s iontovými páry a UV detekcí při 271 nm.

Standardní operační postup

Vzorek se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo jeho přehřátí. 6 g zkušební vzorku premixu se extrahuje 150 ml extrakční směsí po dobu 30 minut v kónické baňce 500 ml na laboratorní třepačce. Takto připravený extrakt se odstředí 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu a po naředění mobilní fází se nanáší na chromatografickou kolonu. Při analýze medikovaných krmných směsí se postupuje následovně: 20 g zkušební vzorku krmné směsi se extrahuje 120 minut v Soxhletově extraktoru 150 ml dichlormethanu tak, aby během jedné hodiny došlo nejméně ke čtyřem přetokům dichlormethanu. Po této době se extrakce přeruší, dichlormethanový extrakt se odpaří pod proudem dusíku na poloviční objem a dichlormethanem se kvantitativně převede do odměrné baňky na 100 ml. Přečištění extraktu se provede reextrakcí trimethoprimu do zředěné kyseliny sírové (0,15 mol.l⁻¹) a následnou preseparací na pevné fázi C18. 40 ml získaného dichlormethanového extraktu se 4x reextrahuje 25 ml zředěné kyseliny sírové (0,15 mol.l⁻¹), při-

čemž tyto extrakty se jímají v odměrné baňce na 100 ml. Zbytky dichlormethanu se odfoukají při teplotě asi 50 °C proudem dusíku a odměrná baňka se doplní vodou po značku. Na kolonku C18 kondicionovanou 5 ml methanolu a 5 ml vody se pipetuje 5,0 ml extraktu. Kolonka se promyje 5 ml promývacího činidla (methanol + voda, 5+95) a zbytky promývacího činidla se odstraní proudem vzduchu asi 1 minutu. Trimethoprim se eluuje 2 ml methanolu do odměrné baňky na 2 ml. Eluát se odpaří pod proudem dusíku při 55 °C téměř k suchu a odparek se rozpustí v mobilní fázi. Takto připravený extrakt se odstředí 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu a dávkuje na chromatografickou kolonu. Podmínky pro HPLC jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
Podmínky pro HPLC

Parametr	Hodnota
Průtok mobilní fáze	0,8 ml.min ⁻¹
Teplota kolony	38 °C
Detektor UV	271 ^a nm (288 ^b nm)
Objem nástřiku	25 µl
Kolona	NovaPak C18, 4 µm, 3,9 × 150 mm

^a Pro mobilní fázi I, ^b pro mobilní fázi II

Derivatizace trimethoprimu

Ke zvýšení selektivity a citlivosti je možné použít předkolonovou derivatizaci trimethoprimu *o*-ftaldialdehydem. Reakční mechanismus derivatizační reakce byl již popsán a je možné použít předkolonové derivatizace¹⁷ nebo derivatizace za kolonou¹⁸ za vzniku derivátů s excitačním maximem mezi 330 až 360 nm a emisním maximem 450 nm. Předkolonová derivatizace trimethoprimu byla uskutečněna v odměrné baňce na 2 ml následovně: ke 100 µl standardu nebo vzorku se přidalo 200 µl borátového pufru, 100 µl roztoku derivatizačního činidla OPA, vše se promíchalo a počkalo se 200 s. Poté se směs neutralizovala 100 µl 0,75 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové, doplnila vodou po značku a promíchala. K separaci derivátů byl použit lineární gradient mobilní fáze A od 55 % do 80 % z 0 do 10 minut při teplotě 38 °C, poté byl gradient vrácen během 1 minuty na počáteční hodnotu a kolona ekvilibrována 5 minut. Jako mobilní fáze A byla použita mobilní fáze o složení acetonitril + voda (60/40, v/v) a mobilní fází B byl octanový pufr pH 7,0. Gradient mobilní fáze ani teplota nebyly optimalizovány.

Výsledky a diskuse

Správnost a přesnost

Vzhledem k tomu, že certifikované referenční materiály nejsou dostupné, byla správnost metody (těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Byly připraveny modelové vzorky krmiva (45 % pšenice, 25 % ječmen, 12 % sójový extrahovaný šrot, 8 % masokostní moučka, 5 % úsušky píce a 5 % vápenec)

s přidavkem trimethoprimu o koncentrační hladině 15, 25, 35 a 45 mg.kg⁻¹. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5x. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti $P = 0,95$) jsou uvedeny v tabulce II. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 15 až 45 mg.kg⁻¹ je (99,4±5,7) %. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí lineární regrese. Očekávané hodnoty byly považovány za nezávisle proměnné, nalezené hodnoty za závisle proměnné. Konstanta a regresního vztahu (konstantní soustavná odchylka) má hodnotu 1,4021±3,6194 a statisticky se neliší od nuly. Konstanta b regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu 0,9403±0,1117 a neliší se statisticky od jedničky. Metoda poskytuje správné výsledky.

Tabulka II

Výtěžnost metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry pro vzorky krmných směsí (hladina významnosti $P = 0,95$)

Statistické parametry	Hodnota			
Očekávaná hodnota [mg.kg ⁻¹]	16,3	25,2	34,8	45,7
Nalezená hodnota [mg.kg ⁻¹]	17,1	24,5	34,5	44,4
Výtěžek metody [%]	104,6	97,0	99,1	97,0
Interval spolehlivosti [%]	2,8	3,0	2,0	2,8
Relativní směrodatná odchylka [%]	0,30	0,46	0,44	0,79

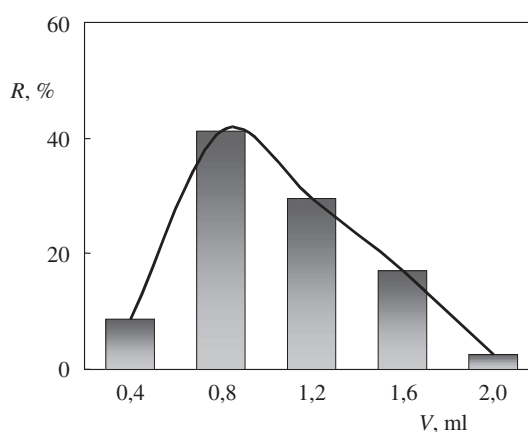
Volba přečištění extraktu

Byla sledována výtěžnost extrakce kapalina–kapalina v systému dichlormethan –0,15 mol.l⁻¹ kyselina sírová, spotřeba desorpčního činidla a výtěžek extrakce na pevné fázi.

Pro výpočet výtěžku extrakce kapalina–kapalina byl stanoven distribuční koncentrační poměr $D_c = 81,6$. Pro poměr objemu obou fází $r = 0,625$ je výtěžek dělení $R = 0,981$ pro jeden stupeň extrakce $n = 1$. Pro kvantitativní výtěžek trimethoprimu $R = 0,9999$ je nutný počet stupňů extrakce $n = 2,33$ při zachování stejného poměru objemu obou fází. Ze získaných experimentálních dat je zřejmé, že při výše uvedených podmínkách extrakce trimethoprimu extrakcí kapalina–kapalina je výtěžek extrakce kvantitativní.

K přečištění extraktu na pevné fázi byly zkoumány dva chromatografické systémy – extrakce na pevné fázi C18 a OASIS. Postup extrakce byl u obou sorbentů stejný, ale protože jsme u pevné fáze OASIS použili pouze 60 mg sorbentu, byly vzhledem k nižší sorpční kapacitě sníženy objemy extraktu a promývacího činidla na 1 ml. Průměrný výtěžek extrakce ze tří měření na sorbentu C18 byl 98,4 % a na sorbentu OASIS pouhých 71,8 %, proto jsme dále optimalizovali pouze extrakci na sorbentu C18. Spotřeba desorpčního činidla je patrná z elučního profilu trimethoprimu z pevné fáze C18 (obr. 2). Měřením bylo zjištěno, že ke kvantitativní desorpci trimethoprimu postačují 2 ml methanolu.

Přesnost metody (míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek) byla pouze omezena na výpočet opakovatelnosti, která byla vypočtena ze směrodatné odchylky rozpětí obou paralelních stanovení reálných vzorků, jejichž celkový počet byl 15.



Obr. 2. Eluční profil trimethoprimu na pevné fázi Sep Pak Silica (R – výtěžnost, V – objem desorpčního činidla)

Po vyloučení odlehlých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 22,0 až 34,0 mg.kg⁻¹ má opakovatelnost hodnotu 2,3 mg.kg⁻¹.

Optimalizace extrakce pevná fáze – kapalina

Extrakce byla optimalizována sledováním výtěžku extrakce při změně poměru navážky a objemu extrakčního činidla a doby extrakce. Tato optimalizace byla provedena pouze u premixů doplňkových látek, ve kterých je koncentrace trimethoprimu řádově 200–500x vyšší než ve finálních medikovaných krmivech. Byl připraven modelový vzorek premixu trimethoprimu o koncentrační hladině 23 000 mg.kg⁻¹. Poměr navážky a objemu extrakčního činidla byl upravován změnou objemu extrakčního činidla při konstantní hmotnosti navážky 5 g. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 3x. Z experimentu je zřejmé, že již od doby extrakce 10 minut dostáváme kvantitativní výtěžky trimethoprimu pro poměr navážky a objemu extrakčního činidla 1:25 až 1:50.

Optimalizace mobilní fáze

Mobilní fáze byla optimalizována tak, aby kapacitní poměr byl $k \geq 2,5$, počet teoretických pater $N \geq 5 000$ a asymetrický faktor $t_a \leq 1,2$. V obou mobilních fázích byl sledován vliv koncentrace acetonitrilu a u mobilní fáze I vliv koncentrace iontového páru (protiiontu) v mobilní fázi na kapacitní poměr a vliv pH mobilní fáze na retenční faktor.

Vliv koncentrace organického rozpouštědla ϕ (vyjádřeného jako molární zlomek) v mobilní fázi na retenční faktory chromatografované látky k byl popsán rovnicí¹⁹:

$$k = k_a 10^{-m\phi} \quad (1)$$

kde retenční faktor k_a je retenční faktor v čisté vodě jako eluentu, získaný extrapolací experimentálních údajů a m je parametr přímo závislý na síle organického rozpouštědla a považován za konstantu. V logaritmické formě přejde rovnice na tvar

$$\log k = \log k_a - m\phi \quad (2)$$

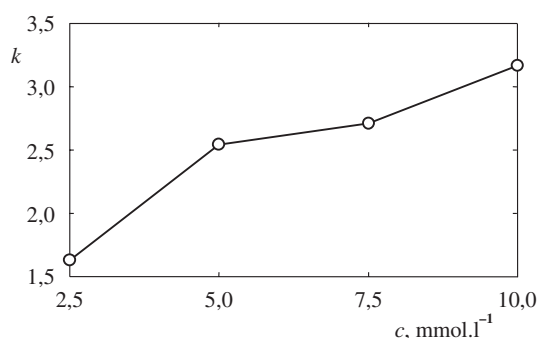
a logaritmy retenčních faktorů se snižují s klesající koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi. Experimentálně byla zjištěna lineární závislost mezi koncentrací acetonitrilu (v koncentračním rozmezí $\varphi = 0,14$ až $0,22$) a logaritmem retenčního faktoru a rovnice pro mobilní fázi I má tvar $\log k = 2,129 - 9,638 \varphi$, korelační koeficient $r = -0,9997$. Pro mobilní fázi II má rovnice tvar $\log k = 1,920 - 8,2942 \varphi$, korelační koeficient $r = -0,9971$.

Vliv koncentrace protiiontu na retenční faktor byl sledován pro látkové množství 2,5; 5,0; 7,5 a 10 mmol.l⁻¹ sodné soli kyseliny hexan-1-sulfonové v mobilní fázi. Podle předpokladu retence trimethoprimu roste s koncentrací protiiontu a optimální koncentrace leží v rozmezí 5 až 7,5 mmol.l⁻¹, kdy se mění retence trimethoprimu vlivem koncentrace protiiontu nejméně (obr. 3).

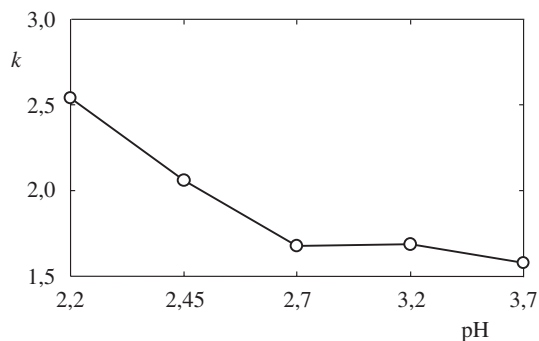
Tabulka III

Porovnání chromatografických charakteristik optimalizovaných mobilních fází

Chromatografická charakteristika	Mobilní fáze	
	I	II
Retenční čas [min]	4,96	4,89
Retenční faktor k	2,54	2,49
Počet teoretických pater N	5 500	5 900
Asymetrický faktor t_a	1,11	1,15



Obr. 3. Vliv koncentrace c protiiontu sodné soli hexan-1-sulfonové kyseliny v mobilní fázi na retenční faktor k trimethoprimu



Obr. 4. Vliv pH mobilní fáze na retenční faktor k trimethoprimu

Při sledování vlivu pH mobilní fáze na retenční faktor trimethoprimu bylo pH mobilní fáze upraveno vždy triethylaminem nebo kyselinou fosforečnou na požadovanou hodnotu. Optimální pH mobilní fáze leží v oblasti pH 2,7 až 3,7, kdy nedochází ke změně retence trimethoprimu (obr. 4). Vliv pH mobilní fáze II na retenční faktor trimethoprimu nebyl optimalizován.

Teplota separace nebyla optimalizována. Porovnání chromatografických parametrů pro obě optimalizované mobilní fáze je uvedeno v tabulce III.

Linearity

Neznámé koncentrace byly vyhodnocovány z kalibrační přímky. Při výpočtu hodnot koeficientů a , b se vycházelo z platnosti modelu regresní závislosti, který předpokládá konstantní rozptyl pro všechny hodnoty závisle proměnné, použitím metody nejmenších čtverců. Rovnice kalibrační přímky má pro mobilní fázi I tvar: $plocha = (6\,265 \pm 927) + (24\,809 \pm 42) \times koncentrace$ (mg.l⁻¹), korelační koeficient $r = 0,99999$; pro mobilní fázi II má rovnice kalibrační přímky tvar: $plocha = (-5\,863 \pm 2\,568) + (31\,12280) \times koncentrace$ (mg.l⁻¹), korelační koeficient $r = 0,99999$. Kalibrační přímky jsou lineární v rozsahu 0,1–1,0 mg.

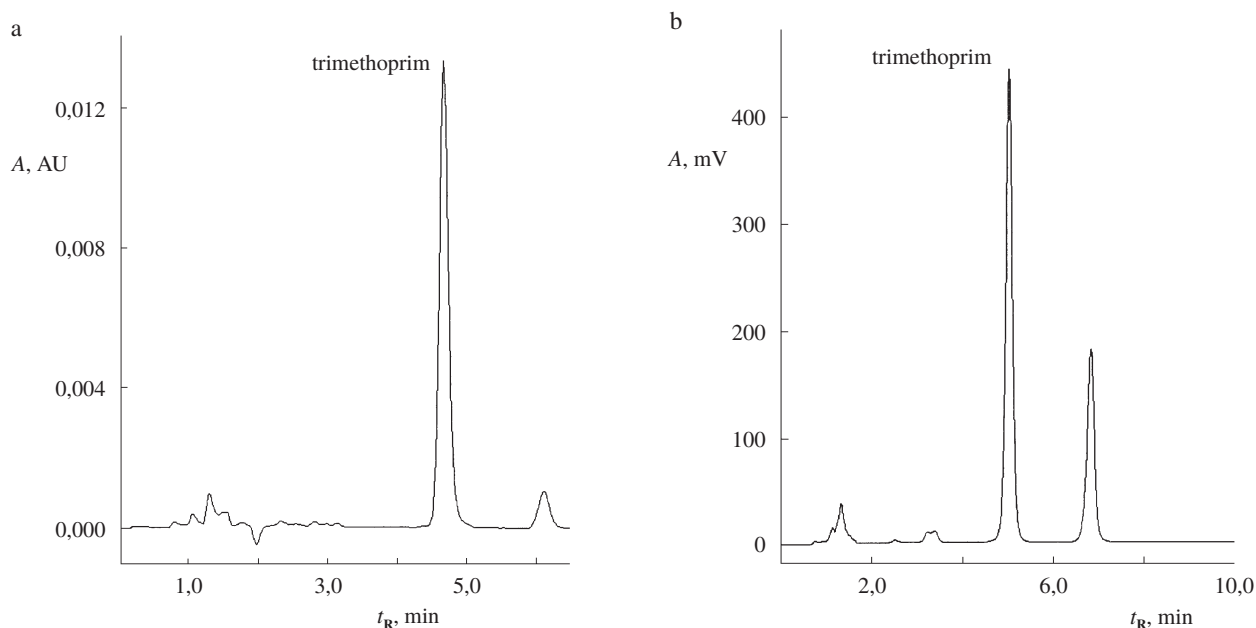
Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny z kalibračního modelu. Mez detekce odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez $(1 - \alpha)$ procentního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna kritické úrovni a mez stanovitelnosti je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a obvykle se pokládá rovná hodnotě 0,1 (cit.²⁰). Pro mobilní fázi I byly vypočteny následující hodnoty: mez detekce má hodnotu 0,35 mg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 0,7 mg.kg⁻¹ a mez stanovitelnosti má hodnotu 0,52 mg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 1,0 mg.kg⁻¹. Pro mobilní fázi II byly vypočteny následující hodnoty: mez detekce má hodnotu 2,3 mg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 4,6 mg.kg⁻¹ a mez stanovitelnosti má hodnotu 2,8 mg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 5,6 mg.kg⁻¹.

Detekce

Absorpční spektra trimethoprimu jsou závislá na pH prostředí a vykazují dvě absorpční maxima při 225 nm a 288 nm při pH 7 (cit.²¹). Snížením pH prostředí dochází k hypsochromnímu posunu druhého absorpčního maxima na 271 nm. Příprava vzorku, přečištění extraktu a následná separace trimethoprimu na chromatografické koloně zaručuje dostatečnou citlivost i selektivitu stanovení trimethoprimu i za použití UV detekce při 271 nm, resp. 288 nm v závislosti na použité mobilní fázi a nedochází k žádným kolonovým interferencím (obr. 5).

Použitím derivatizace trimethoprimu došlo k výraznému zvýšení citlivosti a snížení meze stanovitelnosti. K fluorescenční detekci byla použita emisní vlnová délka 450 nm s excitační vlnovou délkou 330 nm. Kalibrační přímka je lineární v rozsahu 5–50 pg, mez detekce má hodnotu 3,4 μg.l⁻¹,



Obr. 5. Separace trimethoprimu na chromatografické koloně C18; a – s iontopárovým čidlem – krmná směs s obsahem 30 mg.kg⁻¹, chromatografické podmínky viz tabulka I, b – standard trimethoprimu 8 µg.l⁻¹, chromatografické podmínky v textu

tj. pro daný standardní operační postup 6,8 µg.kg⁻¹, mez stanovitelnosti má hodnotu 4,1 µg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 8,2 µg.kg⁻¹.

LITERATURA

- Bushby S. R. M.: J. Am. Vet. Med. Assoc. 176, 1049 (1980).
- Schuch R., Schwaiger I.: Ernährung 24, 413 (2000).
- Brandšteterová E., Kubalec P., Macháčková L.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. A 204, 341 (1997).
- Dagorn M., Delmas J. M.: Anal. Chim. Acta 285, 353 (1994).
- Gentleman M. S., Burt H. M.: J. Chromatogr. 633, 105 (1993).
- Nachilobe P., Boison J. O., Cassidy R. M., Fesser A. C. E.: J. Chromatogr. 616, 243 (1993).
- Hormazabal V., Rogstad A.: J. Chromatogr. 583, 201 (1992).
- Korany M. A., Wahbi A. M., Elsayed M. A., Mandour S.: Anal. Lett. 17, 1373 (1984).
- Othman S.: Int. J. Pharm. 63, 173 (1990).
- Sanyal A. K., Laha T.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1447 (1983).
- Berg J. J., Breytenbach J. C., Du Preez J. L.: J. Chromatogr. 513, 392 (1990).
- Tammilehto S. A.: J. Chromatogr. 323, 456 (1985).
- Genouel C., Rues M. C., Desplanques D.: Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol. 91, 175 (1998).
- Torel J., Cillard J., Cillard P., Vie M.: J. Chromatogr. 323, 447 (1985).
- McNally V., Lenehan T., Kelly M. T., Smyth M. R.: Anal. Lett. 23, 2215 (1990).
- Hormazabal V., Steffenak I., Yndestad M.: J. Chromatogr. 648, 183 (1993).
- Roth M.: Anal. Chem. 43, 880 (1971).
- Roth M., Hampai A.: J. Chromatogr. 83, 353 (1973).
- Berendsen G. E., Galan L.: J. Chromatogr. 196, 21 (1980).
- Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*. FINISH, Pardubice 1992.
- Bonazzi D., Andrisano V., Di Pietra A. M., Cavrini V.: Farmaco 49, 381 (1994).

M. Douša (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Plzeň): **Optimization of the HPLC Method of Trimethoprim Determination in Additive Premixes and Medicated Fodders**

An HPLC method was developed for rapid determination of trimethoprim in additive premixes, in final fodders, and in contaminated final fodders. Trimethoprim is extracted from the sample with acidified aqueous methanol or dichloromethane and, after dilution of the methanolic extract or purification of the dichloromethane extract by re-extraction into 0.15 mol.l⁻¹ H₂SO₄ and on the solid phase C18, it is determined by reverse-phase chromatography on C18 with UV detection. The composition of the mobile phase was optimized. The limit of determination (2 mg.kg⁻¹) and the yield of the method at trimethoprim concentrations 15–45 mg.kg⁻¹ (99.4±5.7 %) were determined. The repeatability was not determined due to a low number of real samples of final fodders. To lower the limit of determination, fluorescent detection was used after precolumn derivatization of trimethoprim with phthalaldehyde. The calculated limit of detection was then 15 mg.kg⁻¹.

EXTRAKCE A ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK Z TŘAPATKY NACHOVÉ (*Echinacea purpurea* (L.) Moench)

NADĚŽDA VRCHOTOVÁ^a, STANISLAV KUŽEL^b,
JAN TRÍSKA^a, LADISLAV KOLÁŘ^b
a JIŘÍ TOTUŠEK^c

^aÚstav ekologie krajiny, Akademie věd České republiky, ^bZemědělská fakulta, Jihočeská univerzita, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^cÚstav preventivního lékařství, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Joštova 10, 662 44 Brno
e-mail: nada@uek.cas.cz, triska@uek.cas.cz

Došlo dne 6.II.2002

Klíčová slova: Echinacea, extrakce, kyselina kaftarová, kyselina cichorová

Úvod

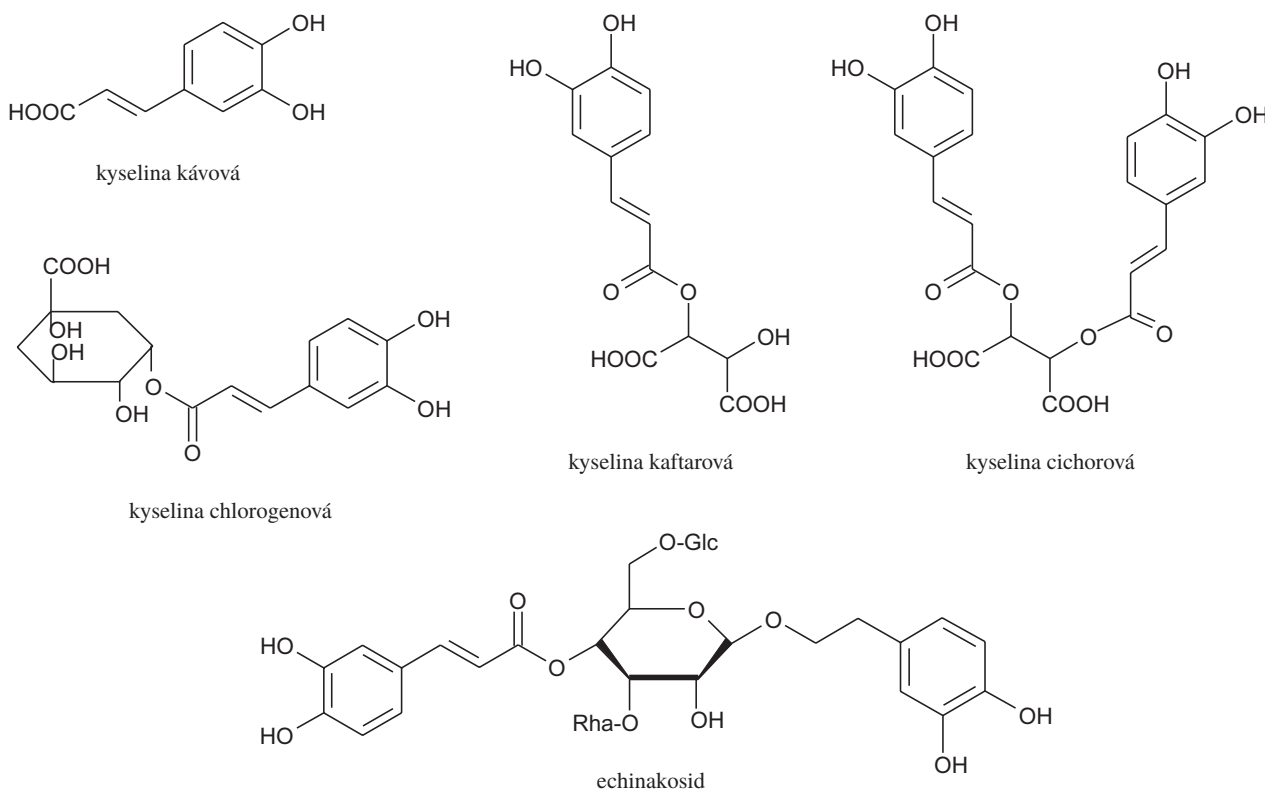
V poslední době se začíná i u nás věnovat zvýšená pozornost alternativním způsobům hospodaření na zemědělské půdě, zejména v okrajových hraničních oblastech. Jednou z možných alternativ je pěstování nových nebo netradičních druhů léčivých rostlin, které by mohly být buď surovinou pro farmaceutický průmysl, anebo by extrakty z nich mohly sloužit jako

potravní doplňky, resp. potraviny určené pro zvláštní výživu. Jedním z hojně studovaných druhů léčivých rostlin v poslední době jsou i rostliny rodu Echinacea.

Rostliny rodu Echinacea pocházejí ze Severní Ameriky, kde je používali jako léčivé rostliny (kořeny) při řadě nemocí již američtí Indiáni¹. Do Evropy se Echinacea dostala asi před 300 lety a zpočátku byla pěstována jen jako okrasná rostlina. V současné době se Echinacea purpurea (L.) Moench (třapatka nachová) úspěšně pěstuje ve velkém jako léčivá rostlina nejen v Americe, ale i v Evropě a v Austrálii. Kromě třapatky nachové se pěstuje i E. angustifolia DC. (třapatka úzkolistá), méně pak E. pallida (Nutt.) Nutt. (třapatka bledá).

Třapatky obsahují celou řadu látek s léčebnými účinky. Preparáty z třapek se nejčastěji používají při onemocnění horních cest dýchacích a chřipkách. Na imunostimulačních účincích se podílí celý komplex látek jak polárních, tak lipofilních¹⁻³. Jsou to např. deriváty kyseliny kávové (kyselina kaftarová, chlorogenová, cichorová), echinakosid, verbakosid, polysacharidy, glykosidy kvercetin, pryskyřice, sílice, polyeny, polyyny, alkylamidy. Na obrázku 1 jsou uvedeny vzorce některých fenolických látek nacházejících se v třapatkách. Z fenolických látek je nejvíce pozornosti věnováno kyselině cichorové a echinakosidu. Kyselina cichorová a kaftarová jsou hlavní složkou kořene a nadzemní části třapatky nachové, echinakosid je dominantní fenolickou látkou kořene třapatky úzkolisté a třapatky bledé.

Obsah kyseliny cichorové v kořenech třapatky nachové dosahuje až 20 mg v 1 g sušiny⁴. Rozdíl v obsahu kyseliny cichorové v různých genetických liniích třapatky nachové může být až čtyřnásobný⁵. Množství kyseliny cichorové a os-



Obr. 1. Schematické vzorce některých fenolických látek z třapatky

tatních látek samozřejmě závisí na době sklizně, na způsobu sušení a způsobu extrakce rostlinného materiálu. Nejšetřivějším způsobem sušení je lyofilizace. Při sušení horkým vzduchem (40 °C) dochází k 10–15 % ztrátě kyseliny cichorové. Podle literárních údajů⁶ může být při sušení při 25 °C ztráta až 50 %, při 70 °C je ztráta asi 80 %. Bylo zjištěno, že množství účinných látek v třapatce nachové se zvyšuje při přebytku dusíku v substrátu vzhledem k ostatním živinám⁷.

K laboratorní extrakci fenolických látek se používá převážně suchý rozemletý rostlinný materiál. Extrahuje se nejčastěji methanolem v Soxhletově přístroji. Bauer a spol.⁸ extrahují 1 g suché drogy 1 hodinu v Soxhletově přístroji 50 ml methanolu. Jako optimální pro třapatku nachovou doporučuje Kim a spol.⁶ 5 hodinovou extrakci 1 g suché drogy 50 ml methanolu v Goldfischově přístroji. Optimální pro společnou extrakci kyseliny cichorové a alkylamidů je podle Stuarda a Willse⁹ 60% ethanol. „INA Methods Validation Programs“¹⁰ navrhuje extrahovat 0,125 g suchého materiálu 25 ml směsi ethanol–voda (70:30). Někteří autoři používají k extrakci 70% ethanol v kombinaci s ultrazvukem^{5,11}. Nepochopitelné látky se z extraktů odstraňují čištěním přes SPE kolonky s náplní C18 (cit.^{6,12}). Někteří autoři odstraňují z rostlinného materiálu nejprve nepochopitelné látky, a to extrakcí chloroformem, poté následuje extrakce methanolem¹³.

Kyselina cichorová podléhá velmi rychle enzymatické degradaci, proto šťávy připravované z čerstvých rostlin neobsahují prakticky žádnou kyselinu cichorovou. Kyselina cichorová se při enzymatické hydrolýze rozpadá na kyselinu kaftarovou a kávovou¹⁴.

Extrakty z třapatky nachové se používají jako potravní doplňky (potravinu určené pro zvláštní výživu), nejčastěji ve formě tinktur, vodně-ethanolových extraktů a šťáv z čerstvých rostlin. Suchá droga, většinou nadzemní část třapatky nachové, se používá i k přípravě bylinných čajů.

Jak je vidět z výše uvedeného literárního přehledu, údaje týkající se obsahu účinných látek v extraktech a způsoby extrakce se navzájem velice liší. Liší se, nebo chybí nejen údaje o způsobech extrakce, ale i chromatografická data pro dominantní fenolické látky. Některé starší údaje uvádějí i retenční data, která neodpovídají novějším údajům. K tomu všemu je třeba připočítat problém standardů. Firmy většinou nabízejí provedení analýz již hotových extraktů, které zákazník může sám dodat. Hlavním cílem naší práce bylo tedy prostudovat vliv organických polárních rozpouštědel a vody na množství kyseliny kaftarové, kávové a cichorové v různých extraktech z nadzemní části třapatky nachové při použití macerace drogy jako nejběžnější techniky extrakce a ověřit údaje v literatuře týkající se retenčních dat hlavních fenolických látek v podmínkách vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Experimentální část

Použité chemikálie

Methanol a acetonitril (LiChrosolv Gradient grade, Merck), 85% kyselina *o*-fosforečná (Lachema), kyselina kávová a kyselina chlorogenová (Aldrich), kyselina kaftarová (Dalton Chemical Laboratories, Kanada), rutin (Sigma), kyselina trifluoroctová (Fluka), potravinářský 96 % ethanol (Obilní lihovar Kralupy nad Vltavou).

Přístroje

Kapalinový chromatograf HP 1050 (Hewlett-Packard, USA), DAD detektor HP 1054 (Hewlett-Packard, USA), kolona C18 3 μm, 2×150 mm (Luna Phenomenex, USA). Nastříkovaný objem byl 5 μl, analýza probíhala v gradientu acetonitril–voda s přídavkem 0,15 % trifluoroctové kyseliny, sledované látky byly detegovány při 330 nm (data byla zaznamenána v rozsahu 190–600 nm).

Centrifuga (Tomy Tech PMC – 060, USA), nožový mlyněk VIPO (ČR).

Rostlinný materiál

Rozemletá sušená nadzemní část třapatky nachové, rok sklizně 2000 (mletí rostlinného materiálu po dobu 2 min na mlynku VIPO).

Výsledky a diskuse

Ve všech extrakčních pokusech se vycházelo z 0,2 g rozemleté sušené drogy, ke které bylo nejprve přidáno první extrakční činidlo v množství 1,5 ml a po uplynutí extrakční doby byl k této směsi přidán 1 ml druhého extrakčního činidla. Během extrakce byla směs několikrát intenzivně protřepána. Po uplynutí extrakční doby byla směs centrifugována, roztok byl odebrán a uložen při –18 °C. Pouze při extrakci vroucí vodou byl celý objem vody (2,5 ml) přidán najednou a po dobu 15 minut byla teplota udržována blízko bodu varu. Poté byla směs ochlazená a centrifugována. Podrobné schéma extrakce je v tabulce I.

Z tabulky II je vidět, že čisté alkoholy extrahují při pokojové teplotě jen velmi nepatrnou část sledovaných fenolických látek, přičemž o něco účinnější je methanol, zejména pro kyselinu cichorovou. Jestliže použijeme pro extrakci samotnou vodu nebo směs voda–methanol, je extrakční efekt pro kyselinu cichorovou velmi slabý, stejně jako v případě čistých alkoholů. U kyseliny kaftarové, která v podmínkách kapalinové chromatografie na reverzní fázi C18 eluuje dříve než kyselina cichorová (je tedy relativně o něco polárnější), je výtěžek extrakce pouhou vodou daleko větší než výtěžek extrakce alkoholy, jak je také vidět z poměru kyseliny cichorové a kaftarové (poslední sloupec tabulky II). Použijeme-li k extrakci 25% methanol, dochází ke zhruba dvojnásobnému zvýšení výtěžku u obou kyselin.

Nejpoužívanější způsob extrakce je podle německého lékopisu způsob, kdy je droga nejdříve extrahována ethanolem, poté se přidá tolik vody, aby množství ethanolu činilo 60 obj.% a extrahuje se dále po stejnou dobu jako u čistého alkoholu. V našem případě činily výtěžky (v soustavě ethanol, poté stejně množství vody) 60 % pro kyselinu cichorovou a 73 % pro kyselinu kaftarovou. Doba extrakce nehraje v tomto systému podstatnou roli. Jak je vidět z tabulky II, dochází po dvouhodinové extrakci k poklesu výtěžku pouze u kyseliny kaftarové o cca 8 %. Záměnou ethanolu za methanol, což ale není systém vhodný pro farmaceutickou, resp. potravinářskou výrobu, získáme maximální množství obou kyselin, a tato čísla byla zvolena jako referenční vztážná hladina pro výpočet výtěžku extrakce u ostatních systémů.

Tabulka I
Schéma extrakce fenolických látek z nadzemní části třapatky nachové

Extrakční metoda	Doba extrakce [h]		Teplota [°C]	Počet vzorků
	1. extr. činidlo	2. extr. činidlo		
1.	24 ethanol	24 ethanol	25	2
2.	24 methanol	24 methanol	25	4
3.	24 H ₂ O	24 H ₂ O	25	6
4.	24 H ₂ O	24 H ₂ O	4	2
5.	24 25% methanol	24 25% methanol	25	4
6.	24 methanol	24 H ₂ O	25	3
7.	168 ethanol	168 H ₂ O	25	3
8.	1 ethanol	1 H ₂ O	25	3
9.	24 H ₂ O	24 methanol	25	4
10. ^a		0,25 H ₂ O	100	3

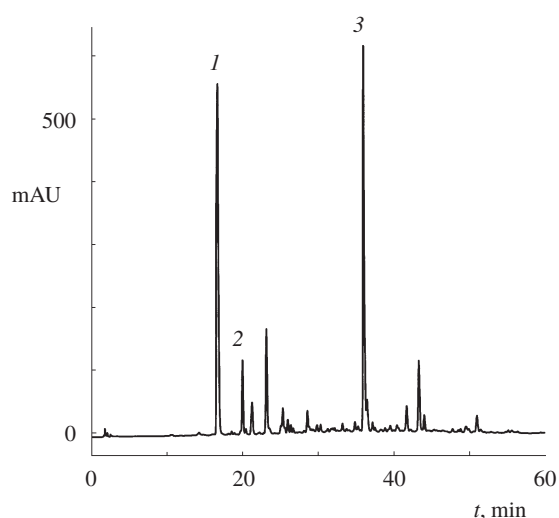
^a Ke vzorku jednorázově přidáno 2,5 ml vody

Tabulka II
Obsah kyseliny cichorové a kyseliny kaftarové v extraktech

Extrakční metoda	Kyselina		
	cichorová [%]	kaftarová [%]	cichorová/kaftarová
1.	0,4	0,3	5,7
2.	14,9	4,2	14,4
3.	4,8	42,9	0,5
4.	3,0	17,2	0,7
5.	40,7	80,3	2,1
6.	100 ^a	100 ^a	4,1
7.	59,8	73,3	3,4
8.	58,3	64,8	3,8
9.	19,9	48,7	1,7
10.	78,4	125,1	2,6

^a Obsah kyseliny cichorové v methanol-vodném extraktu (č. 6) je 16,055 mg.g⁻¹, obsah kyseliny kaftarové je 3,904 mg.g⁻¹ suché drogy

Nejzajímavější jsou výsledky získané při extrakci třapatky nachové vroucí vodou, při které dochází k 80 % výtěžku u kyseliny cichorové, ale 125 % výtěžku u kyseliny kaftarové – čaj připravený z třapatky bude tedy obsahovat velké množství polárních (fenolických) látek. Je vidět, že mnoha staletími



Obr. 2. Chromatogram vodně-methanového extraktu z třapatky nachové; HPLC: mobilní fáze A 5% acetonitril + 0,15% kyselina trifluoroctová, mobilní fáze B 80% acetonitril + 0,15% kyselina trifluoroctová, gradient: 0–20 % B (25 min), 20 % B–40 % B (35 min), průtok: 0,25 ml.min⁻¹; 1 – kyselina kaftarová, 2 – kyselina kávová, 3 – kyselina cichorová

prověřená lidská zkušenost v přípravě nálevů má také své racionální jádro.

Obsah kyseliny kávové je nejvyšší v extraktu voda–methanol (0,22 mg.g⁻¹ suché drogy), o něco méně je kyseliny kávové v extraktu 25% methanolem (0,18 mg.g⁻¹). U vodně-alkoholových extraktů je obsah kyseliny kávové 0,10–0,12 mg.g⁻¹. U ostatních extraktů je obsah kyseliny kávové podstatně nižší.

Zajímavá jsou i data o rozptylu naměřených hodnot výtěžků extrakcí (R.S.D.). Největší rozptyl hodnot (72 %) byl zjištěn u obsahu kyseliny cichorové ve vzorcích extrahovaných vodou při pokojové teplotě. Hodnoty kolem 30 % byly zjištěny v extraktu voda–methanol a v extraktu 25% methanolem. Velmi malý rozptyl hodnot je u vodně-ethanolových extraktů (5–8 %) a u extraktů vroucí vodou (necelá 2 %).

Jak je vidět z provedených extrakčních pokusů, je nejvhodnějším extrakčním postupem skutečně dvoustupňová extrakce (nejdříve čistý alkohol–ethanol, pak po určité době voda). Takto připravené extrakty obsahují jak látky polární, tak i látky méně polární. Všechny extrakty byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie za podmínek popsanych v experimentální části. Vzhledem k tomu, že nebyl k dispozici standard kyseliny cichorové, byla měřena relativní retenční data hlavních fenolických látek a byla zjištěna vynikající shoda s jedinými dosud publikovanými údaji relativních retenčních dat¹⁰. Retenční časy sledovaných látek byly také porovnávány s retenčními časy některých dalších látek uváděných v literatuře^{6,15}, přičemž byly použity různé mobilní fáze (voda–acetonitril–trifluoroctová kyselina, voda–acetonitril–kyselina *o*-fosforečná) i gradienty. K dispozici byly standardy rutinu, kyseliny kaftarové, kyseliny kávové a kyseliny chlorogenové. Množství kyseliny cichorové bylo počítáno z kalibrační křivky pro kyselinu kaftarovou. Na obrázku 2 je ukázka chromatogramu extraktu třapatky nachové s vyznačením hlavních fenolických látek.

Tato studie byla podpořena výzkumným záměrem ÚEK AV ČR č. AV0Z6087904 s názvem: „Ekologie člověkem ovlivňované krajiny“.

LITERATURA

1. Šícha J., Hubík J., Dušek J.: *Cesk. Farm.* 38, 424 (1989).
2. Bukovský M., Košťálová D., Magnusová R., Vavrková Š.: *Cesk. Farm.* 42, 228 (1993).
3. Wagner H.: *Croat. Chem. Acta* 68, 615 (1995).
4. Wills R. B. H., Stuart D. L.: *Food Chem.* 67, 385 (1999).
5. Baum B. R., Mechanda S., Livesey J. F., Binns S. E., Arnason J. T.: *Phytochemistry* 56, 543 (2001).
6. Kim H.-O., Durance T. D., Scaman C. H., Kitts D. D.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 4182 (2000).
7. Kolář L., Ledvina R., Kužel S., Pašek J.: *Rostl. Vyroba* 44, 489 (1998).
8. Bauer R., Forster S.: *Planta Med.* 57, 447 (1991).
9. Stuart D. L., Wills R. B. H.: *Aust. J. Exp. Agric.* 40, 873 (2000).
10. The INA's Methods Validation Program: <http://www.nutraceuticalinstitute.com/methods/>
11. Letchamo W., Livesey J., Arnason T. J., Bergeron C., Krutilina V. S., v knize: *Perspectives on New Crops and New Uses* (Janick J., ed.). ASHS Press, Alexandria 1999.
12. Głowniak K., Zgórk G., Kozyra M.: *J. Chromatogr., A* 730, 25 (1996).
13. Perry N. G., Burgess E. J., Glennie V. A.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 1702 (2001).
14. Nusslein B., Kurzmann M., Bauer R., Kreis W.: *J. Nat. Prod.* 63, 1615 (2000).
15. Hu C., Kitts D. D.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 1466 (2000).

N. Vrchotová^a, S. Kužel^b, J. Tríska^a, L. Kolář^b, and J. Totušek^c (^a*Institute of Landscape Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice*, ^b*Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*, ^c*Institute of Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno*): **Extraction and Analysis of Phenolic Compounds of *Echinacea purpurea* (L.) Moench**

The main goal of this study was the investigation of various extraction procedures of the *Echinacea purpurea* plant material in order to optimize the yield of phenolic compounds, such as caftaric acid, caffeic acid, cichoric acid, to establish their relative HPLC retention data together with retention data of rutin and chlorogenic acid and to compare them with the literature data. The most useful was the extraction with methanol or ethanol, followed by extraction with dilute alcohols (60 % v/v) after addition of water. Almost the same results were obtained with boiling water. The measured relative retention data for the phenolic compounds are in good agreement with the data found in the very recent literature.