

Malé zamyšlení nad hodnocením a financováním vědecké práce

Redakce Chemických listů mně nabídla, abych napsal úvodník na výše uvedené téma. Chvilí jsem váhal a pak jsem nabídku přijal. Motiv této nabídky je zřejmý – je jím hrozba nepříznivého finančního rozpočtu Akademie věd ČR pro nejbližší léta. Budu však hovořit obecněji, protože AV ČR není na lodi vědy a jejích aplikací sama a protože tato problematika je velmi široká. V dnešní době všemožných společenských směrů, zájmů a koalic považují za důležité zdůraznit, že jde o mé soukromé názory.

Co nejobecněji: Veškerá tvůrčí činnost, tedy nejen věda a technika, ale i umělecká tvorba, určuje kulturní a vzdělanostní úroveň určitého lidského společenství. Toto tvrzení jistě málokdo bude popírat, avšak v okamžiku, kdy půjde o peníze, zvítězí okamžité zájmy a potřeby nad dlouhodobými. Stávkující pekaři či tramvajáci vzbudí bezprostřední krizi, stávkující vědci a umělci se stanou zábavným jevem pro mediální využití. Přesto nezbyvá, než abychom se stále co nejhlasitěji ozývali.

A nyní konkrétněji: Finanční rozpočty naší vlasti by měly klást větší důraz na vědu a výzkum, avšak vždy musíme počítat s tím, že jsme chudší než mnozí naši rozvinutější spolubratři. Myslím, že podstatným problémem u nás je malá účast soukromého kapitálu na financování vědy a výzkumu. Jen malý příklad: Vznikla vysoce specializovaná vysoká škola nevelkého obecnějšího významu v areálu automobilky v Mladé Boleslavi, místo aby byla poskytnuta podpora ČVUT. Pragmatické důvody jsou zřejmé, avšak pro náš výzkum a vývoj je to škoda.

Domnívám se, že pro dosažení finančních cílů a pro zajištění co nejlepších výzkumných výsledků je nanejvýš důležité, abychom my všichni, kteří se podílíme na výzkumu, vývoji a na vysokoškolském vzdělávání byli jednotní, protože tyto aktivity jsou nerozlučně spojeny. Měla by vzniknout společná pracoviště, která nepopírají identitu zakládajících organizací, avšak umožňují co nejefektivnější využití nákladné instrumentace a společně usilují i o všestranné uplatnění. Neobyčejně velké možnosti jsou např. jak ve spolupráci AV ČR s vysokými školami, tak i ve společných aktivitách různých vysokých škol. Bohužel, tyto spolupráce jsou prozatím omezené a založené především na dobrých vztazích mezi konkrétními pracovníky spíše než na cílevědomých dlouhodobých institucionálních dohodách. Určité povzbudivé příklady lze zaznamenat na jihu Čech, kde různé okolnosti geograficky zkoncentrovaly několik ústavů AV ČR spolu s Jihočeskou Univerzitou. Jen tak dál!

Další přímo související, podstatnou otázkou je postavení a financování vysokých škol. Má-li, po vzoru USA, polovina populace mít vysokoškolské vzdělání, proč ne-

změnit dobré odborné střední školy, jako je např. „Křemencárna“ v Praze, na bakalářské školy? Financování vysokých škol podle počtu studentů je nešťastné. Proč nezavést školné, v nesymbolické výši? Příkladem budiž Velká Británie, kde velká většina studentů vysoké školné neplatí, protože má stipendia od státu, od měst, od podnikatelských subjektů, od nadací, atd. Dobře promyšlený stipendijní systém rovněž reguluje nabídku a poptávku po vysokoškolských daleko lépe než umístěnky neblahé paměti.

Jedinou možnou cestou tedy je maximální snaha o získání co největšího objemu nejen institucionálních finančních prostředků, ale v co největší míře i prostředků výběrových, z projektových a grantových zdrojů domácích i zahraničních. Rozumné financování komplexu výzkumu, vývoje a výchovy vědeckých pracovníků samozřejmě vyžaduje soustavné, zodpovědné a kvalifikované posuzování kvality vědců, vědecko-výchovných institucí a výsledků jejich práce. Scientometrické posuzování je jistě příjemné a pohled na vysoké citační indexy, impakt faktory, atd., je povzbudivý. Avšak: „všichni píší, nikdo nečte“. Dále pak, i přes snahy o kompenzaci zásadních rozdílů mezi vědními obory, např. skvělý matematik či fyzik se čistě scientometricky stěží vyrovná průměrnému biologovi (vzpomínám si na článek v jakýchsi novinách, kde výbornému společenskému vědci vytýkali, že ještě nemá žádnou práci v *Nature*). Myslím, že jediným zodpovědným přístupem k hodnocení vědecké výkonnosti je posouzení skupinou odborníků, přičemž scientometrie může být použita jako technický, podpůrný prostředek. I zde však vznikají problémy: kde vzít tolik kvalitních a objektivních posuzovatelů, když potřeba všemožných posudků, auditů a recenzí je tak velká a když v důsledku stále rostoucí specializace vědeckovýzkumných odvětví a stálého zmenšování zeměkoule se vlastně všichni osobně známe?

Aplikace základního výzkumu je dalším žhavým tématem: Je milé, když vzniknou okamžité využitelné a zpeněžitelné výsledky, avšak ty jsou výsledkem dlouhodobého a úspěšného základního výzkumu. Skutečný původní výzkum má ale problém v tom, že při hodnocení žádosti o financování výzkumného projektu nemůže poskytovatel od žadatele očekávat žádné pevné přísliby, lze jedině posuzovat předešlou práci žadatele a kvalitu formulace projektu. A je dobré si uvědomit, že i negativní výsledky mají význam – ukazují, kudy cesta nevede (věděl to již Jára Cimrman). Takže pracujme ruku v ruce na poli základního i aplikovaného výzkumu, moc se nehádejme a nenechme se otrávit.

Karel Štulík

MINULOST KYSELINY DUSIČNÉ: VODA, NEBO DUCH?

VLADIMÍR KARPENKO

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Albertov 6, 128 40 Praha 2
karpenko@natur.cuni.cz

Došlo 30.11.07, přijato 11.2.08.

Klíčová slova: Agricola, alchymie, *aqua fortis*, Biringuccio, Ercker, kyselina dusičná, Libavius, Pseudogeberův korpus, *spiritus nitri*, stříbro, transmutace, zlato

Obsah

1. Úvod
2. Objev kyseliny dusičné
3. Problém názvosloví
4. Způsoby přípravy kyseliny dusičné a její použití
 - 4.1. Nejstarší český návod
 - 4.2. Některé prameny 16. století
 - 4.2.1. Georgius Agricola a Lazarus Ercker
 - 4.2.2. Andreas Libavius
 - 4.3. Dělení zlata a stříbra kyselinou dusičnou
 - 4.4. *Graduatio* a *gradatio*
 - 4.4.1. Graduace
 - 4.4.2. Gradace
5. Rekonstrukce výroby kyseliny dusičné
6. Konec „vody“ a „ducha“

1. Úvod

Kyselina dusičná patří k těm sloučeninám, které sehrály v minulosti významnou úlohu v řemeslech a v alchymii. Bylo to pro její schopnost rozpouštět všechny tehdy známé kovy kromě zlata a v úpravě známé jako lučavka královská dokonce i tento kov. Chemické složení lučavky královské nebylo známé, podstatná však byla právě její schopnost rozpouštět zlato, do té doby zdánlivě nezničitelné. V tomto přehledu je zrekapitulována historie kyseliny dusičné a jejího použití počínaje objevem a konče 18. stoletím, přičemž jsou zmíněny také některé české prameny. Velmi dlouho se soudilo, že existuje více forem kyseliny dusičné, přičemž dvě z nich byly rozlišeny nejen názvem, ale i způsobem přípravy. Byly to *aqua fortis* a *spiritus nitri*, ovšem kyselina dusičná byla známa ještě pod dalšími názvy, jejichž zjednodušené třídění je zde předloženo. Cílem této práce je jednak shrnout dosavadní znalosti, současně však

poukázat na řadu otázek, které zbývá zodpovědět. Hned první z nich je datování objevu kyseliny dusičné, podobně jako upřesnění doby, kdy se objevil postup, jehož produktem byl *spiritus nitri*. Z hlediska dějin alchymie je pouze naznačena problematika zdánlivě ještě většího počtu druhů kyseliny dusičné, jak je například v 16. století popsal Agricola. V těchto případech šlo vesměs o preparáty sloužící domnělé transmutaci kovů. Tato oblast je dodnes jen minimálně prozkoumaná; další výzkum předpokládá rozbor původních pramenů a pokud by to bylo možné, pokusy o reprodukování alchymických návodů.

2. Objev kyseliny dusičné

Dosud známé podklady dovolují odhadnout, že k objevu kyseliny dusičné došlo v Evropě v průběhu 14. století. Zatím nejstarší návod na její přípravu je ve 23. kapitole díla *Liber de inventione veritatis* nadepsané „O rozpouštějících tekutinách a změkčujících olejích“¹: „Nejprve chci hovořit o našem rozpouštědle (*aqua nostra dissolutiva*), jež jsem v naší Summě byl zmínil, tam kde jsem hovořil o rozpouštění ostrými tekutinami. Vezmi zprvu jednu libru (přibližně 0,5 kg) vitriolu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), půl libry sanytru (KNO_3 , v orig. *sal nitri*) a čtvrt libry kamence ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, v orig. *aluminis jameni*). Připravuj tuto tekutinu *cum rubigo alembici*, neboť má mocný rozpouštěcí účinek.“

Obrat *cum rubigo alembici* je zřejmě zmínkou o červené barvě *alembiku*, destilační baňky, která se musela zahřívát na vysokou teplotu. Citovaný pramen byl donekádna jedním ze spisů zahrnovaných do tzv. Pseudogeberova korpusu, který tvořila díla *Summa perfectionis magisterii*, *Liber de investigatione perfectionis*, *Liber de inventione veritatis*, *Liber fornacum* a *Testamentum Geberi* (místo *Liber* je dále jen *L.*). Tyto rukopisy se začaly objevovat v tištěné podobě od roku 1481, ovšem jejich nejstarší souborná vydání jsou až z roku 1541 (Norimberk) a 1545 (Bern)².

Zprvu se soudilo na jejich arabský původ, přičemž autorství se připisovalo Džábiru ibn Hajjánovi uznávanému za jednoho z největších alchymistů. Dodnes však není jednoznačně rozřešeno, zda tento muž vůbec žil³ a tyto pochybnosti panovaly v arabském světě⁴ již v 10. století. Pokud někdo takový žil, pak přibližně v letech 721/2 až snad 815, rozhodně ho však nelze pokládat za autora několika stovek (či dokonce tisíců) spisů, jak se občas udávalo. Džábirovo jméno bylo v Evropě polatinštěno na Geber a pod ním byl zprvu vydáván uvedený korpus spisů.

Později byl jejich arabský původ zpochybněn a jako autor byl uváděn Pseudogeber nebo Latinský Geber. Začátkem 20. století byl již poslední z titulů, *Testamentum*, pokládán za dílo jiného autora, a postupně se podobně

pochybnosti objevily také o dalších knihách korpusu. Obrat přinesly práce Newmanovy^{5,6} vrcholící vydáním kritické revize *Summy* a jejího komentovaného překladu⁷. Podle Newmana byl autorem *Summy* františkánský mnich Paulus z Tarenta, o němž však chybějí bližší údaje, zatímco ostatní díla Pseudogeberova korpusu napsali jiní autoři. Tím se ještě více komplikuje datování, které je přibližně také u *Summy*, jejíž vznik je kladen zhruba do přelomu 13. a 14. století.

L. de investigatione perfectionis a *L. de inventione veritatis* jsou pozdějšího data, navíc, jak naznačuje jejich detailní rozbor, jsou dílem dvou různých autorů, kteří je zřejmě napsali jako komentář *Summy*. Vznik těchto spisů zatím nelze spolehlivěji datovat; nejstarší rukopis *L. de investigatione* z roku 1400 naznačuje, že dílo již tehdy existovalo. Návod na kyselinu dusičnou je také v kap. 18. *L. fornacum* „Rozpouštění připravených kovů“ (Darmstaedter, str. 118): „Naše metoda je: granulovaný nebo rozpilovaný kov rozpust' v našem rozpouštědle, jež se ze sanytru a vitriolu vyrábí, ...“ Tato formulace naznačuje, že příprava rozpouštědla kovů, kyseliny dusičné, byla již známá, takže nebyl nutný podrobný návod. Kniha vznikla ještě později než předchozí dva tituly Pseudogeberova korpusu.

Počátek historie kyseliny dusičné je zatím spojován s *L. de inventione veritatis*, když *Summa perfectionis magisterii* neobsahuje žádnou zmínku, která by svědčila o znalosti této sloučeniny, třebaže se na ni *L. de inventione veritatis* odvolává. Návod na přípravu kyseliny dusičné v tomto prameni pokračuje významnou pasáží: „Bude (kyselina) ještě mnohem ostřejší, jestliže s tím rozpustíš čtvrt libry salmiaku (NH₄Cl). Tato tekutina totiž rozpouští zlato, síru a stříbro.“ Konec návodu tedy popisuje přípravu lučavky královské (*aqua regia*), směsi kyselin dusičné a chlorovodíkové v poměru přibližně 1:3.

Z hlediska dalšího vývoje řemesel i alchymie bylo významné, že samotná kyselina dusičná rozpouští všechny kovy s výjimkou zlata, a to je rozpustné v lučavce královské. Složení lučavky pochopitelně nebylo známé, a kyselina chlorovodíková byla objevena jako poslední z minerálních kyselin; první zmínky o ní jsou z konce 16. století. Kyselina sírová byla připravena patrně o něco dříve ve stejném století⁸.

3. Problém názvosloví

Orientaci v původních pramenech značně znesnadňuje dobové názvosloví, které používali nejen alchymisté, ale také řemeslníci. Kyselina dusičná se objevuje pod řadou názvů, z nichž některé se však vyskytují rovněž v souvislosti s minerálními kyselinami objevenými později, především s kyselinou sírovou.

Názvy kyseliny dusičné, které se objevily během staletí v různých pramenech, lze zjednodušeně rozdělit do tří skupin. V první, nejpočetnější, je označována *aqua*, což odráží představu o aristotelských elementech, když tento, voda, měl být obsažen ve všem, co teče nebo může téci za vhodných podmínek (kovy při zahřátí). V prvním návodu

na přípravu je kyselina dusičná nazývána *aqua nostra dissolutiva* (místo *aqua* je dále jen *a.*), což se záhy zkrátilo na *a. dissolutiva*, načež se objevil nejčastěji používaný název *a. fortis*; počátek jeho použití nelze spolehlivě datovat. Postupně přibývaly další „vody“, *a. acuta*, *a. caustica*, *a. gehennae*, *a. mercurialis*, *a. solvens*, *a. stygia*, *a. valens*. Zavádějící bylo označení *a. mercurialis* zdánlivě odvozené od merkuru, rtuti, které někdy sice označovalo kyselinu dusičnou, ale používalo se také pro *butyrum antimonii* (máslo antimonu), chlorid antimonitý sloužící jako výchozí substance pro přípravu některých léků.

Druhá skupina názvů odráží buď původ kyseliny dusičné nebo některou její vlastnost, případně oboje. Jsou to *oleum nitri*, *rubigo nitri*, *spiritus nitri*, kde je očividný původ, totiž příprava kyseliny ze *sal nitrum*, dusičnanu draselného, přičemž viskóznější produkt byl *oleum*. Zá-pach oxidů dusíku, což byli v dobové terminologii „duchové“, se odrazil v termínu *spiritus*; do této skupiny také patří *spiritus aquae fortis*. Dva hlavní termíny, *aqua fortis* a *spiritus nitri*, budou později diskutovány podrobněji. *Sal nitrum* bylo původně označení uhličitanu sodného odvozené ze staroegyptského *n^e-l^e-r*. Až ve vrcholném evropském středověku se začalo používat pro dusičnan draselný, případně sodný; obě sloučeniny se nerozlišovaly (etymologii termínu *nitrum* rozebral Feldman⁹).

Do třetí skupiny lze shrnout kódová označení pocházející vesměs od alchymistů. Jako příklady lze uvést *draco*, *protheus*, *Salamanderblut*, *roter Löwe*, *Stomaco*, *struthionis*, *sudor hermaphroditici*. Zakódování je i v obou předchozích skupinách, kde však například *a. gehennae* dává alespoň tušit, že voda je „pekelná“, patrně pálivá. Ve všech těchto skupinách jsou názvy, které lze přiřadit kyselině dusičné na základě návodů, z nichž plyne, že šlo skutečně o tuto sloučeninu. Nebylo totiž vzácné, že byl některým z těchto termínů označen i produkt jiného složení.

4. Způsoby přípravy kyseliny dusičné a její použití

4.1. Nejstarší český návod

Tento návod zároveň naznačuje použití kyseliny dusičné v poměrně dlouhém období po objevu. Její cena byla příliš vysoká, než aby tato sloučenina vstoupila do praktického používání, takže se zprvu objevuje v alchymických návodech, velmi často rovnou ve směsi s kyselinou chlorovodíkovou jako lučavka královská. Návod na výrobu lučavky je v nejstarším česky psaném alchymickém rukopise z roku 1457 známém jako *Cesta spravedlivá* připisovaném Janovi z Lazu¹⁰. Na str. 17 se píše (čeština je částečně upravena):

„Vezmi vitrolium vysušeného, jako se napřed píše, tři funty (1 funt, totéž co libra, přibližně 0,5 kg) a tolikéž sanytru a k tomu armoniacu (NH₄Cl) funt a to vše smíchej spolu a zetři dobře a vsyp do sklenice, ježto slove kukurbita a vstav na alembik a podstav sklenici, aby do ní teklo ...“ Je to přímý postup výroby lučavky královské; *kukur-*

bita (nebo *kukurbit*) byl typ destilační baňky, *alembik* zde označuje její hlavu. Vitriol měl být předem vysušený a celé zařízení utěsněné, „ať nikudy pára ven nemůž“. Autor upozorňuje, že je třeba postupně zesilovat oheň, „až uziš, anot' duchové jdú jakoby dýmali na vodu“. Do takto připravené kapaliny se má vhodit zlato, „a tak se rozpustí tvé zlato v vodu čistú“, což je cílem citovaného návodu.

4.2. Některé prameny 16. století

Teprve přibližně od počátku 16. století se začíná používat kyselina dusičná v řemeslné praxi k dělení zlata od stříbra. V té době byl však tento postup stále ještě pokládán za příliš nákladný, takže převažovalo klasické cementování používané od starověku. Přitom se zlaté plíšky proložené střídatě vrstvami navlhčené směsi rozdrčených cihel s vhodnou solí (obvykle NaCl, někdy KNO₃ a jiné) žihaly v uzavřeném tyglíku. Všechny nečistoty obsažené ve zlatě zreagovaly na soli a zůstal čistý drahý kov. Pokud zlato obsahovalo větší množství kontaminantů, musel se proces opakovat: po žihání se kov roztavil a opět rozklepal na plíšky k dalšímu cyklu až bylo posléze získáno ryzí zlato¹¹.

Návody na kyselinu dusičnou se jen postupně objevovaly v řemeslnických manuálech, především v prubírských příručkách (*Proberbüchlein*), mnohdy anonymních, které začaly vycházet ve větším počtu právě od počátku 16. století¹². Je tu zřejmá souvislost s růstem těžby drahých kovů, která nabývala v té době na významu také ve Střední Evropě¹³.

4.2.1. Georgius Agricola a Lazarus Ercker

Jedním z vrcholů odborné literatury je spis Georgia Agricoly (1494–1555) *De re metallica libri XII*¹⁴ poprvé vydaný v Basileji roku 1556. V knize X. píše autor o tom, že zlato je oddělováno od stříbra „skrže aqua valens“, což měla být v této souvislosti kyselina dusičná. Dnes se soudí, že Agricola zde pouze zaznamenal návody ze starších prubírských knížek a jak píše, „protože je mnoho (různých) kombinací (výchozích látek), uvedu jen několik málo“. Níže je shrnuto jeho deset návodů, kdy jsou vyjmenovány výchozí látky, které měly být destilovány. Již letmý pohled na ně potvrzuje domněnku, že Agricola tyto návody opravdu nejspíš jen opsal a zřejmě většinu z nich nevyzkoušel.

V následujícím výčtu údajných kyselin dusičných je hmotnostní jednotka libra (v Německu Pfund) zkracována lb. Návody jsou v pořadí, v jakém jsou v Agricolově knize:

První: 1 lb. vitriolu, stejné množství soli (NaCl), 1 lb. pramenité vody.

Druhá: 2 lb. vitriolu, 1 lb. sanytru, stejné množství pramenité vody.

Třetí: 1 lb. vitriolu, 2 ½ lb. sanytru, ½ lb. kamence, 1 ½ lb. pramenité vody.

Čtvrtá: 2 lb. vitriolu, stejně sanytru, ¼ lb. kamence, ¾ lb. pramenité vody.

Pátá: 1 lb. sanytru, 3 lb. kamence, ½ lb. cihlového prachu, ¾ lb. pramenité vody.

Šestá: 4 lb. vitriolu, 3 lb. sanytru, 1 lb. kamence, „podobně jedna libra kamenů, které, když vrženy do rozpálené pece, se snadno roztaví ohněm třetího stupně“ (v tomto a v dalších návodech jsou pasáže ponechané zčásti v původním znění; kameny nelze určit), 1 ½ lb. pramenité vody.

Sedmá: 2 lb. vitriolu, 1 ½ lb. sanytru, ½ lb. kamence, „jedna libra kamenů, které, když vrženy do rozpálené pece, se snadno roztaví ohněm třetího stupně“, 5/6 lb. pramenité vody.

Osmá: 2 lb. vitriolu, stejně sanytru, 1 ½ lb. kamence, „1 lb. sraženiny vody [aqua], která odděluje zlato od stříbra; a ke každé jednotlivé libře šestina moči je přilita“.

Devátá: 2 lb. prachu z pálených cihel, 1 lb. vitriolu, 1 lb. sanytru, hrst soli, ¾ lb. pramenité vody.

Desátá: „Pouze desátá postrádá vitriol a kamenec, ale obsahuje 3 lb. sanytru, dvě libry kamenů, které, když vrženy do horké pece, se snadno roztaví ohněm třetího stupně, po ½ lb. verdigris, stibia, železných šupin nebo pilin a asbestu, a 1/6 lb. pramenité vody.“

První návod nevede ke kyselině dusičné, ale k chlorovodíkové. Poslední návod, zřejmě zkomolený, měl vést patrně k jinému produktu, jak bude zmíněno dále. Jako *verdigris* se označoval zelený pigment, octan měďnatý nebo bazický octan měďnatý, *stibium* byl název sulfidu antimonitého. Velmi pravděpodobně se měl skutečně použít azbest. Údaje o teplotním režimu nelze spolehlivě interpretovat; často se rozlišovaly čtyři stupně tepla, byly ale popisovány rozličně. První stupeň býval přirovnáván k teplu slepice sedící na vejcích. Jindy to byl „oheň egyptský“, odpovídající letní teplotě v Egyptě. Poněkud jednoznačnější je dělení na teplo vodní, pískové, popelové lázně a přímých plamenů.

Významný metalurg Lazarus Ercker (1528–1594) popsal výrobu kyseliny dusičné jasněji než Agricola a navíc při jeho postupu vznikala koncentrovanější produkt. Podle Erckera¹⁵, „Vezmi jednu libru čistého sanytru a čtyři a půl libry kalcinovaného vitriolu ...“ Důležitá je úprava vitriolu kalcinováním, což bylo zahřívání, častěji žihání, v tomto případě opatrně. Cílem bylo zbavit výchozí preparát vlhkosti a částečně též krystalové vody, aby se neředil zachycovaný produkt.

4.2.2. Andreas Libavius

V 16. století se dále prohluboval i zájem alchymistů o minerální kyseliny, o dusičnou především. Rozsáhlé údaje jsou v díle Andree Libavia (? 1560–1616) *Alchemia* z roku 1597, jež bývá, jak jeho titul může naznačovat, pokládáno za první učebnici chemie¹⁶. Není tomu tak; autor se zabýval alchymii, věřil v možnost transmutace kovů a také ji v knize opakovaně popisuje. Na druhé straně je to velmi přehledný a systematický spis.

V kapitole XXVI. nadepsané „O duchách“ (*De spiritibus*) je krátká zmínka, kterou lze vztáhnout k výčtu názvů kyseliny dusičné (Odst. 2). V úvodu se Libavius snaží vymezit pojem „ducha“ a píše, že „rozpouštějící voda je taková, která skrže svou ohnivou subtilností a pronikající ostrostí coby řídká tekutina uzávěry těla rozevřít dokáže,

jestliže je tato (voda) skrze komplikovanou destilaci vyrobena a své vlhkosti zbavena, jak je to jen možné.“ Je to vlastně pokus o vysvětlení mechanismu účinku silných minerálních kyselin, když jako „těla“ se v těchto souvislostech označovaly kovy.

Výčet „duchů“ je v citovaném díle pestřejší a začíná pojednáním o „duchu vína“, alkoholu, jsou popsány přípravy „ducha vitriolu“ (*spiritus vitrioli*), kyseliny sírové, ale také „ducha terpentýnu“ a posléze „ducha libovolné soli“. Pro historii kyseliny dusičné je podstatná věta: „Rozpouštějící voda (aqua dissolutiva) vystupuje ve dvou druzích; jako duch (spiritus) a jako aqua fortis“. K tomu se autor vrací ke konci kapitoly: „Sal nitrum se destiluje s dvojnásobným množstvím červené nebo žluté země, ... a *spiritus nitri* je stejným způsobem jako *aqua fortis* připravován; oheň jest používat opatrně.“ Tedy někdy během 16. století, lze jen odhadovat, se objevuje druhý postup přípravy kyseliny dusičné, pouze z dusičnanu draselného, a výsledný produkt, *spiritus nitri*, se uvádí jako forma odlišná od aquae fortis. Použití názvu „*spiritus nitri*“ se někdy připisuje Paracelsovi¹⁷ (Theophrastus von Hohenheim, 1493/94–1541).

Aqua fortis je rovněž problémová, což naznačuje kapitola XXVII. „O druzích aquae fortis“. Podobně jako Agricola jí také Libavius rozlišoval více druhů, jak dokládají mezititulky odstavců kapitoly, z nichž první je sice „Obecná aqua fortis“, ale další jsou, mimo jiné, „Voda na rozpouštění kovů“, „Rozpouštějící voda pro zlato“, „Voda k rozpouštění stříbra“, „Pro železo“ a následují zbývající kovy, měď, cín, olovo a rtuť.

V těchto případech to však není po každé kyselina dusičná, jak o tom svědčí jeden ze dvou návodů „pro železo“: „Rec. Tři unce (něm. Unze, mezi 29 a 38 g) bílého vitriolu (nelze přesněji určit; mohl to být bezvodý CuSO_4), sedm uncí uherského vitriolu (nečistý CuSO_4), čtyři unce soli, půl unce kamence, učíň červenou aqua fortis.“ Je možné jen odhadovat, že nejspíš vznikla směs kyselin sírové a chlorovodíkové. Původ červeného zbarvení není jasný podobně jako u „aquae fortis“ pro olovo: „Rec. Po čtyřech uncích kamence a vitriolu, jednu libru sanytru a dvě unce červeného atramentu. Učíň (z toho) aqua fortis. Sbírej (zachycuj) červené duchy.“ Červený atrament (*atramentum rubrum*, také *colcothar*) byl zbytek po destilaci zeleného vitriolu (FeSO_4) při výrobě kyseliny sírové, obvykle nečistý oxid železitý. Narážka na červené duchy není zcela jasná, mohlo jít o oxid dusičitý této barvy.

V Libaviově knize je i klasický návod na výrobu kyseliny dusičné: „Vezmi osm dílů vitriolu, pět dílů přečištěného sanytru, jeden díl kamence, kalcinuj vitriol a kamence a zvaž je po kalcinování, abys věděl, kolik odešlo ...“ Následuje podrobný popis dalšího postupu a také čištění připravené kyseliny. Návod tohoto druhu se v této kapitole opakuje v různých podobách, je zde však také věta: „Výchozí látky pro jiné (druhy aquae fortis) jsou jednou tyto látky, jednou salmiak a libovolná jiná (sůl), někdy hydrargyrus sublimatus, rumělka, pražená měď, sádra, nehašené vápno, arsenik, kamence, colcothar, fel vitri, červená síra, atd.“ Tento nezvyklý výčet bude diskutován

ve zvláštním odstavci (4. 4. 2.). *Hydrargyrus sublimatus* byl nejčastěji opravdu sublimát, chlorid rtuťnatý, pražená měď byl obvykle oxid měďnatý, arsenik nelze bez dalšího popisu blíže určit, mohl to být sulfid nebo oxid, *fel vitri* (pěna skla), byla nečistým síranem alkalických kovů (podle použitého sklářského kmene) a šlo o pěnu tvořící se na tavenině, a červená síra byla většinou normální sírou.

Další změny doznala výroba kyseliny dusičné v 17. století, když ji Johann Rudolf Glauber (1604–1668) připravil zahříváním sanytru s kyselinou sírovou. Nejčastěji se udává rok 1646; Glauber totiž tento návod neuvedl ve svých dílech, ale poskytoval ho ústně za poplatek. I tento produkt býval nazýván *spiritus nitri*¹⁸.

4.3. Dělení zlata a stříbra kyselinou dusičnou

Nejvýznamnějším použitím kyseliny dusičné v řemeslné praxi se stalo dělení zlata a stříbra, německy *Scheidung*, což dalo této kyselině název *Scheid(e)wasser*. Jeden z nejstarších velmi detailních popisů kvantitativního stanovení obou kovů zanechal další významný metalurg Vannoccio Biringuccio (1480–1539) v knize *Pirotechnia*¹⁹. Podstatnější než popis dělení je příprava jednotlivých složek. Především muselo jít jen o slitinu zlata a stříbra neobsahující další příměsi. Proto byl kov předem přečištěn kupelací. Následovalo zpracování kyselinou dusičnou, v níž se rozpustilo pouze stříbro, které bylo následně opět vytaveno ze vzniklého dusičnanu. Velmi důležitá byla správná příprava kyseliny dusičné, což Biringuccio podrobně popisuje.

Na výrobu kyseliny „vezmi jeden díl velmi dobře přečištěného sanytru a třikrát tolik dobře promytého skalního kamence ... smíchej s těmito věcmi osmý díl celku nebo méně písku, šterku nebo rozdrcených cihel. Ale mně se zdá lepší, jestliže je máš, použít zbytky aquae fortis ...“ Autor znovu připomíná dobré utěsnění nádob, načež se má začít se zahříváním zprvu na mírném ohni. Po šesti hodinách je obsah baňky tekutý, následujících šest hodin se má oheň zesilovat, jak Biringuccio píše, „až uztříš, že všechna voda a flegma látek zmizely, a že jsou (látky) v kukurbitu zcela suché.“ Voda a „flegma“ jsou vlhkost a krystalová voda.

Tento okamžik se pozná podle toho, že se začnou objevovat žluté dýmy (oxidy dusíku). Proces končí, když se již žádné dýmy nepozorují. Podstatné je pokračování: „... jestliže si přeješ, aby byla tato kyselina dobrá a pracovala dobře, je nutno přidat půl denaro (1 denaro \approx 1,2 g) čistého stříbra na jednu libru (v Itálii nejčastěji přibližně 0,3 kg) kyseliny. Abys to provedl, dej jednu nebo dvě libry nebo kolik chceš této kyseliny ... a přidej k ní celou váhu stříbra granulovaného nebo roztepaného kladivem, které náleží celému množství kyseliny, jež jsi byl vyrobil. Jakmile je to (stříbro) v ní, uztříš jak se kyselina zakaluje ... zakrátko poté, co jsi ho (stříbro) vložil, uvidíš, že se všechno stříbro ve vodu rozpustilo ... potom co byla kyselina ponechána ustát, uvidíš cosi hrubého podobného velmi bílé křídě padat na dno.“ Následuje dekantace kyseliny, která se má nalít ke zbylému produktu. Opět se objeví

sraženina, takže je nutná další dekantace a „teprve nyní je to aqua fortis, která je připravena pro umění dělení (zlata a stříbra) a lze ji použít pro onen účel. Bez takového očištění by byla nedokonalá a nesloužila by dobře jednak pro svou pomalost, jednak proto, že by zkazila dílo.“ Ona „křída nebo bílý zbytek“ se má uchovat a následuje návod, jak z ní opět získat použité stříbro. Tyto pasáže popisují jednu z klíčových operací v prubířství.

Kyselina dusičná se vyráběla z dusičnanu draselného, který býval kontaminován chloridem draselným. Při běžném postupu tak mohla být v připravené kyselině také malá příměs kyseliny chlorovodíkové, která by samozřejmě zkreslila kvantitativní stanovení složení slitiny Au-Ag. Přídavek stříbra vysrážel kyselinu chlorovodíkovou jako málo rozpustný AgCl („bílý zbytek“). O tomto postupu se zmiňuje méně podrobněji Libavius (str. 460): „Ale dostatečně (čistá) je (aqua fortis) poté, když ani kalná není, ani se při rozpouštění (stříbra) nezakaluje, ani se v ní žádná usazenina nesráží. Tak je vhodná k dělení zlata a stříbra, aniž by zlato napadala.“ Malá příměs kyseliny chlorovodíkové by vedla k mírnému rozpouštění zlata, což Birinuccio neuvádí.

Čištění kyseliny dusičné stříbrem se stalo rutinním postupem, jak lze nalézt ve sbírce českých alchymických rukopisů ze 16. a 17. století²⁰, kde poslední datace je z roku 1656: „Voda silná takto se dělá: vezmi jednu libru vitriolu, jednu libru sanytru, jednu libru alaunu benátského (kamence) ... Učiň z toho vodu silnou jakož toho obyčej jest první, tj. přední vodu vezmi zvláště, a potom druhou a poslední spolu. A když máš tu vodu učíst ji, jakož obyčej jest, stříbrem ...“ Kromě zmínky o použití stříbra je zde popsáno v té době již také běžné jímání frakcí, když první z nich byla voda nebo nejvýš velmi zředěná kyselina, což naznačuje Birinuccio.

Originální použití kyseliny dusičné se objevilo v jedné z nejproslulejších údajných transmutací²¹, kterou roku 1677 provedl Johann Wenzel Seiler (? 1648–1681), Hof-Chymicus rakouského císaře Leopolda I. Alchymista přitom ponořil medailon prý stříbrný (40 x 37 cm, 7200 g) do „elixiru“, čiré kapaliny, v níž se ponořená část po chvíli proměnila ve zlato. Analýza medailonu²² ukázala, že byl zhotoven ze slitiny středního složení (hm. %): Au 47,6, Ag 43,4, Cu 7,6 obsahující též malá množství cínu, zinku a železa. Pokus s modelovou slitinou téhož složení ukázal, že se ve zředěné HNO₃ (1:1) během dvaceti minut rozpustily z povrchu materiálu všechny doprovodné kovy, takže předmět zezlátl.

4.4. *Graduatio* a *gradatio*

Jde o dva významem odlišné termíny, které však bývaly zaměňovány, což při nepřehlednosti jazyka alchymistů a řemeslníků nepřekvapuje. Kyselina dusičná se používala především v jednom z nich. Diskusi je účelné rozdělit do odstavců, v nichž budou naznačeny základy postupů, které budou nazývány počeštěnou podobou výrazů, tedy graduace a gradace.

4.4.1. *Graduace*

Tento termín je starší a označoval takový způsob čištění zlata, kdy se v průběhu procesu naopak ještě přidával jiný kov. Potom lze rozlišit dvě základní varianty pro jednoduchoost dále označené jako postup na suché (a) a mokré (b) cestě.

a) Zatím nejstarší evropský popis je ve středověkém řemeslnickém manuálu *De diversis artibus*, jehož autor je uváděn jako Theophilus Presbyter (mnich Theophilus)²³. Rukopis vznikl asi ve 12. století a bývá pokládán za dílo metalurga Rogera z Helmarshausenu, jenž působil kolem roku 1100. Kapitola 33. nadepsaná „Cementování zlata“ podrobně popisuje, jak si počínat. Plíšky z nečistého zlata se mají střídavě prokládat prachem smíchaným se solí a zvlhčeným močí, a vše se má žíhat v uzavřeném tyglíku. Potom se má ke kovu přidat trochu červené mědi, vyrobí nová slitina a ta má být zpracována stejně jako předchozí. Postup se opakuje již bez přídavku mědi do konstantní hmotnosti kovu, kdy je zlato čisté. Je to tedy proces, kde se kyselina dusičná nepoužívá, ale šlo o jednu z variant cementování.

b) Analogický princip, totiž přidání dalšího kovu ke zlatu, jehož ryzost se měla stanovit, se po objevu kyseliny dusičné používal s ní. Nepřidávalo se však malé množství, ale trojnásobné, a to stříbra. Pro tento poměr, kdy na jeden díl nečistého zlata připadaly tři díly stříbra, byl postup nazýván také *quartatio* (kvartace, kvartování). Pod heslem „Quartura“ to jako zkoušení zlata definuje lexikon alchymie Martina Rulanda ml.²⁴ (1569–1611), přičemž se podle tohoto pramene používá *aqua stygia*.

Návod na takové čištění zlata je například v knize VII. *De re metallica*. Zlato má být nejprve přečištěno kupelací poměrně složitým postupem, kdy se k němu přidává trojnásobná hmotnost stříbra, později trochu mědi. Po kupelaci zůstává čistá slitina obou drahých kovů. Potom „jedna třetina libry zlata a jedna libra stříbra se musí vložit do kupely a roztavit“, získaná slitina se rozklepe na plíšky, které se srolují, vloží do skleněných ampulí a zalijí kyselinou dusičnou (*a. valens*). „Zahřívá se to mírným ohněm, a malé bubliny, tvarem perly připomínající, budou vidět zachycené na roličkách (plechu). Čím vypadá aqua červeněji, soudí se, že je to lepší; když červenost zmizela, malé bílé bubliny jsou vidět spočívající na roličkách, podobající se perlám nejen tvarem, ale i barvou.“ Kyselina se má vyměnit několikrát, načež se plíšky opláchnou dobrou vodou, vysuší a zváží.

Úspěch postupu záležel na zkušenosti prubíře, neboť roli hrál obsah zlata ve výchozí slitině, množství přidaného stříbra a kvalita použité kyseliny dusičné. Podstatou metody bylo dosáhnout toho, aby měla kyselina co největší přístup do slitiny. Pokud v ní byl dostatek stříbra, kyselina dusičná ho rozpouštěla a vytvářela větší dutiny, takže odstranila i většinu tohoto kovu ve výchozím zlatu. Přesto, jak Agricola upozorňuje, musí se počítat s tím, že i tak zůstane něco stříbra v plíšcích, takže je nezbytná korekce, kterou také uvádí. Stejný princip, umožnit maximální přístup do nitra slitiny, byl rovněž v základu suchého postupu popsaneho Theophilem.

4.4.2. Gradace

Jak uvádí Schneider²⁵, termín *gradatio* označoval v alchymii „zlepšení“ kovů, jejich transmutaci, takže postup od obecných kovů ke zlatu měl probíhat přes různé stupně gradace. Ve staré češtině se někdy psalo o „povýšení kovů“ právě ve smyslu jeho transmutace v drahý. V Rulandově *Lexikonu* (str. 245) je též heslo „Gradatio“ se svým synonymem „exaltatio“ s vysvětlením, že jde o to dosáhnout nejdokonalejšího stupně (*gradu excellentem*) hmotnosti i barvy kovů: musejí být změněny jak jeho skryté (okultní), tak vnější (manifestní) vlastnosti. Jestliže je bílý, musí zežloutnout či zežloutnout, což je manifestní vlastnost, pokud je těkavý, musí se stát „fixním“ (netěkavým, když zlato bylo pokládáno za nejvíce „fixní“ kov), což je vlastnost okultní.

Právě termín *gradatio* lze dát do souvislosti s Agricolovým desátým návodem na kyselinu dusičnou a se čtyřmi podobnými dále v téže kapitole, a také s Libaviovou zmínkou o větším počtu *aquae fortes*. V těchto případech šlo o přípravky, kdy část výchozích složek sice sloužila k výrobě kyseliny dusičné případně lučavky královské, ovšem navíc se přidávaly předem nebo dodatečně ještě další sloučeniny a získaný preparát samozřejmě netransmutoval kovy, ale v ideálním případě jim dodával povrchové zbarvení napodobující některý z drahých kovů, což byla jedna z technik domnělé transmutace²⁶.

Jako příklad mohou posloužit návody z *Primum manuale* připisovaného Paracelsovi²⁷. Podle jednoho nadpisu je to „Aqua fortis, do níž když Luna vložena jest, stane se zlatem“. V alchymické terminologii označovala Luna stříbro, Sol byl zlato a Merkur objevující se v návodu byla rtuť. „Vezmi vitriolu a sanytru stejné množství, kamence jednu unci. Vysrážej *aqua fortis* surovým Merkurem. Poté to promění Lunu ve zlato.“ Analýza alchymických receptů bývá obtížná, často nemožná, což platí také o tomto zdánlivě velmi jednoduchém. Podle návodu by měla vzniknout kyselina dusičná, ovšem není jasná formulace o jejím vysrážení rtuť, tím méně pak o proměně stříbra ve zlato získaným produktem. Nelze odhadnout, co by mělo obarvit stříbro na žluto.

Další možností bylo připravit produkt, jenž by mohl v celém objemu připomínat zlato, což měl být případ jiného postupu z téhož manuálu. Jako výchozí složky jsou předepsány kamenec, sanytr, vitriol, dále pak verdigris a rumělka (HgS). Z této směsi se má vyrobit kyselina dusičná a nalít na směs rumělky, surové rtuti a červeného vitriolu (patrně Fe₂O₃ připravený žiháním síranu železnatého). Následovat má destilace, blíže nepopsané čištění, a v produktu se má rozpustit stříbro. Po třiceti dnech se údajně objeví zlato. Stejně jako v předchozím případě se nelze vyjádřit k chemismu tohoto procesu. Návody tohoto typu jsou v alchymických textech běžné a jak se ukazuje, ne vždy se psalo o gradaci, i když to byl často úplně stejný postup, který měl v jiném pramenu právě toto označení. Některé další podobné Paracelsovy preparáty uvádí Libava jako *aqua graduale Paracelsi*.

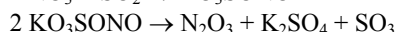
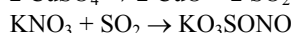
5. Rekonstrukce výroby kyseliny dusičné

Ve druhé polovině minulého století se Schröder²⁸ pokusil zreprodukovat staré postupy výroby kyseliny dusičné, přičemž se snažil o co nejuvěrnější přiblížení dobovým praktikám. Pokud to bylo možné, reaktanty pocházely z ložisek těžených v minulosti, což se týkalo minerálů, v některých případech bylo možné použít látky, které se zachovaly v použitelném stavu v různých sbírkách. V ostatních případech respektoval Schröder fakt, že ingredience používané v minulosti obsahovaly nečistoty a pokusil se přiblížit tomuto stavu modelovými látkami. Stejně si počínal při volbě laboratorního náčiní a aparatur včetně toho, že jejich spoje utěsňoval „lutem“, hlinou, do níž byly přimíchány koňské žíně, sláma apod. Také zahřívání prováděl zprvu dřevem, než zjistil, jak se mění teplota, takže později používal moderní topná tělesa s tím, že teplota byla zvyšována stejně jako při použití dřeva nebo dřevěného uhlí. Ve svých experimentech zopakoval dva postupy, jejichž produkty, jak bylo výše uvedeno, byly v minulosti pokládány za odlišné preparáty:

Aqua fortis: směs 150,0 g sanytru, 150,0 g vitriolu a 50,0 g kamence se podrobila suché destilaci v hliněné baňce při teplotě přibližně 800 °C. Výtěžek přepočtený na HNO₃ byl 50,0 g, což bylo 74 % teoretické hodnoty. Jak Schröder uvádí, získal modrou kapalinu, jejíž zbarvení způsoboval oxid dusitý; po nějaké době zbarvení zmizelo. Analýza ukázala, že produktem byla směs obsahující HNO₃ koncentrace 51 % a malé množství HNO₂ (0,4 %).

Spiritus nitri: byla provedena suchá destilace směsi 50,0 g sanytru a 150,0 g bolus alba (hydratovaný hlinitokřemičitan, kaolin), rovněž v hliněné destilační nádobě při teplotě 800–1000 °C. Získaných 8,0 g modrozeleného destilátu odpovídá v přepočtu na čistou HNO₃ asi 32 % teoretického výtěžku. Produktem byla HNO₃ koncentrace 53,2 % a malé množství HNO₂ (0,6 %). Barva produktu se časem změnila na světle žlutou.

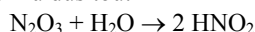
O chemický výklad prvního z procesů se pokusili Soukup a Mayer²⁹. Podle nich pouze jeden z Agricolových návodů poskytuje skutečně kyselinu dusičnou, totiž ten, který vychází ze 4 liber vitriolu, 2½ libry sanytru, ½ libry kamence a 1½ libry pramenité vody. Toto složení se blíží šestému návodu z *De re metallica*. Jestliže se postupuje, jak to popsál Agricola, je podle autorů „vidět modrá, resp. chvílemi zelená kapalina v chladiči, která za mohutného vývinu plynů kape do recipientu.“ Je to oxid dusitý vznikající sledem reakcí:



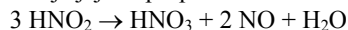
Pokud není chlazení dostatečné, N₂O₃ se rozkládá:



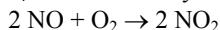
v opačném případě se tento oxid rozpouští ve vodě na kyselinu dusitou:



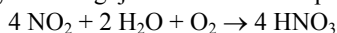
a následuje její disproportionace:



Oxid dusnatý reaguje s kyslíkem vznikajícím rozkladem CuSO_4 na oxid dusičitý:

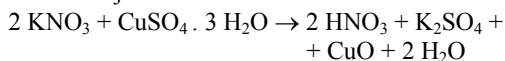


který dále reaguje s vodou na další podíl kyseliny dusičné:



Při vyšších teplotách a slabším chlazení kondenzátu mohou probíhat také jiné reakce, přičemž se může tvořit nitrosylsírová kyselina, oxid sírový a vodní pára, a v takových případech nemusí vznikat oxid dusitý. Za těchto podmínek se může přímo vytvářet směs kyseliny sírové a dusičné (viz dále, Lemery). Odlišný průběh některých reakcí může být způsoben použitím keramických destilačních nádob, kdy do procesu vstupují křemičitany. Kontaminace sanytru chloridem draselným vede, jak výše uvedeno, ke vzniku jistého množství kyseliny chlorovodíkové.

Jestliže byl vitriol předem kalcinován, tedy zčásti zbaven krystalové vody, lze podle citovaných autorů zapasat sumární děj rovnicí:



6. Konec „vody“ a „ducha“

Roku 1675 vydal Francouz Nicolas Lemery (1645 až 1715) první učebnici chemie³⁰, *Cours de chimie*, která byla následujících sto let uznávaným pramenem. V tomto díle je kyselina dusičná uvedena dvakrát, totiž jako *aqua fortis* a jako *spiritus nitri*. V případě *aquae fortis* se má vycházet ze směsi sanytru, kalcinovaného vitriolu a suché hlíny, a jak Lemery píše, produktem je směs „spiritu nitri a vitrioli“, tedy kyselin dusičné a sírové.

Zajímavý je autorův komentář. Vitriol a hlína slouží prý jen k tomu, aby od sebe oddělily částice sanytru, které jsou navzájem příliš pevně spojené. Lemery se v řadě svých komentářů pokouší o korpuskulární vysvětlení různých procesů, čímž navazuje na tyto představy, jak je začali rozpracovávat evropští alchymisté již ve vrcholném středověku³¹. Podle Lemeryho pochází největší korozivní schopnost *aquae fortis*, tedy její schopnost rozpouštět kovy, ze sanytru, zatímco vitriol má v tomto ohledu jen slabý účinek. Dodává však, „musím uznat, že oleum vitrioli je velmi korozivní ...“ To byl problém kyseliny sírové, která byla rovněž známá ve více formách lišících se koncentrací. *Oleum vitrioli* byla forma, které zůstal triviální název oleum dodnes.

Spiritus nitri se má destilovat ze směsi sanytru se suchou hlínou, přičemž nejprve se má na slabém ohni během 4–5 hodin oddestilovat „flegma“ (voda) a vylít „jako nepotřebné“. Po zesílení ohně se přibližně dvě hodiny objevují bílé dýmy, a když se plamen zesílí „na největší sílu“, následují dýmy červené. Celý proces trvá přibližně 14 hodin. Jak Lemery píše v komentáři, bílé dýmy pocházejí z těkavé složky sanytru a poskytují jen slabý spiritus, což je správný postřeh, protože to je opět především vodní pára. Červené dýmy pocházejí z „fixní části“ sanytru a ty teprve činí spiritus velmi silným, což je důvodem, proč se

má oheň v závěrečné fázi procesu tak zesílit.

Lemery tedy stále uváděl dvě kyseliny dusičné lišící se způsobem přípravy, ale u první z nich, třebaže používal klasický termín pro kyselinu dusičnou, uvažoval také současně příměs kyseliny sírové. To byl ovšem problém techniky přípravy, jak je uvedeno v předchozím odstavci. Naproti tomu Glauber již dříve soudil, že „*spiritus nitri* a *aqua fortis* jsou spíš jedna věc a mají stejný účinek.“ Přesto dvojice kyselin dusičných pokračovala v existenci, až roku 1735 napsal skotský chemik William Cullen (1710?–1790)³¹: „Je to zcela nepatřičné podporovat, jako by to bylo nějakou autoritou, rozdíly ve jménech, když není skutečného rozdílu ve věci. Jak snadno tato rozdílná jména zavádějí lze pozorovat z toho, že se v téměř každé tabulce ve dvou odlišných částech objevují specifické váhy spiritum nitri a aquae fortis.“

Kyselina dusičná se definitivně stala jednou sloučeninou v klasickém spisu *Méthode de nomenclature chimique*³³, kde je jako *acide nitrique*, když dusitá je *acide nitreux*. V dalším významném Lavoisierově (1743–1794) díle³⁴, *Traité élémentaire de Chimie* z roku 1789, kde se v kapitole IX. zabývá tepelnou bilancí různých procesů (připomeňme, že teplo, *calorique*, považoval za hmotnou substanci), je odstavec věnovaný vzniku kyseliny dusičné oxidací kyseliny dusité, kde autor dospívá k závěru, že „když je kyslík fixován do kyseliny dusičné, uchovává si velkou část tepla, které měl.“ Výrazivo ještě zůstává v mnohém poplatné předchozím dobám, ale experimenty jsou již chemické. Kyselina dusičná se stala jednou sloučeninou.

Tato práce vznikla za podpory GA AV ČR grantem IAA 800330702.

LITERATURA

1. Darmstaedter E., v knize: *Die Alchemie des Geber*, str. 113. J. Springer, Berlin 1922.
2. Read J., v knize: *Prelude to Chemistry*, str. 48. G. Bell & Sons, London 1961.
3. Kraus P., v knize: *Alchemie, Ketzerrei, Apokryphen im frühen Islam*, str. 27. G. Olms, Hildesheim 1994.
4. Fück J. W.: *Ambix* 4, 81 (1951).
5. Newman W. R.: *Sudhoffs Archiv* 69, 76 (1985).
6. Newman W. R.: *Archives Internationales d'Histoire des Sciences* 35, 240 (1985).
7. Newman W. R.: *The Summa Perfectionis of Pseudo-Geber. A Critical Edition, Translation & Study*. E. J. Brill, Leiden 1991.
8. Priesner C., v knize: *Lexikon alchymie a hermetických věd* (Priesner C., Figala K., ed.), str. 168. Vyšehrad, Praha 2006.
9. Feldman M. R.: *J. Chem. Educ.* 57, 877 (1980).
10. Knihovna Národního muzea v Praze, rkp. V H 21.
11. Ramage A., Craddock P.: *King Croesus' Gold. Excavations at Sardis and the History of Gold Refining*. The British Museum Press, London 2000.
12. Darmstaedter E.: *Berg-, Probir-, und Kunstbüchlein*.

- Verl. der Münchener Drucke, München 1926.
13. Soukup R. W., v knize: *Chemie in Österreich. Bergbau, Alchemie und frühe Chemie*, kap. 5. Böhlau Verl., Wien 2007.
 14. Agricola G.: *De re metallica*, (přel. Hoover H. C. a L. H.). Dover Publ., New York 1950.
 15. Ercker L.: *Beschreibung Allerfürnemisten Mineralischen Ertzt*, fol. LXVII, r. Prag 1574.
 16. *Die Alchemie des Andreas Libavius. Ein Lehrbuch der Chemie aus dem Jahre 1597*, Kniha II., kap. XXVI a XXVI. Verl. Chemie, Weinheim 1964.
 17. Debus A. G.: *ISIS* 55, 43 (1964).
 18. Klein U., v knize: *Verbindung und Affinität*, str. 141. Birkhäuser, Basel 1994.
 19. *The Pirotechnia of Vannoccio Biringuccio*, (přel. Smith C. S., Gnudi M. T.). Kniha IV. Dover, New York 1990.
 20. Knihovna Národního muzea v Praze, rkp. III H 11, str. 359.
 21. Karpenko V., v knize: *The Mystical Metal of Gold. Essays on Alchemy and Renaissance Culture* (Linden S. J., ed.). AMS Press, New York 2007.
 22. Strebing R., Reif W.: *Mitteilungen der Numismatischen Gesellschaft in Wien* XVI, 209 (1932).
 23. Theophilus, v knize: *On Divers Arts*, (přel. Hawthorne J. G., Smith C. S.) str. 108. Dover, New York 1979.
 24. *Lexicon Alchemiæ sive dictionarium alchemisticum, ... auctore Martino Rulando*, Frankfurt 1612.
 25. Schneider W.: *Lexikon alchemistisch-pharmazeutischer Symbole*. Verl. Chemie, Weinheim 1962.
 26. Karpenko V.: *Ambix* 39, 47 (1992).
 27. Waite A. E., v knize: *The Hermetic and Alchemical Writings of Paracelsus the Great*, Vol. I, str. 342. The Alchemical Press, Edmonds 1992.
 28. Schröder G., v knize: *Die pharmazeutisch-chemischen Produkte deutscher Apotheken im Zeitalter der Chemiatrie*, str. 59. Herbig, Bremen 1957.
 29. Soukup R. W., Mayer H.: *Alchemistisches Gold. Paracelsische Pharmaka*. Böhlau Verl., Wien 1997.
 30. Lemery N., v knize: *Cours de Chymie, oder der vollkommene Chymist*, str. 522, 531. Dresden 1726.
 31. Newman W. R.: *Atoms and Alchemy*. The University of Chicago Press, Chicago 2006.
 32. Dobbin L.: *Ann. Sci.* 1, 147 (1936).
 33. De Morveau G., Lavoisier A.-L., Berthollet C. L., De Fourcroy A.-F.: *Méthode de Nomenclature Chimique*, Paris 1787.
 34. Lavoisier A.-L.: *Elements of Chemistry*, (přel. Kerr R.). Edinburgh 1790.

V. Karpenko (*Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic*): **The Past of Nitric Acid: Water or Spirit?**

In the present review attention is paid to the complex and sometimes obscure names for HNO₃, particularly in alchemy, which often led to confusion because some of them were interchangeably used for different mineral acids. The names for HNO₃ are divided into three groups: names derived from the Aristotelian element water, those pointing to the origin from sal nitrum, potassium nitrate, and code words preferred by alchemists. HNO₃ became a problematic compound which seemed to exist in several variants. Two of them, *aqua fortis* and *spiritus nitri*, prepared in different ways, were distinguished as two forms of HNO₃ till the 18th century. Modified preparations with added compounds of iron, arsenic, mercury and others were also described. In these cases, the final product was sometimes denoted *aqua fortis*; in alchemy the name *aqua graduale* was common. The rather complex mixtures were used in alchemy for attempted transmutation of metals. The review sums up the present state of knowledge, and turns attention to the questions that should be answered: more precise dating of the discovery of HNO₃ and of its form known as *spiritus nitri*. Alchemical recipes are a further problem: only rarely were they explained in terms of modern chemistry. A part of the review deals with attempts to reproduce the recipes under laboratory conditions, which could explain what reactions actually occurred. The history of HNO₃ thus calls for further research.

DEGRADÁCIA FOSFOLIPIDOV: TVORBA NOVÉHO ZO STARÉHO

MÁRIA ŠIMOČKOVÁ A PETER GRIAC

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

Maria.Simockova@savba.sk

Došlo 30.7.07, prepracované 23.3.09, prijaté 2.4.09

Kľúčové slová: degradácia lipidov, fosfolipázy, fosfolipidy

Obsah

1. Úvod
2. Degradáčn e enzýmy – fosfolipázy
 - 2.1. Fosfolipáza A₁ a A₂
 - 2.2. Fosfolipáza B
 - 2.3. Fosfolipáza C
 - 2.4. Fosfolipáza D
3. Využitie fosfolipáz v priemysle
4. Záver

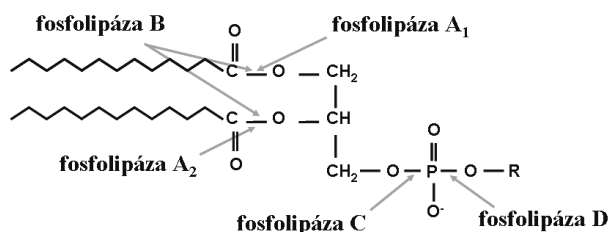
1. Úvod

Biologické membrány tvoria prirodzenú bariéru medzi vnútorným a vonkajším prostredím bunky. Podobne ako samotná bunka sú i bunkové organely ohraničené špecifickými intracelulárnymi membránami, ktorých chemická rôznorodosť naznačuje rozmanitú funkciu jednotlivých organel. Biologické membrány sú zložené zo stoviek rozdielnych proteínov a lipidov. Vychádzajúc z ich spoločných fyzikálnych vlastností, lipidy udržiavajú optimálnu permeabilitu (priepustnosť) membrán a slúžia ako podporný matrix pre proteíny ukotvené v membránach. O lipidoch sa však neuvažuje len ako o pasívnych komponentoch tvoriacich nepriepustnú bariéru. Čím ďalej tým viac sa o nich uvažuje ako o dynamických regulátoroch celej rady bunkových procesov. Okrem toho je známe, že bunkové membrány obsahujú oveľa viac druhov lipidov, ako je potrebné pre tvorbu lipidovej dvojvrstvy¹. Určité špecifické lipidové zloženie biologických membrán je potrebné pre správne fungovanie všetkých membránovo viazaných bunkových procesov. Zmeny v zložení a organizácii membránových lipidov majú výrazný vplyv na také životne dôležité procesy, ako sú prenos signálu a vnútrobunková výmena materiálu². Aby bolo možné zabezpečiť špecifické rozloženie lipidov v membránach, celý proces lipidovej homeostázy je komplexný. Významným procesom v udržiavaní

homeostázy membránových lipidov je okrem ich biosyntézy, transportu a prestavby aj ich degradácia. Degradáčn e proteíny zúčastňujúce sa hydrolyzy fosfolipidov sú fosfolipázy. Pre svoje hydrolytické vlastnosti majú fosfolipázy v procese prestavby membrán nezastupiteľnú úlohu. Väčšinu degradáčnych produktov bunka znovu využije na syntézu nových molekúl. Mnohé ďalšie degradáčn e produkty fosfolipidov majú v eukaryotických bunkách dôležitú signálnu a regulačnú úlohu. Ako príklad môžu slúžiť fosforylované formy fosfatidylinozitolu a z neho derivované molekuly – inozitolfosfáty, ktoré zohrávajú významnú funkciu vo vnútrobunkovej signalizácii. Fosfolipázy sú ďalej esenciálne pri štiepení živín, raste bunky, sekrécii, respirácii, bunkovom cykle, diferenciácii a v odpovedi na bunkový stres. V poslednej dobe sa venuje fosfolipázam zvýšená pozornosť v potravinárskom a farmaceutickom priemysle, kde sa náhradou prírodných enzýmov za chemické činidlá získavajú kvalitnejšie a ekologickéjšie produkty. Tejt o problematike je venovaná posledná kapitola tohto krátkeho prehľadu.

2. Degradáčn e enzýmy – fosfolipázy

Štyri hlavné skupiny fosfolipáz sa klasifikujú podľa rôzneho miesta účinku na molekule fosfolipidu (obr. 1). Fosfolipázy A (PLA) sú acylhydrolázy a odštiepujú acylovú skupinu buď v polohe *sn*-1 (PLA₁, EC 3.1.1.32) alebo v polohe *sn*-2 (PLA₂, EC 3.1.1.4). Enzýmy, ktoré sú schopné uvoľňovať obe acylové skupiny, sa nazývajú fosfolipázy B (PLB, EC 3.1.1.5). Medzi fosfodiesterázy patrí fosfolipáza C (PLC, EC 3.1.4.3), ktorá štiepi molekulu fosfolipidu za vzniku diacylglycerolu a fosforylovaného alkoholu a fosfolipáza D (PLD, EC 3.1.4.4), ktorej účinkom vzniká kyselina fosfatidová (diacylglycerolfosfát) a alkohol.



Obr. 1. Miesta hydrolytického účinku rôznych fosfolipáz na molekule fosfolipidu; fosfolipázy A₁, fosfolipázy A₂ a fosfolipázy B sa vyznačujú aktivitou, ktorá odštiepuje acylovú skupinu fosfolipidov. Fosfolipázy C a fosfolipázy D hydrolyzujú fosfodiesterovú väzbu substrátu

2.1. Fosfolipáza A₁ a A₂

Fosfolipázy A₁ sú enzýmy hydrolyzujúce esterovú väzbu fosfolipidu v pozícii *sn*-1 za vzniku 2-acyllyzofosfolipidu a mastnej kyseliny. Tieto enzýmy sa vyznačujú širokou substrátovou špecifitou a okrem fosfolipidov hydrolyzujú triacylglyceroly a galaktolipidy. Niektoré cicavčie PLA₁ sú však selektívne iba k špecifickému substrátu, ktorým je napríklad fosfatidylserín a kyselina fosfatidová. Pravdepodobnou funkciou týchto fosfolipáz A₁ je produkcia špecifických bioaktívnych lyzofosfolipidov, lyzofosfatidylserínu a kyseliny lyzofosfatidovej³. Aktivita PLA₁ bola pozorovaná v mnohých bunkách a tkanivách u rôznych organizmov^{4,5}. U cicavcov je známych deväť PLA₁, pričom šesť z nich sú extracelulárne enzýmy a zvyšné tri proteíny sú intracelulárne. Intracelulárne a extracelulárne PLA₁ nezdediajú sekvenčnú homológiu a očividne majú aj odlišné funkcie. Na rozdiel od fosfolipáz A₂, C a D ostáva fyziologická funkcia PLA₁ z veľkej časti neznáma.

Fosfolipázy A₂ boli prvými popísanými fosfolipázami. Ich aktivita bola pozorovaná už pred viac ako storočím (1877-1878). Bokay vtedy v pankreatickej šťave sledoval degradáciu fosfatidylcholínu neznámou zložkou nazvanou ako pankreatická PLA₂. Neskôr na prelome storočia bola v jede kobry odhalená hemolytická aktivita zodpovedná za lýzu membrán erytrocytov. Lytická zlúčenina produkovaná venómovou fosfolipázou bola však identifikovaná až o dekádu neskôr a označená ako lyzocitín (lyzolecitín). K dnešnému dňu bolo popísané veľké množstvo najrôznejších fosfolipáz A₂. PLA₂ sú všeobecne charakterizované ako enzýmy stereospecificky katalyzujúce hydrolyzu centrálnu (*sn*-2) acylesterovej väzby fosfolipidu za vzniku voľnej mastnej kyseliny a lyzofosfolipidu. Lyzofosfolipidy sa v membránach nachádzajú vo veľmi nízkych koncentráciách, pričom zvýšenie ich hladiny vedie k zmene fyzikálno-chemických vlastností biologických membrán a v extrémnych prípadoch k ich lýze. V nízkych koncentráciách sú lyzofosfolipidy, najmä lyzofosfatidylcholínu a kyselina lyzofosfatidová považované za signálne molekuly⁶. Lyzofosfolipidy sú taktiež dôležitým medziproduktom pri prestavbe (remodelingu) fosfolipidov⁷. Mastné kyseliny, uvoľnené pôsobením PLA₂, akými sú kyselina arachidónová a kyselina olejová môžu byť použité ako zdroj energie. Dôležitejšou úlohou kyseliny arachidónovej je však jej funkcia sekundárneho posla a prekursora eikozanoidov, ktoré sa uplatňujú v iniciácii zápalového procesu, bolesti a horúčky⁸. Viaceré sekretované fosfolipázy A₂ majú ochranné antimikrobiálne účinky⁹. Medzi dôležité enzýmy, ktoré vykazujú aktivitu typu fosfolipázy A₂, patria aj hepatitická lipáza a lipáza degradujúca lipoproteíny, ktoré sú zodpovedné za degradáciu neutrálnych lipidov v chylomikrónoch a lipoproteínoch.

V roku 2000 boli PLA₂ klasifikované Six a Dennisom do dvoch hlavných typov založených na báze katalytického mechanizmu¹⁰. V jednej skupine boli tie enzýmy, ktoré využívajú katalytický histidín (His) ako primárny katalytický zvyšok, kým druhá skupina vyžadovala katalytický

serín (Ser) a acyl-serínový medziprodukt. Čím sa rodina fosfolipáz A₂ viac rozširuje, tým sa zvyšuje aj obtiažnosť zovšeobecnenia vlastností týchto proteínov. Zvyšujúce sa množstvo známych PLA₂ bolo nedávno znovu prerozdelené do pätnástich skupín, ktoré sú zahrnuté v piatich hlavných kategóriách či typoch: sekrečné PLA₂ (sPLA₂), cytozolické PLA₂ (cPLA₂), PLA₂ nezávislé od vápnika (iPLA₂), acetylhydrolázy štiepiace aktivujúci faktor krvných doštičiek (PAF-PLA₂; PAF - platelet-activating factor) a lyzozomálne PLA₂ (cit.^{11,12}).

Všeobecne sekrečné PLA₂ (skupiny IA, IB, IIA-F, III, V, IX, X, XIA-B, XII, XIII, XIV) majú nízku molekulovú hmotnosť (13-19 kDa), obsahujú 5 až 8 disulfidových väzieb a k svojej aktivite potrebujú milimolárne koncentrácie Ca²⁺ (cit.¹³). Všetky sPLA₂ katalyzujú hydrolyzu mastnej kyseliny rovnakým mechanizmom pomocou histidínu, ktorý je umiestnený v katalytickom centre proteínu. Hydrolyza substrátu prebieha cez aktiváciu a orientáciu molekuly vody pomocou vodíkových väzieb histidínu. Ďalším dôležitým aminokyselinovým zvyškom je konzervovaná kyselina asparágová (Asp), ktorá susedí s histidínom a tvorí s ním takzvanú His/Asp dyádu. Asp je ligandom pre Ca²⁺, ktorý vytvára pozitívne nabitú oxyaniónovú diery stabilizujúcu negatívny náboj prechodného stavu reakcie¹⁴. Cytozolické fosfolipázy A₂ (skupina IV so svojimi podskupinami) majú vyššiu molekulovú hmotnosť (> 60 kDa), vyžadujú mikromolárne koncentrácie iónov vápnika a sú známe tým, že preferenčne hydrolyzujú fosfolipidy s kyselinou arachidónovou¹⁵. Na rozdiel od sPLA₂ k hydrolyze acylovej skupiny vyžadujú katalytický serín, ktorý spolu s kyselinou asparágovou tvorí Ser/Asp dyádu. Zo štruktúry cytozolických PLA₂ je známe, že sú zložené z C2 domény, ktorá je schopná viazať dva vápnikové ióny a má afinitu k fosfolipidovým membránam a z katalytickej α/β hydrolázovej domény. Obe tieto domény sú potrebné pre úplnú enzymatickú aktivitu cPLA₂ (cit.¹⁶). Skupinou, ktorá pre svoju aktivitu nepotrebuje vápnik, je iPLA₂ (skupina VI). Tieto fosfolipázy sa vyznačujú vysokou molekulovou hmotnosťou (okolo 85 kDa) a ich katalytický mechanizmus je podobný so skupinou IV (cPLA₂), ktorá využíva serín k štiepeniu *sn*-2 esterovej väzby, avšak s tým rozdielom, že iPLA₂ nie sú špecifické pre fosfolipidy obsahujúce arachidonát¹¹. Ďalším členom PLA₂ sú PAF acetylhydrolázy, ktoré zahŕňajú skupinu VII a VIII. Tieto enzýmy boli pomenované na základe ich schopnosti hydrolyzovať acetyllové skupiny z pozície *sn*-2 z aktivačného faktora krvnej doštičky¹⁷. Aktívne miesto PAF-PLA₂ je zložené z aminokyselinových zvyškov serínu, histidínu a kyseliny asparágovej, ktoré spolu tvoria katalytickú triádu a nie dyádu ako bolo pozorované u ostatných PLA₂ (cit.¹⁸). Katalytická triáda bola pozorovaná aj v poslednej skupine XV, ktorá je zaradená do typu lyzozomálnych PLA₂. Lyzozomálne fosfolipázy A₂ zamieňajú hydroxylovú skupinu ceramidu v pozícii C-1 za acylovú skupinu, pričom ako donor využívajú masťnú kyselinu fosfolipidu¹⁹. Objavom nových členov rodín fosfolipáz A₂, ich štruktúrnou charakterizáciou a určením ich bunkových funkcií sa fosfolipázy A₂ stávajú významným terčom účinku mnohých lie-

čiv pri viacerých závažných ochoreniach²⁰ (hematologické, kardiovaskulárne, neurodegeneratívne ochorenia).

2.2. Fosfolipáza B

Fosfolipázy B sú heterogénna skupina enzýmov, ktoré odstraňujú masné kyseliny fosfolipidu z polohy *sn*-1 a *sn*-2 a tým vykazujú aktivitu fosfolipázy i lyzofosfolipázy²¹. Niektoré fosfolipázy B sa vyznačujú i transacylázovou aktivitou, sú schopné katalyzovať opačnú reakciu, tvorbu fosfolipidu z lyzofosfolipidu a masnej kyseliny. U cicavcov bola fosfolipáza B prvýkrát popísaná v črevách²². Neskôr bola prítomnosť enzýmu zistená aj na vnútornom povrchu kefkového lemu maturovaných enterocytov, kde je PLB potrebná k štiepeniu lipidov prijatých potravou²³ a v bunkách neutrofilov, kde pravdepodobne zohráva úlohu v obrane proti inváznym mikroorganizmom a v tvorbe lipidových molekúl iniciujúcich zápalovú reakciu²⁴. Niektoré huby a baktérie sú schopné sekretovať fosfolipázy do vonkajšieho prostredia. Kvasinková a bakteriálna extracelulárna aktivita PLB môže byť spojená s virulenciou poškodzujúcou hostiteľskú bunku. Táto aktivita pravdepodobne spôsobuje poškodenie hostiteľskej bunkovej membrány a tým uľahčí preniknutie mikroorganizmov do tkanív²⁵.

Veľmi zaujímavou fosfolipázou B sa javí enzým, ktorý bol nazvaný NTE (neuroathy target esterase, neurotoxická esteráza). Cicavčia NTE bola identifikovaná pri hľadaní molekulárnej podstaty neuropatií zapríčinených pôsobením organofosfátov. Ľudská NTE vykazuje na C-konci proteínu výraznú podobnosť s rodinou serínových hydroláz. Na základe cDNA sekvencie NTE boli identifikované jej homológy u ovocnej mušky *Drosophila melanogaster*, u nematódy *Caenorhabditis elegans* a u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Pomocou týchto modelových organizmov bolo zistené, že NTE má vlastnosti fosfolipázy B, ktorá štiepi fosfatidylcholin na glycerofosfocholín a voľné masné kyseliny. Potvrdením fosfolipázovej aktivity NTE bolo zistenie, že pri inhibícii NTE sa znižuje hladina vnútrobunkového glycerofosfocholínu u buniek tkanivových kultúr a naopak pri nadexpresii proteínu NTE sa hladina glycerofosfocholínu zvyšovala²⁶⁻²⁸. Nepítomnosť NTE aktivity má fatálny dôsledok v niektorých tkanivách vyšších eukaryotov. Jeho funkcia je pravdepodobne esenciálna pre prežitie post-mitotických, vysoko diferencovaných buniek, akými sú sekundárne gliové bunky placenty a neurónov a gliá nervového systému^{29,30}.

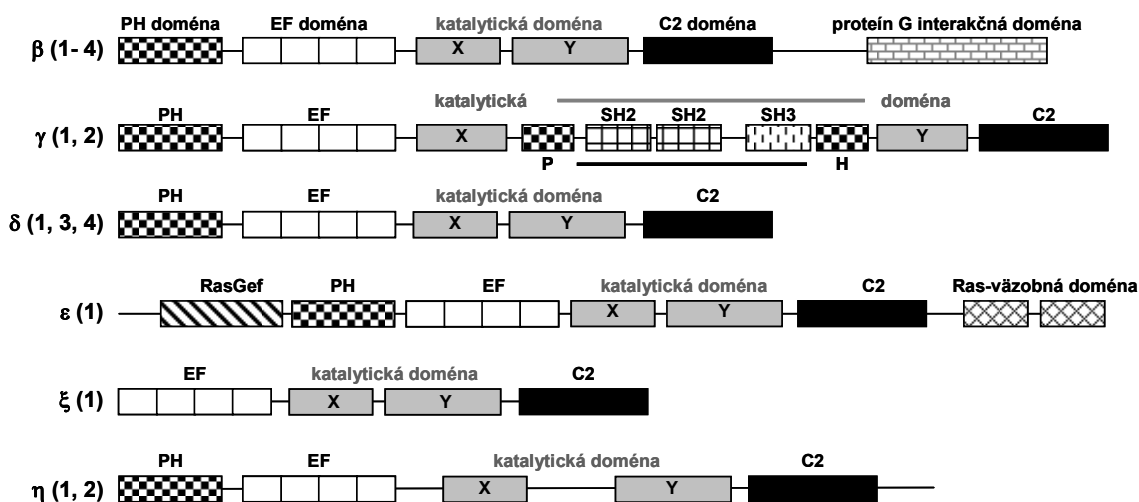
2.3. Fosfolipáza C

Fosfolipázy C hydrolyzujú fosfodiesterovú väzbu fosfolipidu v pozícii *sn*-3 za vzniku diacylglycerolu a alkoholfosfátu. Zvlášť veľká pozornosť sa venuje rodine fosfatidylinozitol špecifických fosfolipáz, ktoré majú kľúčový význam v bunkovej signalizácii³¹. Izoenzýmy fosfolipázy C špecifické pre fosfoinozitidy (EC 3.1.4.11) tvoria v eukaryotoch príbuznú skupinu proteínov, ktoré odštiepujú polárnu hlavičku fosfolipidov obsahujúcich inozitol. Tieto

enzýmy sú kontrolované receptormi bunkového povrchu a hydrolyzujú najmä viacnásobne fosforylovaný lipid, fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát (PIP₂), za vzniku dvoch vnútrobunkových signálnych molekúl: D-*myo*-inozitol-1,4,5-trifosfátu (IP₃) a diacylglycerolu. Aktivita fosfolipáz C bola popísaná v bunkách rôznych organizmov od baktérií, cez kvasinky a rastliny až po živočíchy. Cicavčia rodina PLC pozostáva z 13 izoenzýmov rozdelených do šiestich rodín, pričom sú známe štyri β (cit.³²), dve γ (cit.³³), tri δ (cit.³²), jedna ε (cit.³⁴), jedna ξ (cit.³⁵) a dve η izoformy³⁶. Tieto rôzne izoenzýmy PLC sa líšia v štruktúrnej organizácii, regulácii, aktivácii a v tkanivovej distribúcii proteínu. Kvasinky *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* a patogénna kvasinka *Candida albicans* obsahujú gén *PLC1* kódujúci približne 100 kDa proteín, ktorý je príbuzný s 85 kDa cicavčou δ-izoformou PLC.

Podľa kryštalografickej štruktúry PLC-δ₁ a PLC-β₂ je katalytická doména fosfolipázy C tvorená z X a Y regiónov^{32,37}. Táto doména je zložená zo striedajúcich sa α-helixov a β-skladaných listov a je podobná neúplnému α/β baredu triozafosfátizomerázy. Aktuálny model katalýzy PLC-δ₁ sa skladá z dvoch hlavných krokov. V prvom fosfotransferázovom kroku sú aminokyselinové zvyšky kyseliny glutámovej (390) a His-392 zapojené do prenosu protónu z hydroxylovej skupiny (v pozícii 2) inozitolového kruhu na fosfor, čím podporujú intramolekulový atak a cyklizáciu³⁸. V druhom fosfodiesterázovom kroku sú dôležitými aminokyselinovými zvyškami His-356 a His-311, ktoré sa zúčastňujú hlavnej kyslo-zásaditej katalýzy protonizáciou diacylglycerolovej skupiny³⁹. Po celom katalytickom mieste PLC-δ₁ sa nachádza sieť vodíkových väzieb a soľných mostíkov. Táto sieť väzieb viaže inozitolový kruh a zvyčajne zodpovedá za substrátovú špecifitu. Je zaujímavé, že výmena arginínu v pozícii 549 v druhej polovici α/β baredu nepoškodí katalytickú aktivitu enzýmu, ale zmení jeho substrátovú preferenciu z PIP₂ na fosfatidylinozitol⁴⁰. Na substrátovú špecifitu PLC vplýva aj rôzny charakter polárnej hlavičky lipidu. Kým prokaryotické formy PLC preferujú ako substrát fosfatidylinozitol a fosfatidylinozitol glykány, eukaryotické enzýmy všeobecne uprednostňujú PIP₂ pred fosfatidylinozitol-4-fosfátom a fosfatidylinozitolom.

Sekvencie eukaryotických PLC obsahujú rad domén (obr. 2), ktoré sú organizované okolo katalytického α/β baredu⁴¹. Všetky izoformy PLC obsahujú tri regulačné domény: (i) plextrin homologickú (PH) doménu, ktorá viaže fosfoinozitidy a/alebo proteíny a pravdepodobne slúži ako držiak alebo povraz, ktorý spája proteín s membránovým povrchom počas katalýzy⁴², (ii) EF motívy viažuce vápnik⁴³ a (iii) samostatnú C2 doménu, ktorá obyčajne v prítomnosti iónov Ca²⁺ viaže fosfolipidy⁴⁴. Výnimkou je len PLC-ξ, ktorá neobsahuje PH doménu⁴⁵. Každá z rôznych rodín PLC odpovedá na odlišné stimuly, čomu nasvedčujú aj rôzne regulačné domény fosfolipáz C (obr. 2). Väčšinou sa funkcia fosfolipáz C spája so vznikom dôležitej signálnej molekuly IP₃, či už v cytoplazme alebo v jadre. Izoformy PLC majú kľúčovú úlohu vo váp-



Obr. 2. Lineárna reprezentácia funkčných domén jednotlivých rodín fosfolipáz C; vo všetkých fosfoinozid špecifických fosfolipázach C je katalytická doména rozdelená do dvoch regiónov, X a Y, ktoré sú obklopené rôznymi regulačnými doménami (upravené podľa cit.⁴¹). SH2 – Src homologická doména 2; SH3 – Src homologická doména 3; RasGef – Ras guanine nucleotide exchange factor-like domain, RasGef-doména príbuzná s výmenným faktorom guanínu; PX – plextrín homologická doména; PH – phox homologická doména

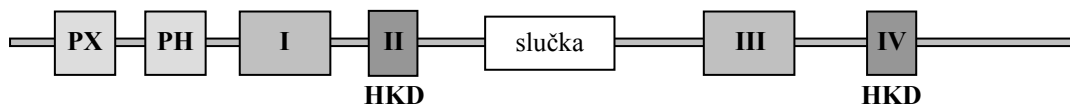
nikom sprostredkovanej signalizácii. Zvýšenie hladiny vápnika v bunke je zabezpečené hlavne tvorbou univerzálneho sekundárneho posla IP_3 , ktorý sa viaže na Ca^{2+} kanál v endoplazmatickom retikule a aktivuje ho³³. Ďalšou molekulou, ktorá vzniká účinkom PLC, je diacylglycerol. Diacylglycerol zohráva úlohu v mnohých bunkových procesoch, pričom najznámejšia úloha je aktivácia proteínkinázy C (cit.⁴⁶). Produkty štyroch jadrových izoform PLC- β pravdepodobne ovplyvňujú zostrih pre-mRNA a štruktúru chromatinu⁴⁷. PLC- η_2 je neurón špecifický enzým, ktorý je dôležitý pre vznik a/alebo udržiavanie siete neurónov v mozgu⁴¹.

2.4. Fosfolipáza D

Aktivita PLD bola prvýkrát pozorovaná v extraktoch mrkvy ako aktivita fosfolipid špecifickej fosfodiesterázy, ktorá hydrolyzuje fosfatidylcholin za vzniku kyseliny fosfatidovej. Neskôr bola táto aktivita pozorovaná u rôznych organizmov od vírusov cez baktérie, kvasinky, rastliny až k cicavcom. V bunkách cicavcov je aktivita fosfolipázy D prítomná v takmer všetkých typoch buniek okrem leukocy-

tov a niektorých lymfocytov. Fosfolipáza D je okrem veľkého množstva povrchových receptorov regulovaná vnútrobunkovými faktormi, vrátane aktivácie proteínkinázou C, malými GTPázami a najmä pomocou fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátu⁴⁸.

Fosfolipázy D sú charakteristické štruktúrou, v ktorej sú katalytické domény zo strán ohraničené regulačnými sekvenciami (obr. 3). Tieto sekvencie zahŕňajú lipidviažuce PX (Phox homologická) a PH domény ako i väzobné miesto pre PIP_2 (cit.^{49,50}). PH doména ľudskej PLD1 a PLD2 a kvasinkovej fosfolipázy D1 (Spo14p) zohráva kritickú úlohu vo väzbe enzýmu na špecifické lipidové povrchy, ktoré obsahujú PIP_2 . Táto doména však neviaže PIP_2 , ktorý je dôležitý k aktivácii enzýmu a ktorého väzobné miesto sa nachádza v katalytickej doméne PLD (cit.⁵¹). PX doména pravdepodobne zabezpečuje interakcie s inými proteínmi alebo viaže fosfatidylinozitolfosfáty⁵². Ďalším konzervovaným regiónom PLD1 ale nie PLD2 je takzvaná slučka, ktorá má úlohu v negatívnej regulácii proteínu⁵³. Nielen spomínané domény, ale aj konce proteínu sú dôležité pre aktivitu PLD. N-koniec PLD1 je potrebný k stimulácii enzýmu



Obr. 3. Základná štruktúra ľudskej fosfolipázy D1; domény I až IV predstavujú konzervované katalytické jadro eukaryotických fosfolipáz D (upravené podľa cit.⁵⁰). PX – plextrín homologická doména; PH – phox homologická doména

pomocou proteínkinázy C (cit.⁵⁴) a bunková lokalizácia proteínu je definovaná jeho C-koncom⁵⁵.

Katalytické jadro eukaryotických fosfolipáz D pozostáva zo štyroch konzervovaných oblastí (I-IV). Obzvlášť vysoko konzervované sú domény II a IV, ktoré obsahujú HKD (H-histidín, K-arginín, D-kyselina glutámová) motív (obr. 3). Kompletné zachovanie týchto motívov v evolúcii naznačuje ich dôležitú úlohu, ktorá bola overená mutačnými štúdiami⁵⁴. Každý z HKD motívov tvorí polovicu účinného aktívneho miesta. Individuálne exprimovaný N- alebo C-koncový HKD fragment fosfolipázy D1 je katalyticky neaktívny.

Objav transfosfatidylačnej reakcie PLD viedol k úvahám o tvorbe intermediátu fosfatidyl-enzým v priebehu reakcie. Na základe svojich experimentov na rastlinnej PLD Stanacev a Stuhne-Sekalec navrhli model, v ktorom katalytický mechanizmus PLD zahŕňa dvojstupňovú „ping-pong“ reakciu, v ktorej je tvorba kovalentného fosfatidyl-enzýmového intermediátu nasledovaná buď hydrolýzou alebo transfosfatidyláciou⁵⁶. Histidínový aminokyselinový zvyšok z HKD motívu slúži ako nukleofilný atak na fosfát vo fosfodiesterovej väzbe za tvorby prechodného fosfoenzýmového intermediátu. V druhej polovici reakcie je fosfoenzýmový medziprodukt hydrolyzovaný vodou (alebo primárnymi krátkymi reťazcami alkoholu) za uvoľnenia kyseliny fosfatidovej (alebo fosfatidylalkoholu) (cit.⁵⁷).

O biologickej funkcii fosfolipáz D najviac vypovedá poznatok, že produkt degradácie fosfolipidov týmto enzýmom, kyselina fosfatidová, je vnútrobunkovým lipidovým poslom. Tento fakt indikuje úlohu fosfolipáz D v rôznych formách regulácie vnútrobunkového membránového transportu, ako aj v metabolických dráhach, ktoré regulujú bunkový rast, adaptáciu a diferenciáciu^{49,58}. Samotná kyselina fosfatidová môže taktiež priamo svojimi fyzikálno-chemickými vlastnosťami ovplyvňovať zakrivenie biologických membrán a slúžiť ako kotevné miesto pre proteíny asociované s membránami⁵⁹. V bunke môže byť kyselina fosfatidová premenená na iné bioaktívne lipidy, včítane diacylglycerolu a kyseliny lyzofosfatidovej^{6,46}.

3. Využitie fosfolipáz v priemysle

Fosfolipidy sú amfifilné molekuly a povrchovo aktívne látky. Pre svoje vlastnosti sa využívajú hlavne v potravinárskom priemysle, napríklad na redukciu viskozity a kryštalizácie čokolády, na stabilizáciu vlhkosti instantných produktov a slúžia aj ako prostriedok proti oroseniu a hnednutiu margarínu. Vo farmaceutickom priemysle sú lipidy často aplikované ako špecifické nosiče liečiv. Komerčne dostupné fosfolipidy sa bežne získavajú zo surového sójového oleja, slnečnicového oleja a vaječného žltka pomocou chemických alebo biochemických postupov. Biochemická modifikácia alebo syntéza poskytuje náhradné a často lacnejšie cesty pre úpravu a výrobu fosfolipidov určených pre rôzne aplikácie. Porovnaním s chemickými metódami majú enzymatické modifikácie

niekoľko výhod. Selektivita a špecifita je jednou z najdôležitejších vlastností proteínov, ktoré robia úpravu fosfolipidov jednoduchšou a ľahšou oproti chemickým postupom. Enzymatické reakcie sú často vykonávané za miernejších podmienok, ktoré prispievajú k zachovaniu pôvodných vlastností lipidov. Ďalšou výhodou je, že bio-katalytické prístupy vysoko redukujú použitie toxických a škodlivých roztokov, a tak poskytujú bezpečnejšie a čistejšie produkty pre potravinársky, farmaceutický a kozmetický priemysel. V poslednej dobe získané poznatky v oblasti biochémie lipidov otvárajú nové možnosti pre vývoj enzymológie a inžinierstva fosfolipidov. Tieto možnosti zahŕňajú syntézu lipidových analógov prírodne sa vyskytujúcich bioaktívnych zlúčenín pre farmaceutické využitie^{60,68,69}.

Fosfolipázy sú dôležitou skupinou enzýmov, ktoré hydrolyzujú fosfolipidy za vzniku rôznych produktov. Postupne s vývojom DNA technológií je možné exprimovať čoraz väčšie množstvo fosfolipáz v cudzích organizmoch. Táto produkcia viedla k vzniku nových a lepších fosfolipáz, ktoré boli následne využité v priemyselných aplikáciách. Niektoré z nich, ako prasačia pankreatická fosfolipáza A₂, sú používané v priemysle už po desaťročia. Fosfolipázy sa všeobecne využívajú na výrobu emulgátorov, ktoré vznikajú pôsobením fosfolipáz na fosfolipidy prirodzene sa nachádzajúce v ingredienciách. Uplatňujú sa vo výrobe škrobov, konzumných olejov, syrov a v pekárskom priemysle⁶¹.

V pekárskom priemysle sa využitím fosfolipáz dosahuje zvýšená kvalita cesta. Lipidy a ich hydrolyzované produkty sú potrebné pre stabilizáciu vzduchových bublín v ceste, čo vedie k jemnejšej štruktúre, k zväčšeniu objemu chleba a aj k jeho predĺženej trvanlivosti⁶². Fosfolipázy sa tiež uplatňujú v mliekarskom priemysle na výrobu syra, jogurtu, mlieka a zmrzliny. Napríklad pri produkcii syra, hydrolýza mliečnych fosfolipidov pred pridaním syridla značne zvýši výťažok syra bez znižovania jeho kvality⁶³. Zlepšenie výťažku syra je pravdepodobne dôsledkom zvýšeného zadržovania tuku a vlhkosti v syrenine. Hydrolýza hydrofóbných fosfolipidov pomocou fosfolipázy A₁ vedie k uvoľneniu menej hydrofóbných a teda viac vo vode rozpustných lyzofosfolipidov. Predpokladá sa, že lyzofosfolipidy, ktoré sú uvoľnené z mliečného tuku, slúžia ako povrchovo aktívne činidlo v syrenine a tým napomáhajú k emulgácii vody a tuku počas spracovania syra. Jedna z ďalších aplikácií fosfolipáz je prečisťovanie konzumných olejov. Surové rastlinné oleje obsahujú rôzne druhy nežiaducich látok, ktoré znehodnocujú ich kvalitu: voľné mastné kyseliny, fosfolipidy nazývané ako gummy, stopy kovov, farbív a ťažké kovy. Veľká časť fosfolipidov sa odstraňuje vodou, avšak zvyšná časť je odstraňovaná buď žieravým procesom alebo enzymaticky za pomoci fosfolipázy A alebo fosfolipázy C. Prídavkom malého množstva vody do surového oleja sa fosfolipidy hydratujú a tvoria gumu. Táto guma je následne z oleja separovaná odstredením. Vzhľadom k tomu, že amfifilné fosfolipidy sú dobrými emulgátormi, vychytávajú z oleja i triacylglyceroly, čím sa znižuje konečný výťažok oleja.

Pridanie fosfolipázy C v čistiacom procese hydrolyzuje fosfolipidy, čím sa zníži množstvo vychytaných triacylglycerolov v gume a zvýši sa výťažok oleja⁶⁴. Enzymatická rafinácia surových rastlinných olejov prebieha aj pomocou fosfolipázy A₂. Toto prečisťovanie je založené na štiepení fosfatidylcholínu za vzniku lyzofosfatidylcholínu, ktorý je rozpustný vo vode a môže byť odseparovaný⁶⁵. Ďalšia možná aplikácia fosfolipáz je založená na modifikovaní a príprave nových druhov lipidov. PLA₂ sa najviac uplatňuje v zámene rôznych mastných kyselín fosfolipidov. Diacylglycerol produkovaný hydrolýzou PLC má enantiomerné vlastnosti prírodných produktov, ktoré môžu byť využité pre syntézu stereošpecifických zlúčenín⁶⁶. V neposlednom rade pomocou transesterifikačnej aktivity PLD je možné syntetizovať menej sa vyskytujúce fosfolipidy ako fosfatidyletanolamín, fosfatidylserín a fosfatidylglycerol z často sa vyskytujúceho fosfatidylcholínu⁶⁷.

Za posledných 25 rokov môžeme sledovať prudký nárast vedomostí o štruktúrnej a biologickej funkcii fosfolipáz. Vzhľadom k tomu, že fosfolipázy zohrávajú rozhodujúcu úlohu v mnohých biochemických procesoch (napríklad trávenie a vznik zápalu), stávajú sa zaujímavým terčom vo farmaceutickom a biotechnologickom priemysle, kde sa vyvíjajú selektívne a účinné inhibitory voči týmto enzýmom²⁰.

4. Záver

V blízkej budúcnosti v súvislosti s rozvojom proteomických a lipidomických metodológií očakávame nárast znalostí o degradačných procesoch, ktoré sa podieľajú na homeostáze, alebo lepšie povedané na homeodynamike membránových lipidov. Fosfolipázy sa podieľajú na neustálej obnove lipidov v biologických membránach. Na základe svojich enzymatických vlastností sa rozdeľujú do štyroch hlavných tried, ktoré sa stále rozrastajú. Každá z fosfolipáz má v bunke okrem degradačnej funkcie aj nezastupiteľnú regulačnú úlohu. Najznámejšou funkciou fosfolipázy A₂ je produkcia prekurzora syntézy eikozanoidov, kyseliny arachidónovej. Fosfolipáza B je zapojená v trávení lipidov prijatých potravou. Degradačné produkty fosfoinozid špecifických fosfolipáz C regulujú hladinu vápnika v bunke a aktivitu proteínkinázy C. Kyselina fosfatidová, ktorá je hydrolyzovaná z fosfolipidu pomocou fosfolipázy D je zapojená do rôznych transportných masínérií bunky. Známe enzymatické vlastnosti fosfolipáz sa čoraz častejšie využívajú v priemysle. V poslednej dobe narastá trend „bio“ produktov, kde sa namiesto chemických prísad používajú prírodné enzýmy, ktoré častokrát zabezpečia prípravu oveľa kvalitnejších a ekologickejších produktov. Mnohé biotechnologicky využívané fosfolipázy sa už dnes produkujú v mikroorganizmoch a s ďalším rozvojom proteínového inžinierstva bude možné cielene produkovať fosfolipázy so želanými vlastnosťami a tak rozšíriť možnosti ich aplikácie.

Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA 2/7136/27 a VVCE-0064-07.

Použité skratky

cPLA ₂	cytozolická fosfolipáza A ₂
IP ₃	D- <i>myo</i> -inozitol-1,4,5-trifosfát
iPLA ₂	fosfolipáza A ₂ nezávislá od iónov vápnika
PAF	aktivujúci faktor krvných doštičiek
PH	plextrin homologická doména
PIP ₂	fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát
PLA ₁	fosfolipáza A ₁
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLB	fosfolipáza B
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PX	phox homologická doména
sPLA ₂	sekrečná fosfolipáza A ₂

LITERATÚRA

- Holthuis J. C., Levine T. P.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 209 (2005).
- Maxfield F. R., Tabas I.: *Nature* 438, 612 (2005).
- Aoki J., Inoue A., Makide K., Saiki N., Arai H.: *Biochimie* 89, 197 (2007).
- Sato T., Aoki J., Nagai Y., Dohmae N., Takio K., Doi T., Arai H., Inoue K.: *J. Biol. Chem.* 272, 2192 (1997).
- Watanabe I., Koishi R., Yao Y., Tsuji T., Serizawa N.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 820 (1999).
- Rivera R., Chun J.: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 160, 25 (2008).
- Moolenaar W. H., van Meeteren L. A., Giepmans B. N.: *Bioessays* 26, 870 (2004).
- Funk C. D.: *Science* 294, 1871 (2001).
- Nevalainen T. J., Graham G. G., Scott K. F.: *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 1 (2008).
- Six D. A., Dennis E. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 1 (2000).
- Schaloske R. H., Dennis E. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1246 (2006).
- Burke J. E., Dennis E. A.: *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23, 49 (2009).
- Lambeau G., Gelb M. H.: *Annu. Rev. Biochem.* 77, 495 (2008).
- Bahnsen B. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 96 (2005).
- Ghosh M., Loper R., Gelb M. H., Leslie C. C.: *J. Biol. Chem.* 281, 16615 (2006).
- Hsu Y. H., Burke J. E., Stephens D. L., Deems R. A., Li S., Asmus K. M., Woods V. L., Jr., Dennis E. A.: *J. Biol. Chem.* 283, 9820 (2008).
- Gardner A. A., Reichert E. C., Topham M. K., Stafforini D. M.: *J. Biol. Chem.* 283, 17099 (2008).
- Tjoelker L. W., Eberhardt C., Unger J., Trong H. L.,

- Zimmerman G. A., McIntyre T. M., Stafforini D. M., Prescott S. M., Gray P. W.: *J. Biol. Chem.* 270, 25481 (1995).
19. Hiraoka M., Abe A., Shayman J. A.: *J. Lipid Res.* 46, 2441 (2005).
 20. Burke J. E., Dennis E. A.: *J. Lipid Res.* (2008).
 21. Chaminade B., Le Balle F., Fourcade O., Nauze M., Delagebeaudeuf C., Gassama-Diagne A., Simon M. F., Fauvel J., Chap H.: *Lipids* 34 Suppl, S49 (1999).
 22. Delagebeaudeuf C., Gassama-Diagne A., Nauze M., Ragab A., Li R. Y., Capdevielle J., Ferrara P., Fauvel J., Chap H.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 859, 192 (1998).
 23. Maury E., Prevost M. C., Nauze M., Redoules D., Tarrow R., Charveron M., Salles J. P., Perret B., Chap H., Gassama-Diagne A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 362 (2002).
 24. Xu S., Zhao L., Larsson A., Venge P.: *Febs. J.* 276, 175 (2009).
 25. Ghannoum M. A.: *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 122 (2000).
 26. Zaccheo O., Dinsdale D., Meacock P. A., Glynn P.: *J. Biol. Chem.* 279, 24024 (2004).
 27. Fernandez-Murray J. P., McMaster C. R.: *J. Biol. Chem.* 280, 38290 (2005).
 28. Fernandez-Murray J. P., McMaster C. R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 331 (2007).
 29. Glynn P.: *Biochim. Biophys. Acta* 1736, 87 (2005).
 30. Glynn P.: *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 58, 355 (2007).
 31. Suh P. G., Park J. I., Manzoli L., Cocco L., Peak J. C., Katan M., Fukami K., Kataoka T., Yun S., Ryu S. H.: *BMB Rep.* 41, 415 (2008).
 32. Drin G., Scarlata S.: *Cell. Signalling* 19, 1383 (2007).
 33. Patterson R. L., van Rossum D. B., Nikolaidis N., Gill D. L., Snyder S. H.: *Trends Biochem. Sci.* 30, 688 (2005).
 34. Bunney T. D., Katan M.: *Trends Cell Biol.* 16, 640 (2006).
 35. Swann K., Saunders C. M., Rogers N. T., Lai F. A.: *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 264 (2006).
 36. Zhou Y., Wing M. R., Sondek J., Harden T. K.: *Biochem. J.* 391, 667 (2005).
 37. Essen L. O., Perisic O., Cheung R., Katan M., Williams R. L.: *Nature* 380, 595 (1996).
 38. Essen L. O., Perisic O., Katan M., Wu Y., Roberts M. F., Williams R. L.: *Biochemistry* 36, 1704 (1997).
 39. Ellis M. V., James S. R., Perisic O., Downes C. P., Williams R. L., Katan M.: *J. Biol. Chem.* 273, 11650 (1998).
 40. Cheng H. F., Jiang M. J., Chen C. L., Liu S. M., Wong L. P., Lomasney J. W., King K.: *J. Biol. Chem.* 270, 5495 (1995).
 41. Nakahara M., Shimozawa M., Nakamura Y., Irino Y., Morita M., Kudo Y., Fukami K.: *J. Biol. Chem.* 280, 29128 (2005).
 42. Ferguson K. M., Lemmon M. A., Schlessinger J., Sigler P. B.: *Cell* 83, 1037 (1995).
 43. Kobayashi M., Gryczynski Z., Lukomska J., Feng J., Roberts M. F., Lakowicz J. R., Lomasney J. W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 440, 191 (2005).
 44. Hurley J. H., Misra S.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 49 (2000).
 45. Saunders C. M., Larman M. G., Parrington J., Cox L. J., Royse J., Blayney L. M., Swann K., Lai F. A.: *Development* 129, 3533 (2002).
 46. Goto K., Hozumi Y., Nakano T., Saino-Saito S., Martelli A. M.: *Tohoku J. Exp. Med.* 214, 199 (2008).
 47. Cocco L., Faenza I., Fiume R., Maria Billi A., Gilmore R. S., Manzoli F. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 509 (2006).
 48. Exton J. H.: *FEBS Lett.* 531, 58 (2002).
 49. McDermott M., Wakelam M. J., Morris A. J.: *Biochem. Cell Biol.* 82, 225 (2004).
 50. Jenkins G. M., Frohman M. A.: *Cell Mol. Life Sci.* 62, 2305 (2005).
 51. Du G., Altshuller Y. M., Vitale N., Huang P., Chasserot-Golaz S., Morris A. J., Bader M. F., Frohman M. A.: *J. Cell Biol.* 162, 305 (2003).
 52. Xu Y., Seet L. F., Hanson B., Hong W.: *Biochem. J.* 360, 513 (2001).
 53. Sung T. C., Altshuller Y. M., Morris A. J., Frohman M. A.: *J. Biol. Chem.* 274, 494 (1999).
 54. Zhang A. L., Roomans G. M.: *Respir. Physiol.* 118, 237 (1999).
 55. Hughes W. E., Parker P. J.: *Biochem. J.* 356, 727 (2001).
 56. Stanacev N. Z., Stuhne-Sekalec L.: *Biochim. Biophys. Acta* 210, 350 (1970).
 57. Rudolph A. E., Stuckey J. A., Zhao Y., Matthews H. R., Patton W. A., Moss J., Dixon J. E.: *J. Biol. Chem.* 274, 11824 (1999).
 58. Morris A. J.: *Biochem. Soc. Symp.* 247 (2007).
 59. Roth M. G.: *Traffic* 9, 1233 (2008).
 60. Guo Z., Vikbjerg A. F., Xu X.: *Biotechnol. Adv.* 23, 203 (2005).
 61. De Maria L., Vind J., Oxenboll K. M., Svendsen A., Patkar S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 290 (2007).
 62. Neron S., El Amrani F., Potus J., Nicolas J.: *J. Chromatogr., A* 1047, 77 (2004).
 63. Lilbaek H. M., Broe M. L., Hoier E., Fatum T. M., Ipsen R., Sorensen N. K.: *J. Dairy Sci.* 89, 4114 (2006).
 64. Ciofalo V., Barton N., Kreps J., Coats I., Shanahan D.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45, 1 (2006).
 65. Clausen K.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103, 333 (2001).
 66. Iwasaki Y., Yamane T.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 90, 151 (2004).
 67. Ulbrich-Hofmann R., Lerchner A., Oblozinsky M., Bezakova L.: *Biotechnol. Lett.* 27, 535 (2005).
 68. Heinrich J., Švarcová I., Valentová K.: *Chem. Listy* 102, 245 (2008).
 69. Moravcová J., Opletal L., Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Drašar P.: *Chem. Listy* 101, 1002 (2007).

M. Šimočková and P. Griač (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Phospholipid Degradation: Making New from the Old**

Phospholipases are enzymes catalyzing controlled hydrolysis of phospholipids. The enzymes are major regulators of membrane lipid composition. In addition, phospholipase-mediated hydrolysis of phospholipids is an im-

portant source of vital signalling molecules. Hydrolytic properties of an increasing number of phospholipases are utilized in pharmaceutical and food industries. New lipid products could be prepared by the action of phospholipases in more efficient and more environment-friendly processes than those traditionally used. With the advances in protein engineering, modified phospholipases with desired new properties could be produced in microorganisms and thus their potential applications could be extended.

SPOJENIE EXTRAKCIE S VYUŽITÍM TEPLoty ZÁKALU MICELÁRNYCH ROZTOKOV S METÓDAMI ATÓMOVEJ SPEKTROMETRIE NA SEPARÁCIU, PREKONCENTRÁCIU A ŠPECIÁCIU KOVŮV

INGRID HAGAROVÁ

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Geologický ústav, Mlynská dolina G, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
hagarova@fns.uniba.sk

Došlo 11.4.08, prijaté 26.6.08.

Kľúčové slová: extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov, kovy, separácia, prekoncentrácia, špeciácia, atómová absorpčná spektrometria, atómová emisná spektrometria

Obsah

1. Úvod
2. Extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE)
 - 2.1. Princíp CPE
 - 2.2. Postup CPE na separáciu, prekoncentráciu a špeciáciu kovov
 - 2.3. Optimalizácia experimentálnych podmienok pre CPE kovov
 - 2.3.1. Výber chelatačného činidla
 - 2.3.2. Výber a koncentrácia tenzidu
 - 2.3.3. Vplyv pH
 - 2.3.4. Prídavky pomocných činidiel
 - 2.3.5. Teplota a čas inkubácie
 - 2.3.6. Separácia fáz
 - 2.3.7. Výber činidla na riedenie tenzidom obohatenej fázy
 - 2.4. Spojenie CPE s metódami atómovej spektrometrie
 - 2.4.1. Spojenie CPE a FAAS
 - 2.4.2. Spojenie CPE a ETAAS
 - 2.4.3. Spojenie CPE a ICP-AES
 - 2.5. Zhrnutie
3. Záver

1. Úvod

Spájanie separačných techník s detekčnými metódami predstavuje v súčasnosti moderný trend v smerovaní analytickej chémie. Je to spôsobené jednak z dôvodu častokrát až ultrastopových koncentrácií sledovaných analytov nachádzajúcich sa v environmentálnych a biologických vzorkách (pri ktorých sú kvantifikačné limity dostupných detekčných metód nepostačujúce), ale aj z dôvodu vysokých koncentrácií doprevádzajúcich zložiek, ktoré častokrát

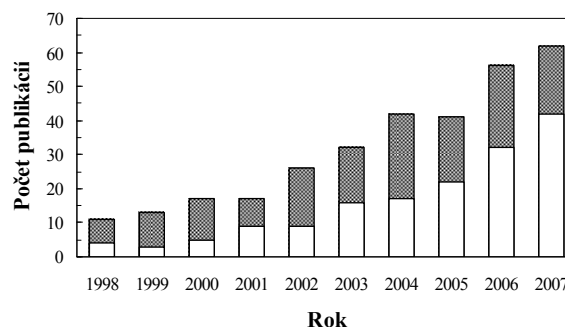
znemožňujú priame stanovenie analytov nachádzajúcich sa na stopových až ultrastopových úrovniach. Ďalším dôvodom je narastajúca potreba špeciácie predovšetkým toxických a esenciálnych prvkov.

Práve uvedené dôvody vedú k snahám vyvinúť nové postupy separácie, prekoncentrácie a špeciácie, ktoré by boli bezpečné, rýchle, spoľahlivé, časovo a finančne nenárodné.

V poslednom období je stále vyšší záujem venovaný technikám, ktoré využívajú rôzne micelárne roztoky tvorené z jedného alebo určitej zmesi neutrálnych tenzidov (neiónových alebo amfotérnych) na separáciu, prekoncentráciu, ale už aj špeciáciu rôznych analytov z analyzovaných vzoriek. Za posledných desať rokov je jednou z často využívaných metód práve extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov („Cloud Point Extraction“ – CPE).

2. Extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE)

Medzi prvé práce, ktoré popisujú využitie CPE pri analýze kovov, patria práce publikované pred 30 rokmi^{1,2}. Odvtedy počet prác, ktoré využívajú CPE či už pri extrakcii iónov kovov vo forme chelátov kovov alebo pri nankoncentrovaní organických polutantov, narastá. Kontinuálny nárast je zaznamenaný predovšetkým po roku 1990. Na obr. 1 sú znázornené počty publikácií venované využitiu CPE v rôznych oblastiach analytickej chémie pri analýze organických aj anorganických analytov, ako aj počty publikácií venované využitiu CPE pri analýze rôznych kovov za posledných desať rokov.

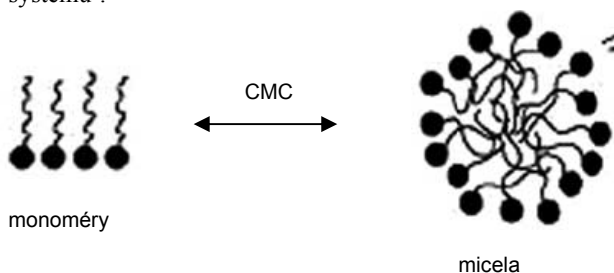


Obr. 1. Počty publikácií venované využitiu CPE v rôznych oblastiach analytickej chémie (celkové počty – sivé stĺpce) a počty publikácií venované využitiu CPE pri analýze kovov (biele stĺpce)

2.1. Princíp CPE

Povrchovo aktívne činidlá (tenzidy) sú amfifilické molekuly skladajúce sa z hydrofílnych a hydrofóbnych častí, čo bývajú vo väčšine prípadov polárne alebo iónové skupiny spojené s dlhými uhlíkovými reťazcami (ktoré môžu byť lineárne alebo rozvetvené, ale môžu obsahovať aj aromatické kruhy). Vo vodných roztokoch, v ktorých sa nachádzajú veľmi nízke koncentrácie tenzidu, sa molekuly tenzidu vyskytujú predovšetkým vo forme monomérov (avšak môžu byť prítomné aj vo forme dimérov alebo trimérov). Keď ich koncentrácia vzrastie nad určitú hranicu, ktorá sa nazýva „kritická micelárna koncentrácia“ („critical micellar concentration“ – CMC), monoméry tenzidu sa spontánne zhromaždia a vytvoria koloidný klastor, nazývaný micela (obr. 2). V závislosti od vlastností použitého tenzidu a analyzovaného roztoku môžu mať micely rôzne veľkosti a tvary (od guľovitých až po elipsoidné).

Po pridaní tenzidu k vodnému roztoku (koncentrácia tenzidu musí byť vyššia ako CMC, aby dochádzalo k vzniku micel) a následnom zahriatí nad určitú teplotu (ktorá je charakteristická pre každé tenzid – „cloud point temperature“ – CPT), sa takýto roztok stáva zakaleným v dôsledku preskupenia micelotvorných zložiek a vzniku ďalšej fázy. Takto sa získajú dve fázy; jedna obohatená tenzidom („surfactant rich phase“ – SRP), ktorá obsahuje hydrofóbne a nepolárne zlúčeniny zachytené v nepolárnych jadrách micel, a druhá – vodná fáza s koncentráciou tenzidu blízko CMC. Štúdie venované objasneniu mechanizmu tejto separácie poukazujú na to, že takáto fázová separácia je výsledkom súťaženia medzi entropiou (ktorá uprednostňuje miešateľnosť micel vo vode) a entalpiou (ktorá uprednostňuje separáciu)³, takže vytvorenie zázaku a fázová separácia je dej reverzibilný a po nastolení pôvodných podmienok dochádza k opätovnému vzniku homogénneho systému⁴.



Obr. 2. Schématické znázornenie vzniku micely z monomérov pri koncentrácii prekračujúcej kritickú micelárnu koncentráciu (CMC); čierne guľôčky predstavujú polárne skupiny naviazané na nepolárne uhlíkové reťazce

2.2. Postup CPE na separáciu, prekoncentráciu a špeciáciu kovov

Pri separácii, prekoncentracii a špeciácii kovov s využitím CPE je jedným z prvých krokov vytvorenie

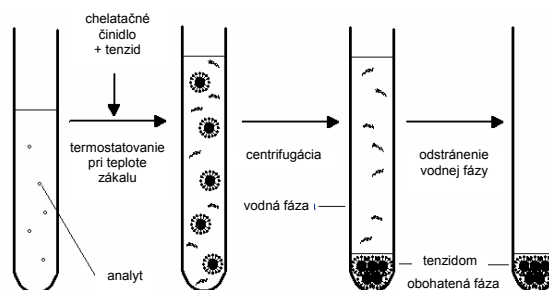
vhodného hydrofóbného komplexu analytu, ktorý môže byť následne zachytený v hydrofóbnom jadre micely. S tým súvisí výber vhodného chelatačného alebo komplexotvorného činidla (okrem prípadov, pri ktorých nie je potrebné použitie týchto činidiel). Po pridaní zvoleného chelatačného činidla sa ku kvapalnej vzorke pridá vhodný tenzid. Po dôkladnom premiešaní sa roztok zahreje nad CPT. Po určitom inkubačnom čase nasleduje separácia fáz (najčastejšie urýchlená centrifugáciou). Hydrofóbne a nepolárne zlúčeniny zachytené v nepolárnych jadrách micel sa nachádzajú v tenzidom obohatenej fáze (SRP), objem ktorej sa najčastejšie pohybuje v stovkách mikrolitrov, čím dochádza k nakoncentrovaniu analytu. Pre dokonaljšiu separáciu SRP od vodnej fázy je výhodné zvýšiť viskozitu SRP. Na zvýšenie viskozity SRP sa najčastejšie využíva ľadový kúpeľ. Po ochladení SRP nasleduje odstránenie vodnej fázy a následné zriedenie SRP pridaním činidla, ktoré je vhodné pre zvolený detektor. Schématické znázornenie postupu pre CPE je uvedené na obr. 3.

Aby došlo ku kvantitatívnej separácii a boli dosiahnuté vysoké prekoncentračné faktory pre nasledujúce stanovenie, je nutné zvoliť pre vypracovávaný postup vhodné chelatačné činidlo a tenzid, a následne optimalizovať všetky experimentálne parametre (koncentráciu chelatačného činidla a tenzidu, pH roztoku, prídavky pomocných činidiel, teplotu a čas inkubácie, separáciu fáz, výber činidla na riedenie SRP), ktoré sú podrobnejšie rozdiskutované v nasledujúcich odsekoch.

2.3. Optimalizácia experimentálnych podmienok pre CPE kovov

2.3.1. Výber chelatačného činidla

Výber vhodného chelatačného činidla, ktoré vytvorí hydrofóbný komplex s iónovým analytom, je jedným z hlavných faktorov, ktorý ovplyvňuje účinnosť separácie kovových iónov. K najčastejšie využívaným činidlám patria karbamáty (napr. amónium pyrolidín ditiokarbamát; APDC), pyridylazo deriváty (napr. 1-(2-pyridylazo)-2-naftol; PAN) a chinolinové deriváty (8-hydroxychinolín; 8-HQ). Tieto zlúčeniny možno považovať za univerzálne činidlá, ktoré vytvárajú hydrofóbné zlúčeniny s väčšinou kovových iónov a využívajú sa v tých prípadoch, keď sa na detekciu



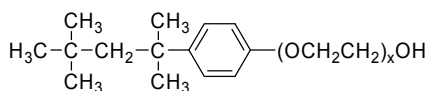
Obr. 3. Schématické znázornenie postupu pri CPE kovov

stanovovaného analytu použije vysoko selektívny detektor. Iné činidlá, ako napr. *O,O*-dietylditiofosfát (DDTP), sú využívané pri selektívnejších extrakciách.

Výber činidla súvisí s požiadavkou vzniku dostatočne hydrofóbného komplexu, ktorý má vysoký rozdeľovací koeficient, vzniká rýchlo a kvantitatívne. V tomto prípade termodynamické parametre (konštanta vzniku komplexu; K_f) spolu s kinetickými parametrami vzniku komplexu a presunu do micelárnej fázy ovplyvňujú celý postup, zatiaľ čo parametre ovplyvňujúce vznik miciel sú menej dôležité⁵.

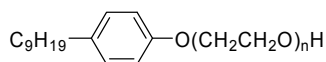
2.3.2. Výber a koncentrácia tenzidu

Vo väčšine publikovaných prác sa ako tenzidy pri analýze kovov využívajú prevažne poly(oxyetylén)ové alkylfenoly (zo sérií Triton X- a PONPE; viď vzorce 1 a 2 v obr. 4). Sú komerčne dostupné s vysokou čistotou, stabilné, neprchavé a netoxické^{6–8}. Základné charakteristiky najčastejšie používaných neiónových tenzidov pre CPE kovov sú uvedené v tabuľke I. Na veľkosť prekoncentračného faktora a extrakčný výťažok CPE pri použití neiónových tenzidov má vplyv: dĺžka alkylového reťazca neiónového tenzidu; prítomnosť aromatickej skupiny; počet oxyetylénových jednotiek; ako aj koncentrácia tenzidu. Z uvedeného je zrejme, že vhodný výber tenzidu je ďalšou dôležitou časťou pri navrhovaní spoľahlivého postupu CPE. Vhodná koncentrácia tenzidu sa zisťuje experimentálne tak, že sa zostrojí závislosť extrakčný výťažok vs. zvyšujúca sa koncentrácia tenzidu. V tomto prípade extrakčný výťažok so zvyšovaním koncentrácie narastá až do určitej „hraničnej“ koncentrácie, pri ktorej sa zaznamená maximálny extrakčný výťažok. Ďalšie zvyšovanie koncentrácie tenzidu vedie k zvyšovaniu objemu SRP, čo ovplyvní extrakčný výťažok aj prekoncentračný faktor (dochádza k ich zníženiu). Vyberá sa teda „hraničná“ koncentrácia, pri ktorej sa získava maximálny extrakčný výťažok (z dôvodu získania čo možno najväčšieho pomeru medzi objemom vodnej fázy a objemom SRP, čo vedie k získaniu maximálneho prekoncentračného faktora).



1

Oktylfenoxy poly(oxyetylén) éter; Triton X-114 ($x = 7-8$); Triton X-100 ($x = 9-10$)



2

Poly(oxyetylén) nonyl fenyl éter; PONPE-5.0 ($n = 5$); PONPE-7.5 ($n = 7,5$)

Obr. 4. Štruktúrne vzorce vybraných tenzidov

Tabuľka I

Základné charakteristiky najčastejšie používaných neiónových tenzidov pri CPE kovov

Tenzid	Teplota zákalu [°C]	CMC [mmol l ⁻¹]	Lit.
Triton X-114	23–25	0,20–0,35	6
Triton X-100	64–65	0,17–0,30	6
PONPE-5.0	15–17	0,57	9,10,11
PONPE-7.5	5–20 ^a	0,085	6

^a V závislosti od použitej koncentrácie

2.3.3. Vplyv pH

V prípade kovových chelátov, optimálne hodnoty pH súvisia s optimálnymi hodnotami pH, pri ktorých vznikajú stabilné neiónové komplexy. Rovnako veľmi dôležitú úlohu zohráva pH pri zlepšení extrakčnej účinnosti v prípadoch, pri ktorých sa nepoužívajú prídavky chelatačných činidiel, pretože v tomto prípade pH ovplyvňuje celkový náboj analytu, čo následne ovplyvňuje vznik komplexu medzi kovom a poly(oxyetylén)ovými skupinami použitého tenzidu.

Osobitnú pozornosť je potrebné venovať výberu vhodného pH v prípadoch, kedy je navrhovaný CPE postup používaný na špeciáciu kovov, pričom je dôležité, aby pri zvolenom pH iba jedna iónová forma sledovaného analytu spoľahlivo vytvorila neiónový komplex, zatiaľ čo iná iónová forma sledovaného analytu pri danom zvolenom pH neiónový komplex tvoriť nesmie. Ako príklady možno uviesť špeciálne štúdie venované rozlíšeniu anorganických foriem Cr(III)/Cr(VI), As(III)/As(V), Sb(III)/Sb(V) alebo Se(IV)/Se(VI) (cit.^{12–14}).

2.3.4. Prídavky pomocných činidiel

V mnohých prípadoch sa na dosiahnutie účinnej extrakcie využívajú prídavky rôznych organických činidiel alebo anorganických solí. Prídavok etanolu (v prípadoch využívania tenzidov, ktoré sa vyznačujú nízkou CPT) má za následok zvýšenie teploty potrebnej na vytvorenie zákalu, čo vedie k zvýšeniu prekoncentračných faktorov a zlepšeniu kinetiky fázovej separácie¹⁵. Prítomnosť anorganických elektrolytov naopak znižuje teplotu potrebnú na dosiahnutie zákalu a vytvorenie dvoch fáz v dôsledku dehydratácie poly(oxyetylén)ového reťazca¹⁶. Anorganické soli takisto zvyšujú hydrofóbné interakcie medzi analytom a molekulovými agregátmi tenzidu, čo vedie k uprednostneniu jeho extrakcie z vodnej fázy do micelárnej fázy.

2.3.5. Inkubačná teplota a čas

Pre dosiahnutie maximálneho prekoncentračného faktora je potrebné uskutočňovať CPE pri teplotách nad CPT (cit.^{9,15}). Zvýšenie inkubačnej teploty môže znamenať zníženie objemu SRP, a teda zvýšenie prekoncentračného faktora. Zhruba päťnásobné zníženie objemu SRP bolo

Tabuľka II
Spojenie CPE a FAAS

Analyt	Komplexotvorné čínidlo	Tenzid	Čínidlo na riedenie SRP	LOD ^a [$\mu\text{g l}^{-1}$]	PF ^b	Lit.
Cd(II)	DDTP	TX-114	0,1 M HNO ₃ v C ₂ H ₅ OH	0,90	NZ	32
Sb(III)	BPHA	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	1,82	45	33
Cd(II)	APDC	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	NZ	NZ	34
Pb(II)	APDC	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	NZ	NZ	34
Cu(II)	APDC	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	NZ	NZ	34
Cr(III)	APDC	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	NZ	NZ	34
Zn(II)	APDC	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	NZ	NZ	34
Fe(III)	APDC	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	NZ	NZ	34
Cd(II)	PMBP	TX-100	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,64	23	35
Cd(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,15	15	36
Cu(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,72	21	36
Zn(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,03	66	36
Cd(II)	žiadne	TX-114	NZ	1,00	NZ	37
Mn(II)	TAR	TX-114	0,15 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,60	84	38
Cu(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,025	305	39
Mn(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,033	215	39
Ni(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,035	205	39
Cd(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,016	241	39
Fe(III)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,105	54	39
Co(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,005	130	39
Zn(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,004	167	39
Cr(III)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,075	198	39
Pb(II)	8-HQ	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,167	64	39
Cu(II)	Me-BTABr	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	1,08	17	40
Mn(II)	PAN	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,39	49	41
Ag(I)	BMAA	TX-114	NZ	0,43	50	42
Cu(II)	H(2)mdo	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,14	65	43
Ni(II)	H(2)mdo	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,20	59	43
Mn(II)	PMBP	TX-100	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	1,45	20	44
Cu(II)	Me-BDBD	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	1,50	14	45
Co(II)	Me-BTABr	TX-114	1M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,90	28	46
Ni(II)	Me-BTABr	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	1,10	23	46
Pb(II)	PMBP	TX-114	konc. CH ₃ OH	1,49	110	47
Ag(I)	MBT	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	2,20	46	48
Pb(II)	BCB	TX-114	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	7,50	25	49
Rh(II)	2-PPC	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,052	50	50
Cd(II)	TAC	TX-114	NZ	0,077	NZ	51
Pb(II)	TAC	TX-114	NZ	1,05	NZ	51
Cu(II)	NDTT	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,22	22	52
Cu(II)	Cupron	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,04	88	53

^a Medza dôkazu; ^b prekoncentračný faktor; NZ: nezistené; DDTP: amónna soľ kyseliny *O,O*-dietylditiofosforečnej; BPHA: *N*-benzoyl-*N*-fenyhydroxylamín; APDC: amónium pyrolidín ditiokarbamat; PMBP: 1-fenyl-3-metyl-4-benzoyl-5-pyrazolón; 8-HQ: 8-hydroxychinolín; TAR: 2-(2'-tiazolylo)-rezorcínol; Me-BTABr: 2-[2'-6-metyl-benzotiazolylo]-4-brómfénol; PAN: 1-(2-pyridylazo)-2-naftol; BMAA: bis(2-merkaptanil)acetylacetón; H(2)mdo: 3-[(8-{{(E)-2-hydroxyimino-1-metylpropylidén}amino}-1-naftyl)imino]-2-butanón oxim; Me-BDBD: kyselina 6-[2'-(6'-metyl-benzotiazolylo)]-1,2-dihydroxy-3,5-benzéndisulfónová; MBT: 2-merkaptobenzotiazol; BCB: brilant-krezolová modrá; 2-PPC: 2-propylpiperidín-1-karbo-ditionát; TAC: 2-(2-tiazolylo)-*p*-krezol; NDTT: 6-(2-naftyl)-2,3-dihydro-triazín-3-tión; Cupron: 1,5-difenyl-benzoin

zaznamenané pri zvýšení inkubačnej teploty z 25 °C na 90 °C (cit.¹⁷). Avšak v prípade termálne nestabilných kovových chelátov sa zvyšovanie teploty neodporúča, pretože v takýchto prípadoch dochádza k znižovaniu extrakčného výťažku v dôsledku rozkladu nestabilného chelátu. Inkubačný čas sa najčastejšie pohybuje medzi 4–15 minútami a teploty medzi 30–70 °C (v závislosti od použitého tenzidu).

2.3.6. Separácia fáz

Existuje niekoľko navrhnutých alternatív na odseparovanie SRP od vodnej fázy. Po centrifugácii, ktorá urýchľuje fázovú separáciu a zvyčajne trvá 5–10 minút, sa zmes ochladí v ľadovom kúpeli (najčastejšie pri teplotách okolo 0 °C). SRP sa stáva vysoko viskóznou a odstránenie vodnej fázy je možné jednoducho dekantáciou¹⁸. Okrem uvedeného postupu je možné na ochladenie SRP využiť zmes ľadu a NaCl a následne odstrániť vodnú fázu odsátím za pomoci peristaltickej pumpy^{10,11}. Rovnako možno využiť zmes ľadu a acetónu a vodnú fázu odstrániť pomocou striekačky¹⁹. Pre zvýšenie prekoncentračného faktora je možné po odstránení vodnej fázy ešte SRP zahriať vo vodnom kúpeli pri 100 °C (cit.²⁰) alebo v sušiarňi pri teplote 100–120 °C (cit.⁵), čím sa odstránia aj posledné zvyšky vody.

2.3.7. Výber činidla na riedenie SRP

Po odstránení vodnej fázy sa získava značne viskóznou SRP. Pre zníženie viskozity SRP a možnosť bezproblémového nadávkovania vzorky do použitého prístroja, je ďalším dôležitým krokom výber vhodného činidla na riedenie SRP. Tento výber závisí od použitého tenzidu, od použitej detekcie a stanovovaného analytu²¹. V prípade AAS detekcie sú najčastejšie používanými činidlami metanolické alebo etanolické roztoky minerálnych kyselín (najčastejšie HNO₃), v prípade použitia ICP-AES detekcie sa najčastejšie SRP riedi priamo koncentrovanými minerálnymi kyselinami²².

2.4. Spojenie CPE s metódami atómovej spektrometrie

Väčšina publikovaných prác, v ktorých je využitá CPE pri analýze kovov, je spojená s metódami atómovej spektrometrie, z nich predovšetkým s plameňovou atómovou absorpčnou spektrometriou (FAAS), elektrotermickou atómovou absorpčnou spektrometriou (ETAAS) a atómovou emisnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou (ICP-AES). Je to predovšetkým vďaka vysokej selektivitě týchto detektorov, ktoré sú schopné spoľahlivo stanoviť sledovaný analyt aj v prípadoch menej účinných separácií. Počet prác venovaných spojeniu CPE s už spomínanými metódami atómovej spektrometrie má narastajúcu tendenciu^{22,23}, pričom okrem prác venovaných separácii a prekoncentracii rôznych kovov, začína narastať aj počet prác venovaných špeciácii predovšetkým toxických a esenciálnych prvkov.

2.4.1. Spojenie CPE a FAAS

Prídavok zriedovacieho činidla k SRP je v každom prípade nevyhnutnosťou pre získanie homogénneho roztoku s nízkou viskozitou, ktorý je kompatibilný s používanými zhmlovačmi v FAAS. Vplyv metanolu na signál pri použití plameňovej atomizácie bol v minulosti predmetom niekoľkých štúdií^{24–26}. Pri použití organických činidiel v FAAS bolo potvrdené zvýšenie citlivosti minimálne dvojnásobne. Tento úkaz je pripisovaný nízkemu povrchovému napätiu organických činidiel (napr. menej ako 25 dyn cm⁻² pre metanol, zatiaľ čo pre vodu je to 72 dyn cm⁻²), čo značne ovplyvňuje zhmlovací proces²⁷. Vplyvu tenzidov na signál pri použití plameňovej atomizácie bolo venovaných taktiež niekoľko štúdií^{28–30}. Väčšina z nich opisuje zreteľné zlepšenie citlivosti v FAAS (a teda odporúčajú ich použitie), avšak v niektorých prípadoch bolo zaznamenané iba nepatrné alebo žiadne zlepšenie³¹. V súčasnosti je však potvrdené, že pri analýze roztokov obsahujúcich tenzidy vznikajú v zhmlovačoch jemnejšie kvapôčky aerosolu, čo môže priaznivo ovplyvniť ich transportnú účinnosť do plameňa, ako aj účinnosť pri atomizácii vzorky²³.

Prehľad prác publikovaných za posledné tri roky, ktoré sú venované spojeniu CPE a FAAS, je uvedený v tabuľke II.

2.4.2. Spojenie CPE a ETAAS

Výhodou ETAAS detekcie je to, že organické činidlá ako aj tenzidy sú plne kompatibilné s ETAAS. Zatiaľ čo kontaktný uhol medzi molekulami vody a povrchovým uhlíkom grafitovej kvety je 85,7°, uhol medzi molekulami organických činidiel a povrchovým uhlíkom grafitovej kvety sa pohybuje medzi 0–10°, takže zatiaľ čo systém voda/grafit prejavuje znaky nestability, systém organické činidlo/grafit je celkom kompatibilný. Okrem organických činidiel aj prítomnosť tenzidov v analyzovaných roztokoch môže viesť k zmenšeniu kontaktného uhla, čo taktiež ponúka možné riešenie daného problému²³. Z uvedeného je zrejmé, že prítomnosť tenzidu vo vodnom roztoku môže napomôcť pri rovnomernom dávkovaní vzorky na grafitový povrch. Uvedené zistenia viedli k používaniu tenzidov (predovšetkým zo série Triton X-) práve na zvýšenie zručnosti grafitového povrchu v ETAAS. Z opísaných zistení je zrejmé, že pri využití ETAAS detekcie po CPE separácii, prekoncentracii alebo špeciácii kovov nie sú očakávané žiadne vážnejšie problémy. Avšak aj v tomto prípade spojenia CPE a ETAAS je pre každý analyt potrebné optimalizovať teplotný program a zvoliť vhodný chemický modifikátor.

Prehľad prác publikovaných za posledné tri roky, ktoré sú venované spojeniu CPE a ETAAS je uvedený v tabuľke III.

2.4.3. Spojenie CPE a ICP-AES

Pri analýze roztokov pripravených v organických činidlách dochádza pri využití ICP-AES detekcie k zmenám základných vlastností plazmy (teplota plazmy, stupeň ionizácie), k zmene stability plazmy, k zmene rozmerov

Tabuľka III
Spojenie CPE a ETAAS

Analyt	Komplexotvorné činidlo	Tenzid	Činidlo na riedenie SRP	LOD ^a [$\mu\text{g l}^{-1}$]	PF ^b	Lit.
Pb(II)	Br-PADAP	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,080	50	54
Cd(II)	DDTP	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,006	129	55
Pb(II)	DDTP	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,040	18	55
Fe(III)	HMQ	TX-100	0,1 M HCl	NZ	102	56
V(V)	HO ₆ Q	TX-100	0,1 M HCl	NZ	58	56
Bi(III)	ditizón	TX-114	tetrahydrofurán	0,020	196	57
As(V)	molybdénan/H ₂ SO ₄	TX-114	konc. CH ₃ OH	0,010	53	58
As(III)	APDC	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,040	36	59
Sn(IV)	8-HQ	TX-114	0,15 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,012	96	60
Cr(VI)	Br-PF	TX-100	1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,010	50	61
Mn(II)	PMBP	TX-100	0,1 M HNO ₃	0,020	31	62
Fe(III)	PMBP	TX-100	0,1 M HNO ₃	0,080	25	62
Ni(II)	PMBP	TX-100	NZ	0,120	27	63
Cd(II)	PAN	TX-100	2 M HCl	0,006	50	64
Sn(IV)	PAN	TX-100	NZ	0,510	NA	65
Pb(II)	DDTP	TX-114	konc. CH ₃ OH	0,016	22	66
Cu(II)	PAN	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,005	NZ	67
Ag(I)	DDTP	TX-114	NZ	0,008	35	68
Mn(II)	PMBP	TX-114	NZ	0,020	31	69
Au(I)	žiadny	PONPE 7.5	6 M HCl	0,002	200	70
Ag(I)	žiadny	PONPE 7.5	6 M HCl	0,001	60	71
Ag(I)	APDC	TX-114	0,2 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,003	196	72
Co(II)	APDC	TX-114	0,2 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,008	210	72
Cr(III)	APDC	TX-114	0,2 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,003	200	72
Cu(II)	APDC	TX-114	0,2 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,006	209	72
Fe(II)	APDC	TX-114	0,2 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,015	205	72
Mn(II)	APDC	TX-114	0,2 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,002	197	72
Ni(II)	APDC	TX-114	0,2 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,009	186	72
Pb(II)	APDC	TX-114	0,2 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,010	197	72
Cd(II)	Br-PADAP	TX-114	NZ	0,040	21	73
Pb(II)	DDTP	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,040	16	74
Cd(II)	DDTP	TX-114	0,1 M HNO ₃ v CH ₃ OH	0,002	16	74

^a Medza dôkazu; ^b prekoncentračný faktor; NZ: nezistené; Br-PADAP: 2-(5-brómo-2-pyridylazo)-5-dietylaminofenol; DDTP: amónna sol kyseliny *O,O*-dietylditiofosforečnej; HMQ: 2-metyl-8-chinolinol; HO₆Q: 5-hexyloxymetyl-8-chinolinol; APDC: amónium pyrolidín ditiokarbamát; 8-HQ: 8-hydroxychinolín; Br-PF: dibromofenylylurón; PMBP: 1-fenyl-3-metyl-4-benzoyl-5-pyrazolón; PAN: 1-(2-pyridylazo)-2-naftol

a tvaru plazmy^{75–77}, k zmene rýchlosti prietoku aerosolu^{78,79}. Vo väčšine prípadov sú to zmeny nepriaznivé^{80,81}. Práve z uvedených dôvodov sú na riedenie tenzidom obohatenej fázy v prípade ICP-AES detekcie používané priamo koncentrované minerálne kyseliny bez prídania akéhokoľvek organického činidla. V prípadoch analýzy roztokov obsahujúcich tenzidy boli opísané iba minimálne alebo žiadne efekty ovplyvňujúce transport vzorky a analytickú citlivosť pri použití ICP-AES detekcie^{28,82}.

Prehľad prác publikovaných za posledné tri roky, ktoré sú venované spojeniu CPE a ICP-AES, je uvedený v tabuľke IV.

2.5. Zhrnutie

Najčastejšie využívaným tenzidom pri CPE kovov je Triton X-114, vďaka svojim optimálnym fyzikálno-chemickým vlastnostiam (nízka teplota potrebná na vytvorenie zákalu: 23–25 °C, čo je zvlášť dôležité pri extrakcii

Tabuľka IV
Spojenie CPE a ICP-AES

Analyt	Komplexotvorné činidlo	Tenzid	Činidlo na riedenie SRP	LOD ^a [$\mu\text{g l}^{-1}$]	PF ^b	Lit.
Cr(III)	PMBP	TX-114	NZ	0,81	20	83
Gd(III)	8-HQ	TX-114	0,01 M HNO ₃	NZ	38	84
Cd(II)	Br-PADAP	TX-114	7 M HNO ₃	0,081	22	85
Cr(III)	Br-PADAP	TX-114	7 M HNO ₃	0,79	36	85
Cu(II)	Br-PADAP	TX-114	7 M HNO ₃	0,38	46	85
Mn(II)	Br-PADAP	TX-114	7 M HNO ₃	0,83	25	85
Ni(II)	Br-PADAP	TX-114	7 M HNO ₃	0,28	65	85
Pb(II)	Br-PADAP	TX-114	7 M HNO ₃	0,69	39	85
Sb(III)	APDC	TX-114	NZ	0,09	872	86
Cr(III)	TTA	TX-114	NZ	0,22	NZ	87
Zr(IV)	chinalizarín	TX-114	1 M HNO ₃ v C ₃ H ₇ OH	0,26	39	88
Hf(IV)	chinalizarín	TX-114	1 M HNO ₃ v C ₃ H ₇ OH	0,31	36	88
Ce(IV)	n-TBHA	TX-114	1 M HNO ₃	0,40	14	89
Cd(II)	ditizón	TX-114	7 M HNO ₃	0,093	21	90
Co(II)	ditizón	TX-114	7 M HNO ₃	0,20	21	90
Cr(III)	ditizón	TX-114	7 M HNO ₃	1,20	19	90
Mn(II)	ditizón	TX-114	7 M HNO ₃	0,73	9	90
Hg(II)	jodid/metyl zeleň	TX-114	0,5 M HNO ₃	0,056	19	91
MeHg(I)	APDC	TX-114	0,5 M HNO ₃	0,095	10	91

^a Medza dôkazu; ^b prekoncentračný faktor; NZ: nezistené; PMBP: 1-fenyl-3-metyl-4-benzoyl-5-ón; 8-HQ: 8-hydroxychinolín; Br-PADAP: 2-(5-brómo-2-pyridylazo)-5-dietylaminofenol; APDC: amónium pyrolidín ditiokarbamát; TTA: tenoyltrifluóracetón; n-TBHA: kyselina *n-p*-tolylbenzohydroxámová

termálne nestabilných kovových chelátov; vysoká hustota: 1,052 g ml⁻¹, čo uľahčuje fázovú separáciu). K jeho výhodám patrí tiež to, že je komerčne dostupný s vysokou čistotou (za relatívne nízku cenu), je stabilný, neprchavý a netoxický. Zo spomínaných metód atómovej spektrometrie je CPE separácia a prekoncentrácia využívaná najmä s FAAS detekciou. Uvedené spojenie vedie k značnému zníženiu medzí stanovenia, ponúka možnosť rýchlejšej a relatívne najlacnejšej analýzy.

3. Záver

Klasickou metódou na separáciu a prekoncentráciu kovov z kvapalných vzoriek bola v minulosti predovšetkým extrakcia v systéme kvapalina – kvapalina („liquid-liquid extraction“ – LLE). Táto technika je však pracná, časovo náročná, ťažko automatizovateľná, využíva značné objemy vysoko čistých a drahých činidiel (v mnohých prípadoch toxických a karcinogénnych) a potýka sa s praktickými problémami, ako je napr. tvorba emulzií. Toto všetko viedlo k snahám navrhnúť a vypracovať menej pracné postupy, pri ktorých by zdravie škodlivé činidlá boli nahradené činidlami, ktoré zdravie neohrozujú a nemajú negatívny vplyv na životné prostredie. Práve

technika CPE umožnila nahradiť techniku LLE v plnej miere, pričom ponúka tieto výhody: použitie stabilných, neprchavých a netoxických činidiel, minimalizáciu použitých činidiel, minimalizáciu času potrebného na extrakciu, možnosť nakoncentrovať širokú škálu analytov z rôznych typov matric, možnosť nakoncentrovať rôzne špecie sledovaného analytu, dosiahnuť značné prekoncentračné faktory, cenovú nenáročnosť a dostupnosť. Čo sa týka on-line spojenia CPE s metódami atómovej spektrometrie, toto spojenie nie je jednoduchou záležitosťou, no aj napriek tomu je vyriešenie technických problémov v takomto spojení možné a v literatúre možno nájsť publikácie, ktoré opisujú on-line spojenie CPE s metódou ICP-AES.

Táto práca vznikla v rámci riešenia projektu finančne podporovaného grantom Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied – VEGA – č. 1/4464/07.

LITERATÚRA

- Goto K., Taguchi S., Fukue Y., Ohta K., Watanabe H.: *Talanta* 24, 752 (1977).
- Watanabe H., Tanaka H.: *Talanta* 25, 585 (1978).

3. Liu C. L., Nikas Y. J., Blankschtein D.: *Biotechnol. Bioeng.* 52, 185 (1996).
4. Rosen M. J. (ed.): *Surfactants and interfacial phenomena*. Wiley-Interscience, New York 1978.
5. Paleologos E. K., Giokas D. L., Karayannis M. I.: *Trends Anal. Chem.* 24, 426 (2005).
6. Quina F. H., Hinze W. L.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 4150 (1999).
7. McIntire G. L.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 21, 257 (1990).
8. Pramauro E., Pelezetti E. (ed.): *Surfactants in Analytical Chemistry. Applications of Organized Amphiphilic Media*. Wilson & Wilson's, Elsevier, Amsterdam 1996.
9. Hinze W. L., Pramauro E.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24, 133 (1993).
10. Wuilloud G. M., de Wuilloud J. C. A., Wuilloud R. G., Silva M. F., Olsina R. A., Martinez L. D.: *Talanta* 58, 619 (2002).
11. de Wuilloud J. C. A., Wuilloud R. G., Silva M. F., Olsina R. A., Martinez L. D.: *Spectrochim. Acta, Part B* 57, 365 (2002).
12. Kiran K., Kumar K. S., Prasad B., Suvardhan K., Babu L. R., Janardhanam K.: *J. Hazard. Mater.* 150, 852 (2008).
13. Li Y., Hu B., He M., Xiang G.: *Water Res.* 42, 1195 (2008).
14. Chen B. B., Hu B., He M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2894 (2006).
15. Silva M. F., Fernandez L., Olsina R. A., Stacchiola D.: *Anal. Chim. Acta* 342, 229 (1997).
16. Armstrong J. K., Chowdhry B. Z., Snowden M. J., Leharne S. A.: *Langmuir* 14, 2004 (1998).
17. Luconi M. O., Silva M. F., Olsina R., Fernandez L. P.: *Talanta* 51, 123 (2000).
18. Hinze W. L., Armstrong D. W. (ed.): *Ordered Media in Chemical Separations*. American Chemical Society, Washington DC 1987.
19. Manzoori J. L., Bavili-Tabrizi A.: *Anal. Chim. Acta* 470, 215 (2002).
20. Manzoori J. L., Karim-Nezhad G.: *Anal. Sci.* 19, 579 (2003).
21. Giokas D. L., Paleologos E. K., Tzouwara-Karayanni S. M., Karayannis M. I.: *J. Anal. At. Spectrom.* 16, 521 (2001).
22. Silva M. F., Cerutti E. S., Martinez L. D.: *Microchim. Acta* 155, 349 (2006).
23. Stalikas C. D.: *Trends Anal. Chem.* 21, 343 (2002).
24. Dean J. A., Carnes W. J.: *Anal. Chem.* 34, 192 (1962).
25. Kodama M., Miyagawa S.: *Anal. Chem.* 52, 2358 (1980).
26. Stupar J., Dawson J. B.: *Appl. Opt.* 7, 1351 (1968).
27. Kornahrens H., Cook K. D., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 54, 1325 (1982).
28. Farino J., Browner R. F.: *Anal. Chem.* 56, 2709 (1984).
29. Yan Z. Y., Zang W.: *J. Anal. At. Spectrom.* 4, 797 (1989).
30. Ruiz A. I., Canals A., Hernandis V.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 109 (1993).
31. Kodama M., Shimizu S., Sato M., Tominaga T.: *Anal. Lett.* 10, 591 (1977).
32. Coelho L. M., Arruda M. A. Z.: *Spectrochim. Acta, Part B* 60, 743 (2005).
33. Fan Z. F.: *Microchim. Acta* 152, 29 (2005).
34. Giokas D. L., Paleologos E. K., Karayannis M. I.: *Anal. Chim. Acta* 537, 249 (2005).
35. Liang P., Li J., Yang X.: *Microchim. Acta* 152, 47 (2005).
36. Shemirani F., Abkenar S. D., Jamali M. R.: *Indian J. Chem., Sect A* 44, 1211 (2005).
37. Afkhami A., Madrakian T., Siampour H.: *J. Hazard. Mater.* 138, 269 (2006).
38. Bezerra M. D., Conceicao A. L. B., Ferreira S. L. C.: *Microchim. Acta* 154, 149 (2006).
39. Farajzadeh M. A., Fallahi M. R.: *Anal. Sci.* 22, 635 (2006).
40. Lemos V. A., Santos J. S., Baliza P. X.: *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 30 (2006).
41. Rod A. R., Borhani S., Shemirani F.: *Eur. Food Res. Technol.* 223, 649 (2006).
42. Shemirani F., Jamali M. R., Kozani R. R., Salavati-Niasari M.: *J. Anal. Chem.* 61, 124 (2006).
43. Shemirani F., Jamali M. R., Kozani R. R., Salavati-Niasari M.: *Sep. Sci. Technol.* 41, 3065 (2006).
44. Sun Z. M., Liang P., Ding Q., Cao J.: *Anal. Sci.* 22, 911 (2006).
45. Lemos V. A., Santos M. S., dos Santos M. J. S., Vieira D. R., Novaes C. G.: *Microchim. Acta* 157, 215 (2007).
46. Lemos V. A., da Franca R. S., Moreira B. O.: *Sep. Purif. Technol.* 54, 349 (2007).
47. Manzoori J. L., Abdolmohammad-Zadeh H.: *Acta Chim. Slovenica* 54, 378 (2007).
48. Shemirani F., Kozani R. R., Assadi Y.: *Microchim. Acta* 157, 81 (2007).
49. Surme Y., Narin I., Soylak M., Yuruk H., Dogan M.: *Microchim. Acta* 157, 193 (2007).
50. Suvardhan K., Kumar K. S., Rekha D., Subrahmanyam P., Kiran K., Jayaraj B., Ramanaiah S., Janardhanam K., Chiranjeevi P.: *Microchim. Acta* 157, 237 (2007).
51. Portugal L. A., Ferreira H. S., dos Santos W. N. L., Ferreira S. L. C.: *Microchem. J.* 87, 77 (2007).
52. Biparva P., Hadjmohammadi M. R.: *Acta Chim. Slovenica* 54, 805 (2007).
53. Goudarzi N.: *J. Brazil. Chem. Soc.* 18, 1348 (2007).
54. Chen J. R., Xiao S. M., Wu X. H., Fang K. M., Liu W. H.: *Talanta* 67, 992 (2005).
55. Maranhao T. D., Borges D. L. G., da Veiga M. A. M. S., Curtius A. J.: *Spectrochim. Acta, Part B* 60, 667 (2005).
56. Ohashi A., Ito H., Kanai C., Imura H., Olashi K.: *Talanta* 65, 525 (2005).
57. Shemirani F., Baghdadi M., Ramezani M., Jamali M. R.: *Anal. Chim. Acta* 534, 163 (2005).

58. Shemirani F., Baghdadi M., Ramezani M.: *Talanta* 65, 882 (2005).
59. Tang A. N., Ding G. S., Yan X. P.: *Talanta* 67, 942 (2005).
60. Yuan C. G., Jiang G. B., He B., Liu J. F.: *Microchim. Acta* 150, 329 (2005).
61. Zhu X. S., Hu B., Jiang Z. C., Li M. F.: *Water Res.* 39, 589 (2005).
62. Liang P., Sang H. B., Sun Z. M.: *J. Colloid Interface Sci.* 304, 486 (2006).
63. Sun Z. M., Liang P., Ding Q., Cao J.: *J. Hazard. Mater.* 137, 943 (2006).
64. Zhu X. S., Zhu X. H., Wang B. S.: *Microchim. Acta* 154, 95 (2006).
65. Zhu X. H., Zhu X. S., Wang B. S.: *J. Anal. At. Spectrom.* 21, 192 (2006).
66. Bai F., Fan Z. F.: *Microchim. Acta* 159, 235 (2007).
67. Chen J. G., Chen H. W., Chen S. H., Lin L., Zhong Y. Y.: *Chem. Res. Chin. Univ.* 23, 143 (2007).
68. Fan Z. F., Bai F.: *At. Spectrosc.* 28, 30 (2007).
69. Liang P., Sun Z. M., Cao J.: *At. Spectrosc.* 28, 62 (2007).
70. Manzoori J. L., Abdolmohammad-Zadeh H., Amjadi M.: *Microchim. Acta* 159, 71 (2007).
71. Manzoori J. L., Abdolmohammad-Zadeh H., Amjadi M.: *J. Hazard. Mater.* 144, 458 (2007).
72. Meeravali N. N., Reddy M. A., Kumar S. J.: *Anal. Sci.* 23, 351 (2007).
73. Xiao S., Chen J., Wu X., Miao Y.: *J. Anal. Chem.* 62, 42 (2007).
74. Maranhao T. D., Martendal E., Borges D. L. G., Carasek E., Weiz B., Curtius A. J.: *Spectrochim. Acta, Part B* 62, 1019 (2007).
75. Kreuning G., Maessen F. J. M. J.: *Spectrochim. Acta, Part B* 44, 367 (1989).
76. Weir D. G., Blades M. W.: *J. Anal. At. Spectrom.* 9, 1323 (1994).
77. Weir D. G., Blades M. W.: *J. Anal. At. Spectrom.* 9, 1311 (1994).
78. Botto R. I.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 51 (1993).
79. Brenner I. B., Plantz M., Zhu J. J., Zander A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 273 (1997).
80. Wiederin D. R., Houk R. S., Winge R. K., D'Silva A. P.: *Anal. Chem.* 62, 1155 (1990).
81. Molinero A. L., Castillo J. R., Chamorro P., Muniozguren J. M.: *Spectrochim. Acta, Part B* 52, 103 (1997).
82. Bertagnolli J. A., Neylan D. L., Hammergren D. D.: *At. Spectrosc.* 14, 4 (1993).
83. Liang P., Li J.: *At. Spectrosc.* 26, 89 (2005).
84. De Jong N., Draye M., Favre-Reguillon A., LeBuzit G., Cote G., Foos J.: *J. Colloid Interface Sci.* 291, 303 (2005).
85. Bezerra M. A., Bruns R. E., Ferreira S. L. C.: *Anal. Chim. Acta* 580, 251 (2006).
86. Li Y. J., Hu B., Jiang Z. C.: *Anal. Chim. Acta* 576, 207 (2006).
87. Li Y. J., Hu B., Jiang Z. C., Wu Y. W.: *Anal. Lett.* 39, 809 (2006).
88. Shariati S., Yamini Y.: *J. Colloid Interface Sci.* 298, 419 (2006).
89. Shemirani F., Yousefi S. R.: *Microchim. Acta* 157, 223 (2007).
90. Bezerra M. A., Maeda S. M. D., Oliveira E. P., de Carvalho M. D. B., Santelli R. E.: *Spectrochim. Acta, Part B* 62, 985 (2007).
91. Li Y. J., Hu B.: *Spectrochim. Acta, Part B* 62, 153 (2007).

I. Hagarová (*Geological Institute Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Coupling Cloud Point Extraction to Atomic Spectrometric Methods for Separation, Preconcentration and Speciation of Metals**

The purpose of this article is to offer an overview of the use of cloud point extraction (CPE) in separation, preconcentration and speciation of metals prior to their determination by atomic spectrometric methods. This review also presents theoretical background and a guide for optimization of CPE. Main attention is paid to hyphenation of CPE to flame atomic absorption spectrometry (FAAS), electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES).

VYUŽITÍ CHEMICKY MODIFIKOVANÝCH HOŘKÝCH LÁTEK V PIVOVARSTVÍ

MARCEL KARABÍN, TOMÁŠ BRÁNYIK,
RADIM KRULIŠ, MARKÉTA DVOŘÁKOVÁ
a PAVEL DOSTÁLEK

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6
karabinm@vscht.cz

Došlo 6.1.09, přijato 26.3.09.

Klíčová slova: pivo, chmel, hořké kyseliny, hořkost

Obsah

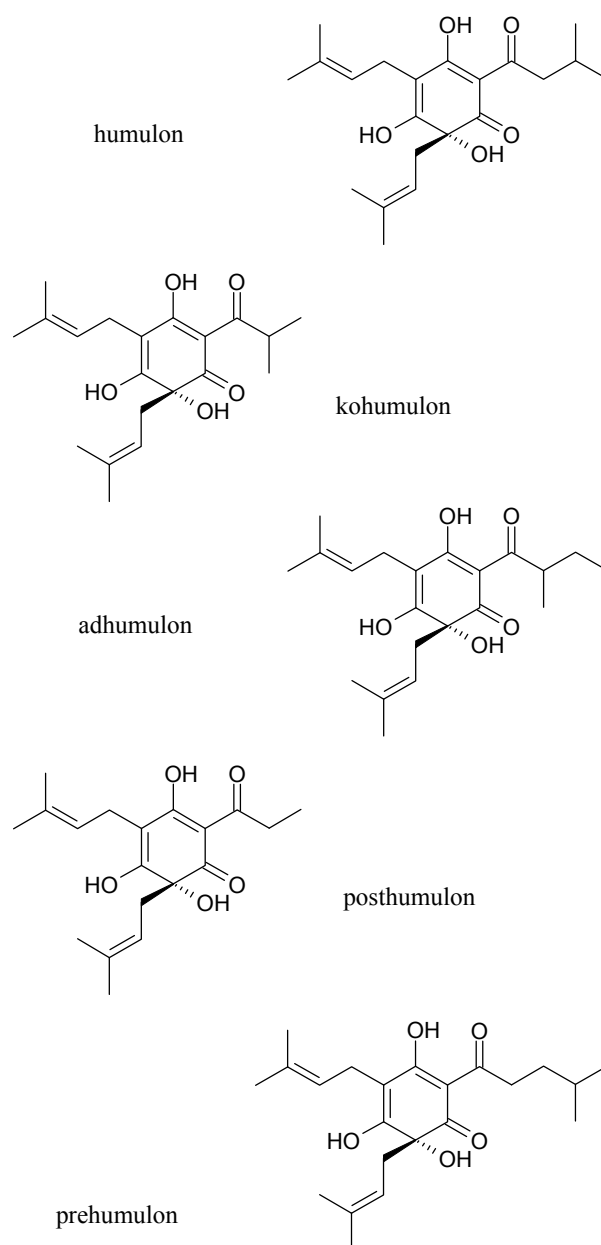
1. Úvod
2. Hořké kyseliny, jejich struktura a pivovarský význam
 - 2.1. α - a iso- α -hořké kyseliny
 - 2.2. Hydrogenované iso- α -hořké kyseliny
3. Legislativní rámec a technologické možnosti využití redukováných forem hořkých kyselin v pivovarství
 - 3.1. Současný stav legislativy
 - 3.2. Technologie použití redukováných hořkých kyselin
4. Metody stanovení iso- α -hořkých kyselin a jejich redukováných forem
5. Závěr

1. Úvod

Jedním z faktorů, ovlivňujících oblíbenost piva, je jeho specifická příjemná hořkost. Ta je způsobena zejména přítomností skupiny látek, tzv. iso- α -hořkých kyselin, které mají svůj původ ve chmelu¹ a během varného procesu přecházejí do mladiny a následně hotového piva. V posledních letech se při výrobě stále častěji používá průmyslově připravených výrobků, ať už v podobě různě upravených extraktů, které nahrazují chmel v „horké“ části pivovarské technologie, nebo i přípravků obsahujících chemicky modifikované (zejména hydrogenované) analogy iso- α -hořkých kyselin, které se využívají zejména k tzv. studenému chmelení v průběhu kvasného procesu, nebo i po něm. Motivem pro použití těchto přípravků jsou hlavně technologické a ekonomické důvody (skladování, dávkování, cena), ale i chemicko-fyzikální vlastnosti těchto látek, které mají za následek např. lepší stabilitu pивní pěny, vyšší senzoričnou hořkost a odolnost vůči světelné degradaci.

Vzhledem k tomu, že doposud používané metody

stanovení látek ze skupiny iso- α -kyselin neumožňovaly stanovení jednotlivých isomerů a hydrogenovaných iso- α -kyselin, a použití těchto látek není prozatím zahrnuto v odpovídající evropské legislativě, vyvstala nutnost vytvoření analytické metody schopné, pokud možno v jedné analýze, stanovit obsahy maximálního počtu látek odvozených od iso- α -hořkých kyselin.



Obr. 1. Strukturální vzorce α -hořkých kyselin

2. Hořké kyseliny, jejich struktura a pivovarský význam

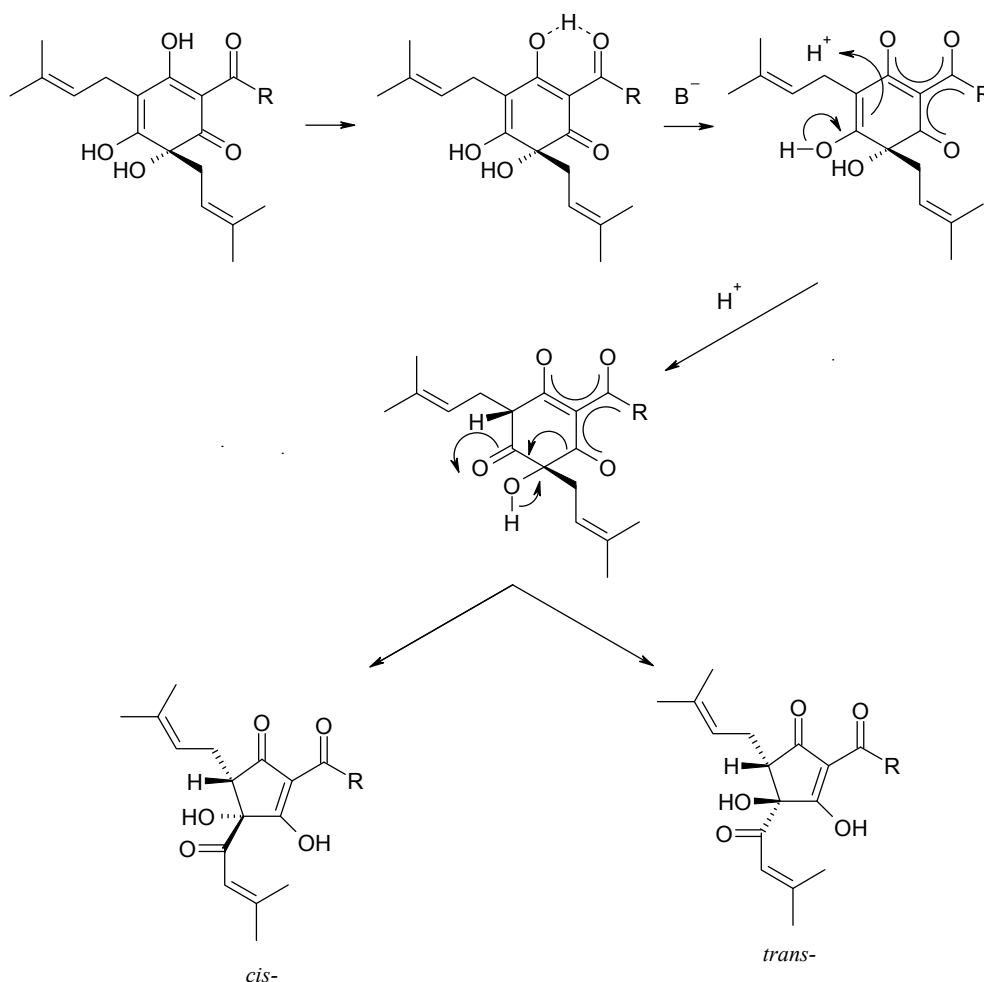
2.1. α - a iso- α -hořké kyseliny

α -Hořké kyseliny jsou základním prekurzorem iso- α -hořkých kyselin vznikajících během pivovarského procesu. Obsah α -hořkých kyselin ve chmelu otáčivém (*Humulus lupulus L.*) je značně závislý nejen na pěstebních podmínkách, ale zejména na odrůdě, takže se podle obsahu těchto látek jednotlivé odrůdy dělí i z hlediska jejich technologického využití². Obvykle se obsah α -hořkých kyselin pohybuje v rozmezí 3–10 hm.%. Struktury jednotlivých homologů se liší pouze postranním acylovým řetězcem a jsou uvedeny na obr. 1. Dominantními isomery ve chmelu jsou humulon, kohumulon a adhumulon, přičemž jejich poměry jsou u jednotlivých odrůd dosti odlišné³.

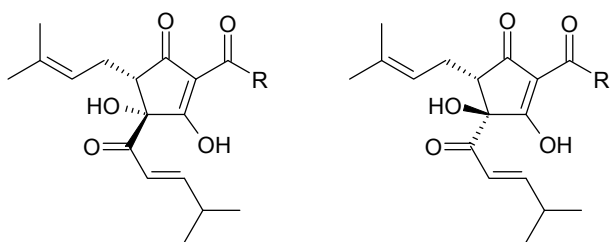
Během chmelovaru dochází k isomeraci α -hořkých kyselin na odpovídající iso- α -hořké kyseliny⁴ (obr. 2). Vý-

znam této reakce spočívá hlavně ve zvýšení rozpustnosti isomerovaných hořkých kyselin ve vodě (přibližně 120 mg l⁻¹ oproti 3 mg l⁻¹ u α -hořkých kyselin) a z toho vyplývající několikanásobně vyšší organoleptické hořkosti⁵. Intenzita a rychlost isomerace je příznivě ovlivněna vyšším pH, přítomností kovových (měďnatých a hořečnatých) iontů a v případě chmelení granulami též velikostí fázového rozhraní⁶. Výsledkem reakce jsou dva geometrické isomery každé iso- α -hořké kyseliny, přičemž jejich poměr v pivu je prakticky neměnný a pohybuje se okolo 68:32 ve prospěch *cis*-isomerů. Je třeba také zdůraznit, že vzniklé iso- α -hořké kyseliny nejsou konečným produktem reakce a v průběhu chmelovaru se dále rozkládají na další produkty, které nebyly doposud přesně chemicky popsány⁷.

Iso- α -hořké kyseliny jsou zodpovědné za přibližně 70 % hořké chuti piva a ovlivňují zejména prvotní senzorický vjem⁸. Zbývající podíl hořké chuti piva je způsoben mimo jiné řadou vedlejších produktů isomerační reakce, označovaných jako allo-, anti- a abeo-iso- α -hořké kyseliny³. Allo-iso- α -hořké kyseliny (obr. 3) mají sensorickou

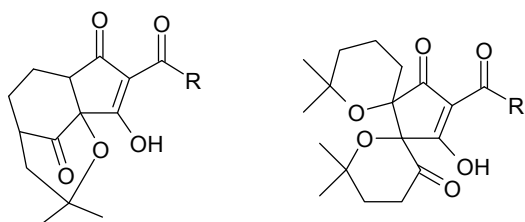


Obr. 2. Mechanismus isomerace humulonu³

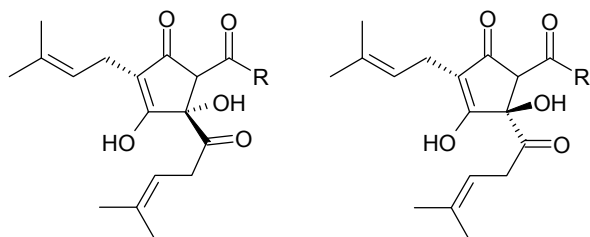


Obr. 3. Strukturální vzorce *cis*-allo-iso- α -hořké kyseliny a *trans*-allo-iso- α -hořké kyseliny

hořkost podobnou iso- α -hořkým kyselinám. Abeo-iso- α -hořké kyseliny (obr. 4) mají složité di- až tricyklické molekuly, nevykazují výraznou sensorickou hořkost, ale mají příznivý vliv na pěnivost piva a na přilnavost pивní pěny. Anti-iso- α -hořké kyseliny (obr. 5) se změněnou konfigurací řetězců na centrálním pětiuhlíkatém jádru vykazují až dvakrát vyšší hořkost než iso- α -hořké kyseliny. Jedná se o derivát iso- α -hořkých kyselin s nejvyšší sensorickou hořkostí.



Obr. 4. Příklady strukturálních vzorců abeo-iso- α -hořkých kyselin



Obr. 5. Strukturální vzorce *cis*-anti-iso- α -hořké kyseliny a *trans*-anti-iso- α -hořké kyseliny

2.2. Hydrogenované iso- α -hořké kyseliny

Struktura a průmyslová výroba^{3,9}

Látky ze skupiny redukováných iso- α -hořkých kyselin jsou odvozeny od iso- α -hořkých kyselin pocházejících z chmele a dělí se do skupin podle stupně redukce dvojných

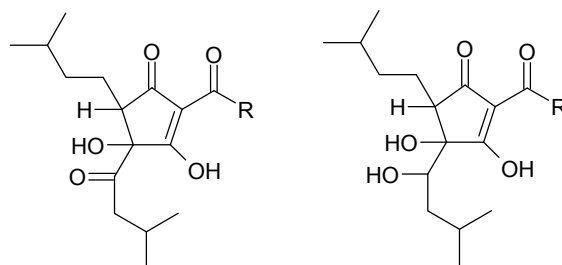
resp. karbonylových vazeb na postranních řetězcích na:

- dihydro-iso- α -hořké kyseliny (Rho),
- tetrahydro-iso- α -hořké kyseliny,
- hexahydro-iso- α -hořké kyseliny.

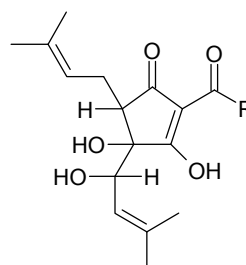
Struktury redukováných iso- α -hořkých kyselin jsou uvedeny na obr. 6 a 7. U rho-iso- α -hořkých kyselin je redukována primárně karbonylová skupina v postranním (4-methyl-3-pentenyl) řetězci za vzniku sekundárního alkoholu s novým chirálním centrem. Z každé iso- α -kyseliny tak vzniknou dva rho-isomery. Naproti tomu u tetrahydroiso- α -hořkých kyselin jsou redukovány v první řadě dvojné vazby na postranních řetězcích. Tento rozdíl se pak promítá i do odlišného způsobu výroby, jehož principem je použití sledu hydrogenačních a isomeračních reakcí, přičemž pořadí a způsob provedení se liší podle stupně hydrogenace hořké kyseliny⁹.

Rho-iso- α -hořké kyseliny se vyrábějí dvěma možnými cestami. První možností je redukce předem připravených iso- α -hořkých kyselin v podobě isomerizovaného chmelového extraktu, druhou cestou pak je souběžná isomerace a redukce α -hořkých kyselin, v obou případech je redukčním činidlem borohydrid sodný. Oba procesy probíhají při zvýšené teplotě v alkalickém prostředí, zbytky redukčního činidla jsou následně odstraněny okyselením HCl a vzniklé redukované iso- α -hořké kyseliny jsou následně převedeny na odpovídající soli hydroxidem draselným.

Tetra-iso- α -hořké kyseliny se vyrábějí celou řadou způsobů, lišících se počáteční surovinou, kterou mohou být jak α -, tak i β -hořké kyseliny. U výroby založené na



Obr. 6. Obecné vzorce tetrahydro- a hexahydro-iso- α -hořkých kyselin



Obr. 7. Obecný vzorec ρ -iso- α -kyseliny

použití α -hořkých kyselin jsou surovinou opět buď předem vyrobené iso-hořké kyseliny, méně často pak neisomerné hořké kyseliny. Na rozdíl od výroby rho-iso- α -hořkých kyselin jsou redukovány v kapalně fází plynným vodíkem na palladio-uhlíkovém katalyzátoru. Důvody pro využití β -hořkých kyselin k výrobě hydrogenovaných analogů jsou čistě ekonomické, protože β -hořké kyseliny jsou vedlejším produktem výroby iso- α -hořkých kyselin a neexistuje pro ně doposud jiné komerční využití. Celý postup, který je poměrně komplexní a výrazně složitější než výroba z α -hořkých kyselin, je zahájen hydrogenací na palladio-uhlíkovém katalyzátoru, následnou oxidací vzniklého produktu (tetrahydrodeoxy- α -hořkých kyselin) kyselinou peroctovou a nakonec isomerací vzniklých tetrahydro- α -hořkých kyselin.

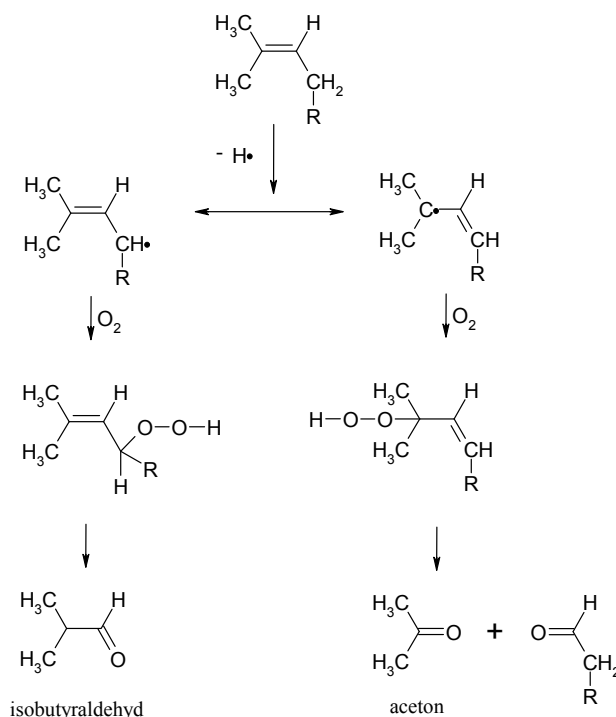
Surovinou pro výrobu hexahydroiso- α -hořkých kyselin jsou produkty předchozích redukčních postupů, přičemž je na každý z nich použit doplňkový hydrogenační krok, tj. rho-iso- α -hořké kyseliny jsou redukovány vodíkem na palladio-uhlíkovém katalyzátoru a tetrahydroiso- α -hořké kyseliny borohydridem sodným.

Výhody použití redukováných iso- α -hořkých kyselin

Z technologického hlediska přináší použití moderních chmelicích preparátů značné výhody. Proto také pivovary stále ve větší míře přistupují k náhradě granulovaného chmele chmelovými extrakty a zejména v poslední době i výrobky obsahujícími hydrogenované iso- α -hořké kyseliny¹⁰. Tyto výrobky se snadněji dávkuje, vzhledem k vysokým koncentracím vyžadují méně prostoru pro skladování, jsou zcela homogenní s přesně známým složením a oproti hlávkovému chmelu nebo chmelovým granulím mají výrazně vyšší chemickou stabilitu. Kromě toho poskytují redukované formy iso- α -hořkých kyselin řadu výhod souvisejících s jejich odlišnými fyzikálně chemickými vlastnostmi. Jedná se zejména o:

- vyšší hořkost (s výjimkou rho-kyselin),
- odolnost proti světelné degradaci,
- schopnost zlepšovat stabilitu pивní pěny.

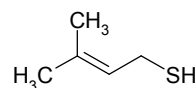
Rho-iso- α -kyseliny dodávají pивu slabší senzoričnou hořkost než ekvivalentní množství nemodifikovaných iso- α -kyselin (přibližně o 30 %), na druhou stranu je však tato hořkost při senzoričném hodnocení označována jako „jemnější“, což může znamenat lepší hodnocení pивa spotřebitelem. Naproti tomu tetrahydro-iso- α -hořké kyseliny sice poskytují hořkost výrazně intenzivnější (až o 70 % oproti nemodifikovaným iso-hořkým kyselinám), tato hořkost je však vnímána jako „drsnější“ a tudíž méně příjemná¹¹. Určitým kompromisem by mohlo být použití hexahydro-iso- α -hořkých kyselin, v dalším textu však budou zmíněny vlastnosti těchto látek, které omezují jejich použití pouze na adjustaci hořkosti. Vzhledem ke zmíněným skutečnostem je tedy vhodné, aby si každý výrobce našel svou vlastní cestu v používání těchto preparátů, tak aby co nejlépe vyhovovala specifickým senzoričným vlastnostem konkrétního výrobku.



Obr. 8. Autooxidace 3-methylbut-2-enylových postranních řetězců³

Je známo, že při skladování pивa dochází k rozkladu iso- α -kyselin vlivem autooxidace¹² a reakcí s reaktivními formami kyslíku¹³. Tyto reakce neprobíhají ve významné míře při nízkých teplotách, avšak nabývají na významu během expedice a skladování v prodejních řetězcích. Bylo zjištěno, že *trans*-iso- α -kyseliny podléhají rozkladu v daleko větší míře než *cis*-iso- α -kyseliny^{14,15}. To je pravděpodobně způsobeno bližší vzájemnou polohou dvojných vazeb v 3-methyl-2-butenylových a 4-methyl-3-pentenyllových postranních řetězcích¹⁶. Nenasycené postranní řetězce jsou napadány volnými radikály na uhlíku sousedícím s dvojnou vazbou a vzniklé hydroperoxy se štěpí na isobutyraldehyd a acetone (obr. 8).

Další možnou cestou vzniku senzoričnou nežádoucích produktů je reakce 3-methyl-2-butenylového radikálu s thiolovou skupinou siričných aminokyselin za vzniku 3-methylbut-2-en-1-thiolu (obr. 9), látky s velice nízkým prahem vnímání (2–20 ng l⁻¹)¹⁷, která je zdrojem charakteristické „letinkové“ příchuti¹⁸. Redukované iso- α -kyseliny (di-, tetra- i hexahydro-) v důsledku nepřítomnosti reaktivní α -hydroxyketoskupiny, resp. nasycení postranního řetězce



Obr. 9. 3-Methylbut-2-en-1-thiol

Tabulka I
Srovnání jednotlivých látek ovlivňující hořkost piva³

Produkt	Relativní hořkost	Zlepšení pěnivosti při ekvivalentní hořkosti	Fotostabilita
Iso- α -kyseliny	1,00	*	ne
ρ -Iso- α -kyseliny	0,65	*	ano
Tetrahydro-iso- α -kyseliny	1,7	***	ano
Hexahydro-iso- α -kyseliny	1,1	**** (nepřirozeně hustá)	ano

těžce, těmto degradačním reakcím nepodléhají¹⁹. Využívají se proto často při výrobě piv se zvýšenou odolností proti senzorickým vadám způsobeným těmito procesy (piva stáčená do čirých lahví).

Druhou významnou předností redukováných iso- α -kyselin je jejich schopnost zlepšovat tvorbu pивní pěny a prodlužovat dobu jejího rozpadu, zvláště za přítomnosti hydrofobních polypeptidů. Vzhledem k nepolárnímu charakteru jsou iso- α -kyseliny hydrofobní a společně s kationty dvojmocných kovů a bílkovinami tvoří základ stabilního povrchu membrán pивnových bublin. Další zvýšení hydrofobicity u redukováných iso- α -hořkých kyselin dále pozitivně ovlivňuje hustotu pивní pěny a její přilnavost ke stěně pивní sklenice, čímž brzdí její rozpad²⁰. Nevýhodou zejména hexahydro-iso- α -hořkých kyselin je skutečnost, že při nadměrném používání těchto látek vzniká pěna nepřirozeně hustá a stálá, která je spotřebitelem vnímána spíše negativně²¹. Tento fakt je dalším argumentem pro opatrné využívání těchto derivátů při výrobě piva.

Některé technologické vlastnosti redukováných iso- α -kyselin jsou shrnuty v tab. I.

3. Legislativní rámec a technologické možnosti využití redukováných forem hořkých kyselin v pivovarství

3.1. Současný stav legislativy

Legislativní rámec použití redukováných forem iso- α -hořkých kyselin pro výrobu piva se značně liší pro Evropskou unii a pro země, pro které je závazné rozhodnutí U.S. Food and Drug Administration (FDA).

Prozatím neexistuje žádná směrnice Evropské unie, která by upravovala použití chemicky modifikovaných chmelových výrobků, obsahujících hydrogenované formy iso- α -hořkých kyselin, takže se jejich použití řídí místní legislativou jednotlivých zemí, podle toho, zda jsou tyto výrobky považovány za aditiva, nebo za modifikované chmelové extrakty. Typickým historickým příkladem nulové tolerance k používání jiných než čistě přírodních surovin může být německý zákon o čistotě piva (Reinheitsgebot). Toto ustanovení pocházející ze 16. století, přestože bylo již v roce 1982 odmítnuto Evropskou komisí, stále přetrvává ve zvykové podobě i jako součást německých daňových zákonů a prakticky zapovídá použití

všech chemicky upravených chmelových výrobků pro pivovarské účely v Německu²². V současné době je připravována společná evropská směrnice²³, která podle svého aktuálního znění předpokládá zařazení výrobků obsahujících redukované iso- α -hořké kyseliny mezi potravinářská aditiva. V souvislosti s touto skutečností bude zřejmě nutno vyznačovat použití těchto výrobků na obalech a lze tedy očekávat snahu o vytvoření uzančních analytických metod pro stanovení redukováných iso- α -hořkých kyselin.

V České republice se problematika klasifikace těchto výrobků řešila pouze v rámci projektu přidělování značky kvality „Klasa“. Ministerstvo zemědělství v rámci posuzování žádostí poskytla administrátorovi projektu, Zemědělskému garančnímu a intervenčnímu fondu, jednoznačné vyjádření (respektující právní názor resortu). V něm konstatuje, že s ohledem na prohlášení výrobce a vzhledem k závěrům vyplývajícím z odborné literatury (výrobky, obsahující redukované iso- α -hořké kyseliny mohou být použity k produkci ke světlu stabilních piv a přidávány do piva v malých množstvích ke zlepšení vzhledu pěny i její stability)⁹, i s ohledem na skutečnost, že jde o chemicky významně pozmeněné produkty, které nelze chemicky identifikovat s hořkými látkami ve chmelu ani v mladině, je třeba považovat je za přídatné látky typu stabilizátorů pěny, které je nutno před aplikací nechat schválit a uvádět na etiketě jako aditivum.

Jednodušší je situace ve Spojených státech amerických, kde byly rozhodnutím FDA tyto výrobky zařazené mezi modifikované chmelové extrakty a jejich používání se řídí stejnými právními úpravami jako používání isoextraktů²⁴.

3.2. Technologie použití redukováných hořkých kyselin

Jak už bylo uvedeno, na rozdíl od přírodního nebo mechanicky a fyzikálně upraveného chmele nebo chmelového výrobku, jehož použití se prakticky bez výjimky omezuje na varní část pivovarské technologie²⁵, je možno chemicky modifikované preparáty aplikovat i v pozdějších fázích výroby²³. Rho-iso- α -hořké kyseliny, obvykle dodávané v podobě 35 hm.% roztoku draselných solí je možno přidávat buď během chmelovaru, nebo častěji po naředění (10 hm.%) přímo do hotového piva po ukončení kvašení²⁶. Další alternativou je použití směsi rho-iso- α -hořké kyselin, β -hořkých kyselin a chmelových silic (tzv. „light sta-

ble kettle extract“), jejímž použitím přímo na varně získá pivo intenzivnější chmelové aroma, které je v případech, kdy je pro chmelení piva použito výhradně chmelových extraktů, často potlačeno^{27,28}. Tetra- a hexahydro-iso- α -hořké kyseliny jsou dodávány v koncentracích okolo 10 hm.% a po ředění na 2 až 5 hm.% jsou dávkovány buď do prokvašeného piva, nebo je možné i dávkování až během stáčení²⁶. Nevýhodou dávkování těchto preparátů do hotového piva jsou ekonomické náklady spojené s nutností instalace speciálního dávkovacího zařízení při stáčení.

4. Metody stanovení iso- α -hořkých kyselin a jejich redukovaných forem

Klasickou metodou pro stanovení iso- α -hořkých kyselin v pivovarství je metoda podle EBC (European Brewery Convention), spočívající ve spektrofotometrickém stanovení v UV oblasti po předchozí extrakci do iso-oktanu²⁹. Přestože tato metoda plně postačuje pro orientační určení obsahu hořkých látek, přináší s sebou její použití řadu obtíží. V prvé řadě se jedná o skupinové stanovení všech hořkých látek, takže nejenže není možno stanovit obsahy jednotlivých isomerů, ale výsledek stanovení je ovlivněn přítomností dalších chemicky podobných látek. Navíc není tato metoda použitelná pro odlišení redukovaných analogů hořkých kyselin. Stejně tak pomocí dříve používaných chromatografických metod³⁰ nebylo možno oddělit *cis*- a *trans*-isomery. Tak vznikl požadavek na metodu, schopnou přesně detegovat a kvantifikovat iso- α -kyseliny a redukované iso- α -kyseliny v pivu, která by mohla poskytnout širší spektrum informací o obsahu látek použitých ke chmelení piva.

Základem pro tyto nové metody je obvykle HPLC, i když v literatuře jsou zmiňovány i metody založené na SDS-kapilární elektroforéze v kombinaci s diode-array (DAD) detekcí³¹. Většina současných prací však využívá vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii na kolonách s reverzní (nejčastěji C18) fází v kombinaci s UV (DAD) nebo MS¹ detekcí^{32–34}. Kvantifikace jednotlivých látek je značně zjednodušena dostupností komerčních standardů iso-, dihydro-, tetrahydro- i hexahydro-iso- α -kyselin³⁵.

Prvním, obvykle nezbytným krokem stanovení, je koncentrování stanovovaných látek. Klasická extrakce kapalina-kapalina je vzhledem ke zdlouhavosti procesu nahrazována šetrnější extrakcí na pevné fázi (SPE), kde zatím největší uplatnění našly sorbenty s různými reverzními fázemi obvykle vázanými na silikagel. Harms³³ ověřil použitelnost oktylových, oktadecylových, fenylových modifikovaných silikagelů a polystyrenových SPE sorbentů, přičemž zjistil, že ačkoli všechny fáze jsou pro stanovení daných analytů použitelné, nejvhodnější se jeví reverzní fáze oktylové, resp. oktadecylové. Výhodou postupů založených na SPE je kromě menší časové náročnosti i omezení chyb vyplývajících z oxidace a světelné a termické degradace analyzovaných látek v důsledku použití poměrně krátkého a k analytu citlivého postupu. Určitou nevýhodou

může být určitá nejednotnost v kvalitě jednotlivých šarží kolonek³⁶.

HPLC eluce je nejčastěji gradientová, přičemž vzhledem k počtu a chemické podobnosti stanovovaných látek byla odzkoušena celá řada mobilních fází na bázi směsi methanolu, acetonitrilu nebo ethanolu s nejrůznějšími pufrů, tak aby se pH mobilní fáze pohybovalo v neutrální nebo mírně alkalické (pH 6–9) oblasti^{33,35}. Konkrétně byla ověřena srovnatelnost získaných výsledků získaných za použití pufrů na bázi mravenčanu amonného, octanu amonného a fosforečnanu, citrátu a octanu sodného³⁷. K analýze je možno použít široké spektrum běžně komerčně dostupných kolon, jejichž reverzní fáze je tvořena oktadecylovým silikagelem. Nejnovější metodika stanovení a kvantifikace iso- α -kyselin se opírá o využití nových typů kolon s rigidní „monolitickou“ strukturou silikagelu umožňujících analýzy s vysokým průtokem mobilní fáze. Použití těchto kolon by umožnilo zvýšit celkovou rychlost analýzy nejen zkrácením doby zdržení vzorku na přístroji, ale také možností vynechat předchozí krok SPE³⁸.

K detekci se využívá nejčastěji UV detektorů, přičemž v poslední době se stále více prosazují detektory na bázi diodového pole, které umožňují měření profilu absorbance v celé šíři UV spektra, který je pro látky více či méně charakteristický a v důsledku toho umožňují i kvalitativní charakteristiku neznámého vzorku. Spektra všech analogů iso- α -kyselin byla již změřena a i přes určité problémy způsobené opět značnou fyzikálně-chemickou podobností jednotlivých iso- α -kyselin, která má za následek zaměnitelnost jejich spekter, nám využití DAD detektoru umožňuje zbavit se chyb způsobených případnou koelucí jiných látek^{37–39}. Někteří autoři využili při analýze hmotnostního detektoru v negativním módu, po předchozí „electrospray“ ionizaci. Takto byly stanoveny nominální hmoty (*m/z*) i pro několik dalších isomerů hydrogenovaných iso- α -kyselin, jejichž analýza nebyla pomocí jiných metod možná³⁷.

Intenzivní snaha jednotlivých pracovišť vyústila ve vznik řady nových metodik, schopných v průběhu jedné analýzy spolehlivě stanovit obsahy redukovaných i neredukovaných iso- α -hořkých kyselin, včetně obsahů *cis*- a *trans*-isomerů⁴⁰, takže bude v budoucnu možné kontrolovat použití isomerovaných a redukovaných chmelových výrobků během procesu výroby piva a ověřit tak způsob chmelení a původ surovin deklarovaných výrobcem.

Závěr

V současné době je možno pro výrobu piva použít nejen přírodních, minimálně upravených chmelových výrobků, ale také velké množství preparátů, obsahujících široké spektrum sloučenin, které se v původní pivovarské surovině, chmelu, vůbec nevyskytují. Tyto chemicky modifikované látky poskytují při výrobě celou řadu technologických výhod, např. zlepšení pěnivosti, hořkosti a senzorycké stability. Na druhou stranu jejich použitím ztrácí pivo

svůj charakter „přírodního“ nápoje.

V souvislosti s těmito skutečnostmi probíhá v současnosti široká diskuse, týkající se zařazení těchto preparátů do legislativního rámce výroby nápojů tak, aby bylo jednoznačně stanoveno, zda se jedná o modifikované chmelové výrobky, nebo o potravinářská aditiva.

Pokud by tyto látky byly zařazeny do skupiny aditiv, přineslo by to automaticky požadavky na vyvinutí nových moderních analytických metod, schopných jednoznačně prokázat přítomnost látek nepocházejících z přírodních surovin. Tyto postupy, založené na HPLC by měly být schopny v jedné analýze souběžně stanovit iso-, dihydro-, tetrahydro- i hexahydro-iso- α -hořké kyseliny včetně jejich geometrické isomery a poskytnout tak komplexní informaci o obsazích nejdůležitějších látek, odpovědných za hořkou chuť i celou řadu dalších senzorických vlastností piva.

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR (1M0570 a MSM6046137305).

LITERATURA

- Opletal L., Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: *Chem. Listy* 101, 895 (2007).
- Verzele M., De Keukeleire D.: *Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids*. Elsevier, Amsterdam 1991.
- Briggs D. E., Boulton C. A., Brookes P. A., Stevens R.: *Brewing Science and Practice*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge 2004.
- De Keukeleire D., Verzele M.: *Tetrahedron* 27, 4939 (1971).
- Peacock V.: *Tech. Q. - Master Brew. Assoc. Am.* 35, 4 (1998).
- Kunze W.: *Technology Brewing and Malting*, VLB, Berlin 1999.
- Malowicki M. G., Shellhammer T. H.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 4434 (2005).
- Techakriengkrai I., Paterson A., Taidi B., Piggot J. R.: *J. Inst. Brew.* 110, 51 (2004).
- Roberts T. R., Wilson R. J. H.: *Handbook of Brewing*, (Priest F. G., Stewart G. G., ed.), 2. vyd. Taylor and Francis, London 2006.
- De Cooman L., Aerts G., De Rouck G., Syryn E., Van Opstaele F., Goiris K., De Ridder M., Joos P., De Keukeleire D.: *Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv.* 24, 276, 2003.
- Todd P. H., Johnson P. A., Worden L. R.: *Tech. Q. - Master Brew. Assoc. Am.* 9, (1972).
- Kaneda H., Kano Y., Osawa T., Kawakishi S., Kameda K.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 47, 49 (1989).
- Wackerbauer K., Hardt R.: *Brauwelt Int.* 4, 320 (1997).
- De Cooman L., Aerts G., Witters, A., De Ridder, M., Boeykens A., Goiris K., De Keukeleire D.: *Cerevisia* 26, 155 (2001).
- Araki S., Takashio M., Shinotsuka K.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60, 26 (2002).
- De Cooman L., Aerts G., Overmeire H., De Keukeleire D.: *J. Inst. Brew.* 106, 169 (2000).
- Irwin A. J., Bordeleau J., Barker R. L.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 51, 1 (1993).
- Sakuma S., Rikimaru Y., Kobayashi K., Kowaka M.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 49, 162 (1991).
- Huvaere K., Andersen, M. L., Skibsted L. H., Heyrick, A., De Keukeleire, D.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 1489 (2005).
- Čížková H., Dostálek P., Fiala J., Kolouchová I.: *Chem. Listy* 100, 478 (2006).
- Bamforth C. W., Kanauchi M.: *J. Sci. Food Agric.* 8, 1045 (2003).
- Donhauser S., v knize: *Modern Methods of Plant Analysis – Beer Analysis* (Linskens H. F., Jackson J. F., ed.), sv. VII, Springer-Verlag, Heidelberg 1988.
- Amended proposal for a: REGULATION OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on food additives, COM(2007) 673 final, http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/com/2007/com2007_0673en01.pdf, staženo 9.10.2008.
- FDA: Code of Federal Regulations, 21CFR - Food and drugs, 172.560 (U.S. FDA 2008), <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fi=172.560>, staženo 18.9.2008.
- Cvengroschová M., Šmogrovičová D.: *Chem. Listy* 101, 287 (2007).
- http://www.barthhaasgroup.com/cmsdk/content/bhg/hop_products.htm, staženo 18.9.2008.
- <http://www.hopsteiner.com/pdf/products/LSKE04.pdf>, staženo 18.9.2008.
- Wilson R. J. H., Roberts T., Smith R. J., Biendl M.: *Tech. Q. - Master Brew. Assoc. Am.* 38, 11 (2001).
- European Brewery Convention – Analytica EBC*, kap. 7.8, Getränke Fachverlag, Nürnberg 1998.
- European Brewery Convention – Analytica EBC*, kap. 9.8, Getränke Fachverlag, Nürnberg 1998.
- Royle L., Ames J. M., Hill C. A., Gardner D. S. J.: *Food Chem.* 74, 225 (2001).
- Vanhoeacker G., De Keukeleire D., Sandra P.: *J. Chromatogr., A* 1035, 53 (2004).
- Harms D., Nitzsche F.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59, 28 (2001).
- Hofta P., Dostálek P., Sýkora D.: *J. Inst. Brew.* 113, 48, (2007).
- Biendl M., Hartl A.: *Monatsschr. Brauwiss.* 48, 102 (1995).
- Jurková M., Kellner V., Čulík J.: *Kvasny Prum.* 49, 258 (2003).
- Ting P. L., Kay S., Ryder D.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 65, 9 (2007).
- Bolívar A., Gasparri M., Zufall C.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64, 39 (2006).
- Khatib A., Kyong K. H., Wilson E. G., Verpoorte R.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29, 293 (2006).
- Straková L., Hofta P., Dostálek P., Průcha P.: *Kvasny Prum.* 53, 70 (2007).

M. Karabín, T. Brányik, R. Kruliš, M. Dvořáková, and P. Dostálek (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **Application of Chemically Modified Bitter Compounds in Brewing**

Iso- α -acids or isohumulones are hop-derived beer constituents formed in the brewing process. Iso- α -acids are light-sensitive; they play a key role in the origin of the well-known light-struck off-flavour of beer. To prevent the

negative effect of light, beers are generally stored in light-proof cans or dark bottles. Alternatively, reduced iso- α -acids, resistant to light-induced degradation, can be added to beer. These substances also show a positive effect on foam stability. This paper describes the impact of iso- α -acids, reduced iso- α -acids, tetrahydro-iso- α -acids, and hexahydro-iso- α -acids on brewing; their food legislation frame is also mentioned. Chemical and physical methods of analysis of the substances are also reviewed.

SROVNÁNÍ JAKOSTI A ZDRAVOTNÍ NEZÁVADNOSTI BIOPOTRAVIN A KONVENČNÍCH POTRAVIN

TOMÁŠ KOMPRDA

*Ústav technologie potravin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
komprda@mendelu.cz*

Došlo 14.5.09, přijato 25.6.09.

Klíčová slova: biopotraviny, konvenční potraviny, jakost, zdravotní nezávadnost

Obsah

1. Úvod
2. Ekologické zemědělství, bioprodukty, biopotraviny
3. Srovnání nutriční hodnoty biopotravin a konvenčně vyráběných potravin
4. Vybrané parametry zdravotní nezávadnosti
5. Přímý dopad na lidské zdraví
6. Sensorická jakost
7. Závěr

1. Úvod

V souvislosti se zemědělskou politikou, která finančně dotuje zemědělské praktiky šetrné k životnímu prostředí, roste v hospodářsky vyspělých zemích poptávka po biopotravinách (organic foods). Konzumenti pokládají biopotraviny ve srovnání s konvenčně produkovanými potravinami za nutričně hodnotnější, zdravotně nezávadné a chutnější, výsledky vědeckých publikací jsou však v tomto směru často protichůdné a nejednoznačné v důsledku neadekvátních metod získávání vzorků a příliš velkého počtu doprovodných zkreslujících faktorů (vliv půdních podmínek, odrůdy, klimatických poměrů, data sklizně, stupně čerstvosti). Následující text je věnován objektivnímu srovnání biopotravin s konvenčně vyráběnými potravinami v parametrech nutriční hodnoty, zdravotní nezávadnosti a sensorické jakosti na základě údajů v recentních vědeckých publikacích. Nejprve je však nutno stručně definovat předmět tohoto sdělení, tedy biopotraviny.

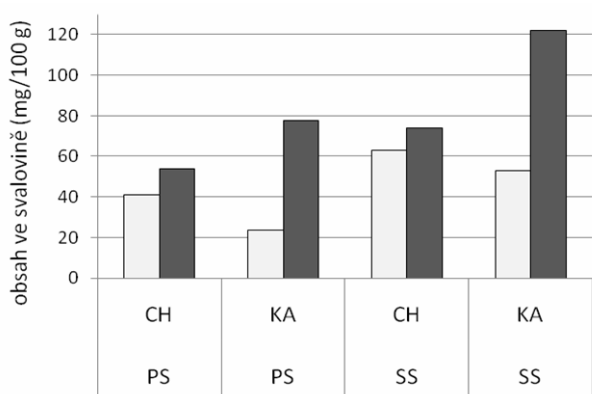
2. Ekologické zemědělství, bioprodukty, biopotraviny

V České republice je produkce biopotravin ošetřena mimo jiné zákonem o ekologickém zemědělství (Zákon 242/2000 Sb.). Ekologické zemědělství poskytuje tzv. bioprodukty, suroviny rostlinného nebo živočišného původu určené na základě příslušného osvědčení k výrobě biopotravin. Biopotraviny mohou obsahovat povolené aditivní látky, pomocné látky a suroviny konvenčního zemědělského původu až do 30 % hmotnosti. Bioprodukty nesmějí být vyráběny s použitím umělých hnojiv, pesticidů a genových manipulací, biopotraviny nesmějí obsahovat umělá barviva a konzervanty a nesmějí být zpracovány chemickými a fyzikálními postupy. Biopotravina je tedy potravina vyrobená za podmínek uvedených v zákoně o ekologickém zemědělství splňující požadavky na jakost a zdravotní nezávadnost, na niž bylo vydáno osvědčení o biopotravině.

3. Srovnání nutriční hodnoty biopotravin a konvenčně vyráběných potravin

Významným nutričním faktorem ovlivňujícím riziko některých chronických degenerativních onemocnění člověka (kardiovaskulární onemocnění, některé typy rakoviny, autoimunitní onemocnění) jsou mastné kyseliny. Rostlinné oleje odvozené z certifikovaných metod bio-produkce a konvenčního zemědělství se ve složení mastných kyselin neliší¹. Obsah polynenasycených mastných kyselin (PUFA) řady n-3 a obsah konjugované linolové kyseliny (CLA) byl vyšší v bio-mléce ve srovnání s mlékem konvenčním². U CLA se předpokládají účinky antikarcinogenní, antiaterogenní, antitrombotické, antioxidační a antidiabetologické. Uvedené příznivější složení lipidové frakce bio-mléka však není výsledkem „ekologičnosti“ daného způsobu chovu, ale důsledkem složení krmné dávky: ekologicky chované dojnice přijímaly méně koncentrovaných krmiv a více pícnin. Skladba krmné dávky může ovlivnit složení tukové frakce ekologicky získaného produktu i negativně (obr. 1): obsah cholesterolu a obsah kyseliny arachidonové v mase kuřat typu „label-chicks“, tedy kuřat produkovaných podle zásad ekologického chovu, byl podstatně vyšší oproti konvenčně produkovaným kuřatům^{3,4}. Eikosanoidy odvozené z kyseliny arachidonové působí prozánětlivě a stimulují agregaci trombocytů; vyšší příjem kyseliny arachidonové v potravě tedy zvyšuje riziko kardiovaskulárních a autoimunitních onemocnění.

Dosavadní studie porovnávající obsah minerálních látek většinou vyznívají ve prospěch konvenčních produktů, což lze demonstrovat na příkladu draslíku, hořčíku a vápníku u grapefruitové šťávy, zinku a manganu



Obr. 1. Obsah cholesterolu (CH) a kyseliny arachidonové (KA) v prsní (PS) a stehenní (SS) svalovíně kuřat vykrmovaných konvenčně (K) a podle zásad kladených na „label-chicks“ (kuřata chovaná „ekologicky“; EKO); upraveno podle^{3,4}. □ K, ■ EKO

v konvenčně pěstované mrkvi a zelí, a vápníku, mědi a hořčíku v konvenčně pěstovaných bramborách ve srovnání s příslušnými bio-protějšky⁵.

Vitamin C je jedním z mála ukazatelů nutriční hodnoty potravin, ve kterém jsou pravděpodobně bioprodukty nadřazeny odpovídajícím konvenčně vyráběným produktům. Týká se to např. rajčat, kde u dvou odrůd pěstovaných ekologicky, resp. konvenčně byl zjištěn obsah kyseliny askorbové 22 a 19, resp. 18 a 16 mg/100 g čerstvé hmoty⁶ nebo šťávy z grapefruitů, která podle období sklizně obsahovala u bioproduktů 31–41, u konvenčních produktů 22–34 mg kyseliny askorbové/100 g (cit.⁵).

Lipofilní vitaminy jako takové nebyly v uvedeném kontextu dosud posuzovány, jsou však k dispozici údaje o obsahu lykopenu. Šťáva konvenčně pěstovaných grapefruitů obsahovala průkazně více tohoto karotenoidu než šťáva bio-grapefruitů⁵.

Zajímavým tématem pro produkci biopotravin jsou sekundární metabolity rostlin (nejčastěji fenolické látky ze skupiny flavonoidů s předpokládaným antioxidačním a antikarcinogenním účinkem), které jsou obvykle produkovány jako obrana proti škůdcům; případné rozdíly v obsahu těchto látek mezi konvenčními a bio produkty jsou tedy *a priori* dány vyšším tlakem škůdců na chemicky neošetřené ekologicky pěstované plodiny. Kvantitativně nejvýznamnějšími flavonoidy v rajčatech jsou kvercetin a kemferol. Jejich průměrný obsah za desetileté sledování byl v bio-rajčatech průkazně vyšší (116 a 63 mg g⁻¹ sušiny) než v konvenčně pěstovaných rajčatech (65 a 32 mg g⁻¹ sušiny⁷). Obdobně byl nalezen vyšší obsah celkových fenolických látek v bio-jahodách ve srovnání s jahodami konvenčně pěstovanými⁸. Dominantním flavonoidem grapefruitů je naringin, který inhibuje aktivitu cyklooxygenasy COX-2 a jeho vysoký příjem by tedy teoreticky mohl vést ke snížení rizika rakoviny tlustého střeva. Obsah na-

ringinu ve šťávě z bio-grapefruitů byl vyšší než v konvenční grapefruitové šťávě⁵. Ovšem jakékoliv rozdíly v obsahu flavonoidů, karotenoidů a vitamínu C v rajčatech potenciálně dosažitelné alternativními metodami pěstování (ekologické zemědělství) jsou po zpracování na příslušné výrobky na úrovni spotřebitele neměřitelné⁹.

4. Vybrané parametry zdravotní nezávadnosti

Tradovaný názor o nadřazenosti biopotravin v parametrech zdravotní nezávadnosti vyplývá z předpokladu nižšího příjmu chemických látek konzumací biopotravin ve srovnání s konvenčními potravinami. Zde je třeba si uvědomit následující skutečnosti: do organismu člověka se dostává velké množství chemických látek i z mnoha jiných zdrojů než z potravin (např. z prostředí domácnosti jsou to značné dávky vysoce toxických látek jako polybromované difenyletery, pesticidy, estery kyseliny ftalové, perfluoroktany); značné množství chemických látek se dostává do potravního řetězce z životního prostředí, což lze pouze obtížně ovlivnit volbou systému pěstování nebo chovu; obsahy chemických látek i v konvenčních potravinách jsou na základě platné legislativy velmi pečlivě hlídány; „cizorodé“ chemické látky se podílejí velmi malou měrou na vstupu karcinogenů do organismu člověka (tab. I; z tab. I mimo jiné plyne vysoký podíl látek vznikajících při kuchyňské úpravě potravin: heterocyklických aromatických aminů, polyaromatických uhlovodíků, *N*-nitrososloučenin, které však nijak nesouvisejí s metodou získávání produktů pro výrobu těchto potravin); lze tedy těžko předpokládat měřitelný rozdíl ve zdravotním dopadu konzumace biopotravin a konvenčních potravin i při zjištění statisticky průkazných rozdílů v obsahu některých chemických látek mezi oběma skupinami potravin.

Pokud jde o přirozeně se vyskytující toxické látky, rozdíly mezi bio- a konvenčními produkty v obsahu sola-

Tabulka I

Podíl na vstupu karcinogenů do organismu člověka při tzv. západním stylu stravování

Zdroj	Množství [mg den ⁻¹]	Podíl [%]
Základní potraviny	1000	88
Koření, pochutiny	10	1
Složky obalů	2	1,6
Kontaminanty	0,1	0,1
Rezidua pesticidů	0,1	0,1
Rezidua veterinárních léčiv	0,1	0,1
Produkty úpravy potravin	0,1	9
Mykotoxiny	0,001	0,1

ninu jsou u brambor neprůkazné, bio-rajčata obsahují více tohoto glykoalkaloidu. V případě mykotoxinů nebyly zjištěny průkazné rozdíly v obsahu deoxynivalenolu mezi bio- a konvenční pšenicí, bio-mléko však obsahovalo ve srovnání s mlékem konvenčním průkazně vyšší koncentrace aflatoxinu M-1 (cit.¹⁰). Bio-piva byla ve srovnání s pivy konvenčními častěji kontaminována ochratoxinem A i deoxynivalenolem¹¹.

Další skupinou chemických nebezpečí v potravinách jsou kontaminující látky. Některé práce nezjistily rozdíly v obsahu kadmia a olova mezi bio- a konvenčními produkty¹⁰, v jiných studiích byl naopak prokázán vyšší obsah těchto toxických prvků v konvenčních produktech¹². Polyaromatické uhlovodíky vstupují do potravního řetězce především z atmosféry (40 000 t rok⁻¹) a oceánů (230 000 t rok⁻¹), jsou též přirozeným metabolitem některých rostlin (zelí, pórek, hlávkový salát, rajčata, špenát, olivy). Ovlivňují tedy stejným způsobem bezpečnost bio- i konvenčních potravin. Totéž lze konstatovat i o dioxinech (rozhodující depozice na plodiny je ze vzduchu a vody bez ohledu na typ produkce). Obsah dusičnanů bývá ve většině studií v bio-produktech nižší než v odpovídajících produktech konvenčních. Toxikologický význam dusičnanů jako takových je však u dospělé populace nevelký. Jejich postupnou redukcí sice mohou vznikat karcinogenní *N*-nitrososloučeniny, rozhodujícím zdrojem dusičnanů v potravě je však zelenina a existuje průkazný negativní vztah mezi příjmem zeleniny (bez ohledu na způsob produkce) a rizikem rakoviny. Mimoto příjem dusičnanů je pouze asi 20 % hodnoty tolerovatelného denního příjmu, ADI (cit.¹³).

Obsah reziduí pesticidů je logicky v bio-produktech ve srovnání s konvenčními produkty nižší. Avšak i 70 % konvenční produkce je zcela bez reziduí pesticidů, 30 % obsahuje rezidua pod hodnotami MLR (maximální limit reziduí, legislativně povolená hodnota). Naopak průměrně ve čtvrtině vzorků bio-ovoce a bio-zeleniny bývají nalézána rezidua pesticidů vlivem kontaminace prostředí a tzv. driftu. Celosvětově je příjem reziduí pesticidů méně než 1 % hodnoty ADI a v současnosti tedy nepředstavují rezidua pesticidů riziko pro lidské zdraví¹³.

K problematice biologicky aktivních látek (rezidua veterinárních léčiv, růstové stimulatory) je možno říci, že ohledně jejich použití není český veterinární zákon (konvenční živočišné produkty) o mnoho benevolentnější než zákon o ekologickém zemědělství (bio-produkty). Např. použití růstových stimulatorů v živočišné výrobě je v Evropské unii paušálně zakázáno.

Výskyt přídatných látek v biopotravinách by měl být opět z definice nižší než v konvenčně vyrobených potravinách. Legislativní limity (nejvyšší povolené množství, NPM) obsahu přídatných látek v potravinách obecně by však měly zaručovat naprostou zdravotní nezávadnost i konvenčně vyráběných potravin.

Při výrobě biopotravin nesmějí být použity geneticky modifikované organismy (GMO). Z hlediska zdravotní nezávadnosti a nutriční hodnoty je však nukleová kyselina

(DNA) odvozená z GMO naprosto ekvivalentní „běžné“ DNA; u DNA odvozené z GMO také dosud nebyly prokázány alergenní vlastnosti.

Na závěr této části není bez zajímavosti uvést, že konzumace bio-vína je v celkovém hodnocení rizikovější než konzumace vína konvenčního (mezi posuzovanými faktory byly mimo jiné methanol, biogenní aminy, oxid siřičitý, toxické prvky, rezidua pesticidů, mykotoxiny¹⁴).

5. Přímý dopad na lidské zdraví

Na základě dostupné vědecké literatury lze zatím dokumentovat pouze snížení rizika ekzému u dětí do dvou let věku po konzumaci bio-mléčných výrobků (hodnota relativního rizika vyjádřená jako ods ratio byla 0,64). V případě ekologicky produkovaného masa, vajec, ovoce a zeleniny však nebyla prokázána žádná souvislost s výskytem ekzému či *asthma bronchiale*¹⁵.

6. Senzorická jakost

Senzorická jakost ekologicky a konvenčně pěstované zeleniny (hlávkový salát, špenát, okurky, cibule) se ve většině případů neliší, v případě rajčat měly konvenční produkty výraznější chuť a lépe hodnocenou zralost¹⁶. Konvenčně vypěstované grapefruity byly ve srovnání s odpovídajícími bio-produkty lépe zbarvené, méně kyselé (obsahovaly méně kyseliny citronové), měly nižší obsah flavonoidu naringinu, který je určujícím faktorem hořké chuti tohoto ovoce, a byly celkově lépe přijatelné panelem konzumentů⁵.

7. Závěr

Smysl biopotravin lze spatřovat především v souvislosti s jejich produkcí v rámci ekologického zemědělství s jeho šetrným přístupem k životnímu prostředí. Výsledky studií ohledně případných rozdílů mezi biopotravinami a konvenčními potravinami v nutriční hodnotě a zdravotní nezávadnosti jsou často protichůdné. Pokud jsou zjištěny statisticky průkazné rozdíly (ve prospěch kterékoliv z porovnávaných skupin potravin), jsou tyto rozdíly při vyjádření v absolutních hodnotách daných ukazatelů tak malé, že jejich přímý dopad na lidské zdraví je v naprosté většině případů neměřitelný (výjimkou je nižší alergenní potenciál bio-mléčných produktů u dětí do dvou let věku). Snížení rizika chronických degenerativních onemocnění člověka (kardiovaskulární onemocnění, některé typy rakoviny) lze dosáhnout (v rámci správné volby celkového životního stylu, včetně dostatečné fyzické aktivity a způsobu stravování) zvýšením konzumace ovoce a zeleniny bez ohledu na jejich bio- nebo konvenční původ.

LITERATURA

1. Samman S., Chow J. W. Y., Foster M. J., Ahmad Y. I., Phuyal J. L., Petocz P.: *Food Chem.* 109, 670 (2008).
2. Bloksma J., Adriaansen-Tennekes R., Huber M., de Vijver L. P. L. V., Baars T., de Wit J.: *Biol. Agric. Horticult.* 26, 69 (2008).
3. Komprda T., Zelenka J., Fajmonová E., Bakaj P., Pechová P.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 7692 (2003).
4. Komprda T., Zelenka J., Fajmonová E., Fialová M., Kladroba D.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 6804 (2005).
5. Lester G. E., Manthey J. A., Buslig B. S.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 4474 (2007).
6. Chassy A. W., Bui L., Renaud E. N. C., Van Horn M., Mitchell A. E.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 8244 (2006).
7. Mitchell A. E., Hong Y.-J., Koh E., Barrett D. M., Bryant D. E., Denison R. F., Kaffka S.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 6154 (2007).
8. Asami D. K., Hong Y. J., Barrett D. M., Mitchell A. E.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 1237 (2003).
9. Koh E., Wimalasiri K. M. S., Renaud E. N. C., Mitchell A. E.: *J. Sci. Food Agric.* 88, 344 (2008).
10. Ghidini S., Zanardi E., Battaglia A., Varisco G., Ferretti E., Campanini G., Chizzolini R.: *Food Addit. Cont.* 22, 9 (2005).
11. Anselme M., Tangni E. K., Pussemier L., Motte J.-C., Van Hove F., Schneider Y.-J., Van Peteghem C., Larondelle Y.: *Food Addit. Contam.* 23, 910 (2006).
12. Karavoltzos S., Sakellari A., Dassenakis M., Scoullou M.: *Food Chem.* 106, 843 (2008).
13. Pussemier L., Larondelle Y., Van Peteghem C., Huyghebaert A.: *Food Control* 17, 14 (2006).
14. Plahuta P., Raspor P.: *Food Control* 18, 492 (2007).
15. Kummeling I., Thijs C., Huber M., van de Vijver L. P. L., Snijders B. E. P., Penders J., Stelma F., van Ree R., van den Brandt P. A., Dagnelie P. C.: *Brit. J. Nutr.* 99, 598 (2008).
16. Zhao X., Chambers E., Matta Z., Loughin T. M., Carey E. E.: *J. Food Sci.* 72, S87 (2007).

T. Komprda (*Department of Food Technology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Comparison of Quality and Safety of Organic and Conventional Foods**

The results of the studies comparing quality and safety of organic and conventional foods are ambiguous and often contradictory. An exception is higher contents of ascorbic acid in some organic products compared with the corresponding conventional foods. Some studies suggest a nutritionally more favourable composition of fatty acids in organic dairy products, which, however, is not a consequence of organic farming but of the diet composition. Many organic foods are more frequently contaminated with mycotoxins than conventional foods. A lower occurrence of pesticide residues in organic foods is irrelevant from the viewpoint of health effects because the intake of pesticides in conventional foods is less than 1 % of the acceptable daily dose. The differences between organic and conventional foods in the markers of nutritive value and safety, and a possible effect on human health are mostly too small to be detected. An exception is a lower eczema risk in infants after consumption of organic dairy products. Sensoric quality of organic foods is the same or lower than that of conventional foods.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

NÁSTROJE PRO DIAGNOSTIKU SPEKTROMETRU S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

DANIELA ŠVEJCAROVÁ^a
a MIROSLAV FIŠERA^b

^a Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, ^b Ústav biochemie a analýzy potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
daniela.svejcarova@email.cz, fisera@ft.utb.cz

Došlo 12.6.07, přepracováno 6.8.08, přijato 25.8.08.

Klíčová slova: diagnostika spektrometru, ICP-OES, axiální plazma

Úvod

Hlavními součástmi emisního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem jsou generátor, plazmová hlavička, dávkovací zařízení, optický systém a detektor. Každá z těchto součástí přístroje ovlivňuje analytické výsledky. Například nestabilita generátoru zhoršuje přesnost, změny podmínek ve zmlžovači ovlivňují správnost (způsobují systematickou chybu), selektivita se může postupně zhoršovat změnami v optice, např. vlivem vibrací atd. Všechny tyto procesy mohou být příčinou zhoršování dlouhodobé opakovatelnosti. Odpovídajících mezí detekce lze dosáhnout jedině tehdy, jestliže všechny části ICP systému pracují optimálně. Před vlastním měřením by měla proběhnout krátká diagnostika systému, aby bylo možné včas odhalit chybu a zabránit tak znehodnocení výsledků práce. Poussel¹ a Mermet² uvádějí několik jednoduchých měření, kterými lze otestovat jednotlivé součásti systému a odhalit možnou příčinu zhoršování výsledků. K diagnostice jsou potřeba standardní roztoky pouze tří prvků: Ba, Mg a Zn. Pro měření se využívají čáry Ba II 233 nm, Ba II 455 nm, Mg I 285 nm, Mg II 280 nm a Zn II 206 nm. Kromě nich se ještě využívá čára Ar I 404 nm a Ar kontinua. I z takto relativně malého množství měřených čar prvků lze zjistit poměrně velké množství informací.

K měření praktického rozlišení v UV oblasti se používá čára Ba II 233 nm, její fyzikální šířka je přibližně 1,5 pm, pro rozlišení ve viditelné oblasti je to čára

Ba II 455 nm (3,6 pm). Účinnost atomizace a ionizace v plazmatu se testuje poměrem intenzit čar Mg II 280 nm a Mg I 285 nm, podobně změny v excitaci se sledují poměrem intenzit čar Zn II 206 nm a Ba II 455 nm. Pokud se vzhledem k danému poměru Mg II/Mg I mění hodnota intenzity čáry Ar I 404 nm, hodnota poměru Zn II/Ba II a poměr pozadí při 400 nm a při 200 nm, tak nastávají v systému změny, které nesouvisí s přenosem energie, ale které mají příčinu v degradaci kolimačního systému. Změny v účinnosti zmlžovače lze sledovat jednoduše na změnách v intenzitě měřených čar. Pokud se nemění podmínky v plazmatu, poměr intenzity čáry Mg I 285 nm k pozadí je rovněž úměrný účinnosti zmlžovače. Stabilita a přesnost zmlžovače je testována měřením relativní směrodatné odchylky čáry Mg I 285 nm. Sledováním směrodatné odchylky signálu pozadí při 190 nm a signálu při vypnutém plazmatu se testuje úroveň šumu na detektoru. Iontové čáry Ba II 233 nm a Zn II 206 nm slouží k porovnávání detekčních limitů různých ICP systémů. Dlouhodobá stabilita systému (vyhodnocovaná na základě driftu, tj. pomalé časové změny signálu) se sleduje pomocí čar Ar I 404 nm (změny v intenzitě), Zn II 206 nm (přenos energie na vzorek) a Ba II 455 nm (drift zmlžovacího systému). Přehled všech testovaných parametrů je uveden v tab. I.

Výběr výše uvedených prvků a čar pro diagnostiku vyplývá především z hodnot excitační a ionizační energie (a jejich součtu) u těchto atomových a iontových čar (tab. II). Například je využito velkého rozdílu mezi ionizačními energiemi čar Zn II 206 nm (9,39 eV) a Ba II 455 nm (5,21 eV) při diagnostice účinnosti přenosu energie z plazmatu na vzorek.

Experimentální část

Instrumentace

Měření probíhalo na optickém emisním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) firmy Thermo Jarrell Ash, model IRIS/AP (s axiálním pozorováním plazmatu), vybaveném detektorem na principu přenosu náboje – charge injection device (CID). Parametry přístroje jsou uvedeny v tabulce III.

Výběr prvků, čar a řádu spektra

Testovací prvky i vlnové délky byly dány výše uvedenou metodikou (tab. III), ale protože byl ICP systém vybaven plošným CID detektorem, bylo nejprve nutné u jednotlivých čar prvků vybrat vhodný řád spektra a také zvolit vhodnou koncentraci jednotlivých prvků pro další testování. Proto bylo potřeba nejprve nasnímat celé spektrum

Tabulka I
Testovací ukazatele pro diagnostiku ICP spektrometru

Testovací ukazatel ^{a, b, c, d}	Sledovaná vlastnost	Testovaná část systému
Ba II 233 nm – profil čáry	rozlišení v UV oblasti	disperzní systém
Ba II 455 nm – profil čáry	rozlišení ve VIS oblasti	disperzní systém
poměr Mg II 280/Mg I 285	atomizace a ionizace	generátor
poměr Zn II 206/Ba II 233	excitace	generátor
Ar I 404 nm	ztráty absorpce	kolimátor
BKGD 400 nm/200 nm	degradace čoček a zrcadel	kolimátor
BKGD 235 nm/236 nm	degradace optických vláken	kolimátor
SBR Mg I 285 nm	účinnost zmlžovače	zmlž. a transportní systém
Intenzita všech čar	účinnost zmlžovače	zmlž. a transportní systém
RSD Mg I 285 nm	přesnost zmlžovače	zmlž. a transportní systém
SD BKGD 190 nm	šum pozadí	detekční systém
SD signálu (vypnuté plazma)	šum detektoru	detekční systém
Ba II 233 nm	mez detekce	ICP systém jako celek
Zn II 206 nm	mez detekce	ICP systém jako celek
RSD Ar I 404 nm	drift	stabilita systému
RSD Zn II 206 nm	drift	stabilita systému
RSD Ba II 455 nm	drift	stabilita systému

^a BKGD – pozadí, ^b SBR – poměr intenzit signál/pozadí, ^c RSD – relativní směrodatná odchylka, ^d SD – směrodatná odchylka

Tabulka II
Excitační (E_{exc}), ionizační (E_{ion}) a celkové (E_{sum}) energie pro čáry použité v diagnostice plazmatu

Čára ve spektru	E_{exc} [eV]	E_{ion} [eV]	E_{sum} [eV]
Ar I 404 nm	14,69	–	–
Ba II 455 nm	2,72	5,21	7,93
Ba II 233 nm	6,01	5,21	11,22
Mg I 285 nm	4,35	–	–
Mg II 280 nm	4,42	7,65	12,07
Zn II 206 nm	6,01	9,39	15,40

a lokalizovat příslušné čáry. Pro lokalizaci čar byl připraven roztok Ba, Mg a Zn o koncentraci 1 ppm každého prvku, spektrum bylo snímáno po dobu 10 s. Podle intenzit byly ze spektra vybrány vhodné řády čar (tab. IV).

Ukázalo se ale, že zvolené čáry jsou velice intenzivní (zvláště čára Mg II 280), a tak bylo nutné pro další experimenty upravit koncentraci testovacího roztoku. Koncentrace byla z původní hodnoty 1 ppm snížena až na 0,1 ppm každého prvku, čas načítání signálu byl snížen na 1 s.

Časové rozvržení experimentů

Záměrem bylo sledovat změny v charakteristikách jednotlivých částí ICP spektrometru během delší doby

a bylo proto zvoleno časové rozmezí jednoho měsíce. Po skončení experimentu (stanoviště I) bylo o několik měsíců později provedeno ještě opakované měření stejných parametrů po zprovoznění přístroje v nové laboratoři (stanoviště II). Cílem bylo zjistit, jak stěhování ovlivní přesnost, opakovatelnost a dlouhodobou stabilitu přístroje.

Experimenty měly následující časové rozvržení: 4× týdně měření profilů čar Ba II 233 a Ba II 455, poměrů intenzit čar Mg II/Mg I a Zn II/Ba II, SBR Mg I a RSD Mg I, 2× týdně měření intenzity Ar I 404, poměru BKGD 400/BKGD 200, směrodatné odchylky pozadí při 190 nm a směrodatné odchylky signálu při vypnutém plazmatu a 1× za celé období měření mezi detekce (Ba II 233 a Zn II 206) a měření dlouhodobého driftu.

Výsledky a diskuse

Disperzní systém

Výsledky měření profilů čar v UV a viditelné oblasti jsou znázorněny na obr. 1 a obr. 2. Zajímavé je, že hodnoty profilů čáry Ba II 455 (tedy ukazatel pro viditelnou oblast) se po přestěhování na stanoviště II výrazně stabilizovaly.

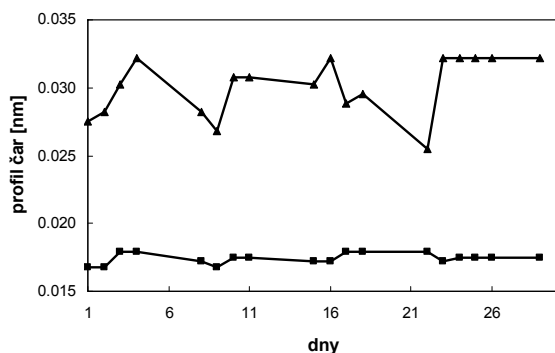
V tab. V jsou shrnuty výsledky z obou předcházejících grafů: z naměřených dat byl vypočten aritmetický průměr (celkem 18 měření v obou případech) a stanovena

Tabulka III

Parametry přístroje IRIS/AP (Thermo Jarrel Ash) použitého pro diagnostické testy

Parametr	Hodnota
Transport vzorku do zmlžovače	peristaltické čerpadlo, průtok 1,8–2,4 ml min ⁻¹
Zmlžovač	stopový Burgnerův zmlžovač podle Babingtona
Tlak ve zmlžovači	2·10 ⁵ Pa
Mlžná komora	cyklónová
Plazmová hlavice	uspořádání TraceTech Axial Plasma (argonové indukčně vázané plazma v axiálním provedení)
Příkon do plazmatu	550–1 350 W
Frekvence generátoru	27,12 MHz
Spotřeba argonu	16–18 ml min ⁻¹
Typ optiky	echelle polychromátor prostor optiky temperován na 37 °C a vyplněn argonem
Difrakční prvek	mřížka echelle (54,5 vrypů/mm)
Ohnisková vzdálenost	0,381 m
Vstupní štěrbin	50 μm
Rozlišení	< 10 pm při 200 nm < 20 pm při 400 nm < 40 pm při 600 nm
Detektor	dvourozměrný polovodičový detektor typu CID, rozměr aktivní plochy čipu 14 × 14 mm, 512 × 512 (tj. 262 144) fotocitlivých míst (každé o rozměru 25 × 25 μm, pracovní teplota –80 °C)
Rozsah vlnových délek	simultánní registrace celého spektra v rozsahu 170–900 nm, simultánní měření pozadí, kompenzace matrice
Kalibrace vlnové délky	rtuťová výbojka
Program pro měření a zpracování dat	ThermoSPEC/CID

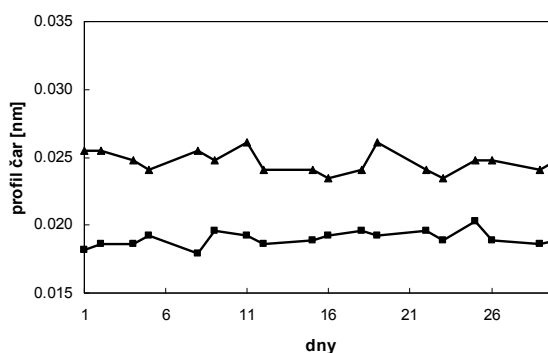
směrodatná odchylka. Zatímco v případě čáry Ba II 233 nedošlo k žádné výrazné změně (rozdíl v profilu čáry 0,0016 nm, rozdíl ve směrodatné odchylce 0,0002 nm), tak u čáry Ba II 455 došlo k mírnému zúžení čáry (o 0,0054 nm) a také ke zlepšení směrodatné odchylky (o 0,0014 nm).



Obr. 1. Disperzní systém (rozlišení v UV a VIS oblasti – stanoviště I); profily čar Ba II 233 ■ a Ba II 455 ▲

Generátor

Zatímco z výsledků předchozí části experimentu vyplývá, že stěhování přístroje nemělo žádný negativní vliv na disperzní systém, u generátoru došlo ke zcela výraznému zhoršení. Zahájení experimentů v nové laboratoři mu-



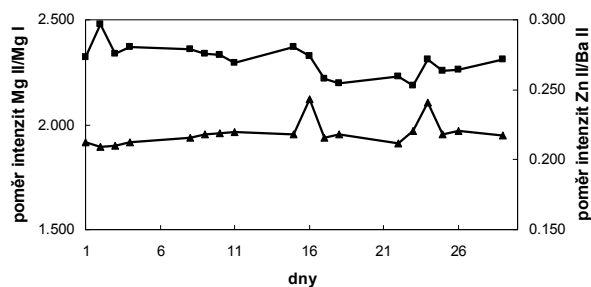
Obr. 2. Disperzní systém (rozlišení v UV a VIS oblasti – stanoviště II); profily čar Ba II 233 ■ a Ba II 455 ▲

Tabulka IV
Vybrané řady spektra prvků Ba, Mg a Zn pro diagnostiku ICP

Diagnostická čára	Vlnová délka {řád spektra}
Ba II 233	233,527 {111}
Ba II 455	455,403 {57}
Mg II 280	280,270 {93}
Mg I 285	285,213 {91}
Zn II 206	206,200 {126}

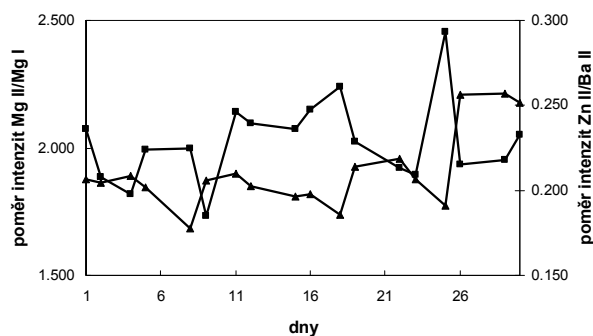
Tabulka V
Profily čar v UV a VIS oblasti – aritmetický průměr a směrodatná odchylka všech měření ($n = 18$)

Čára / Oblast	Profil čáry stanoviště I [nm]	Profil čáry stanoviště II [nm]
Ba II 233 / UV oblast	$0,0174 \pm 0,0004$	$0,0190 \pm 0,0006$
Ba II 455 / VIS oblast	$0,0301 \pm 0,0022$	$0,0247 \pm 0,0008$



Obr. 3. **Generátor** (atomizace/ionizace a excitace v plazmatu) **stanoviště I - stabilita výkonu generátoru**; na hlavní ose y je poměr intenzit Mg II/Mg I ■, na vedlejší ose y poměr intenzit Zn II/Ba II ▲

selo být delší čas odkládáno, protože se vyskytly problémy se stabilitou plazmatu (plazma nešlo zažehnout a často zhasínalo). Problémy s nestabilitou generátoru dokumentují i následující obrázky – poměry čar Mg II/Mg I i Zn II/Ba II byly na stanovišti I (obr. 3) poměrně stabilní, zatímco při experimentech na stanovišti II byly odchylky velké (obr. 4). Například 25. den vidíme na grafu prudké zvýšení poměru intenzit Mg II/Mg I. Týž den nastaly problémy s generátorem: plazma nejprve dlouho nešlo zažehnout, pak po zážehu zhaslo a po opětovném nastartování bylo i nadále nestabilní. Čáry prvků byly posunuté a musely být znovu lokalizovány. Problém se zhášením plazmatu nastal i 29. den měření, ale po opětovném nastartování bylo plazma již stabilní (naměřené hodnoty z toho dne potvrzují stabilitu generátoru).

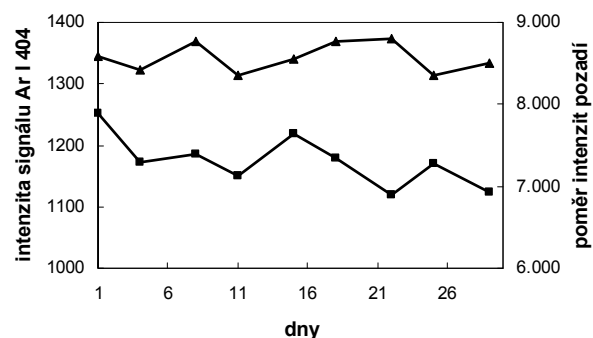


Obr. 4. **Generátor** (atomizace/ionizace a excitace v plazmatu) **stanoviště II - stabilita výkonu generátoru**; na hlavní ose y je poměr intenzit Mg II/Mg I ■, na vedlejší ose y poměr intenzit Zn II/Ba II ▲

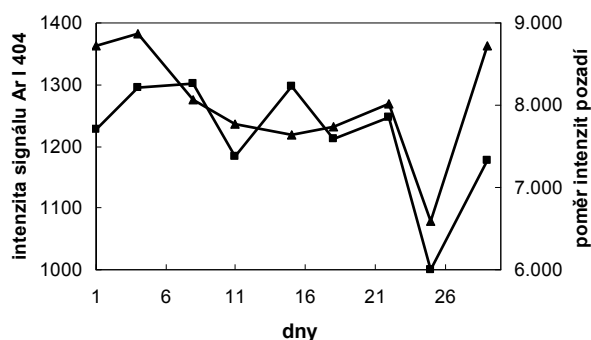
Pro diagnostiku generátoru ICP systému lze používat poměr čar Mg II/Mg I jen u konkrétního uspořádání detektoru (fotonásobič nebo polovodičové detektory) a nelze navzájem porovnávat poměry těchto čar pro různé detektory. Souvisí to s úrovní pozadí, která je u fotonásobiče zjišťována z jednoho měřicího prvku, kdežto u polovodičových detektorů založených na přenosu náboje je velké množství (zde celkem 262 144) fotocitlivých míst (tzv. pixelů), které tvoří samostatné obvody s různou hladinou šumu podle spektrální oblasti, ve které se nacházejí.

Kolimační systém

Danému poměru intenzit Mg II/Mg I z předcházejícího měření by měly odpovídat určité intenzity čáry Ar I 404 a poměry intenzit na pozadí ve viditelné a v ultrafialové oblasti. Pokud tedy poměr Mg II/Mg I zůstává přibližně stejný, ale intenzita Ar I 404 výrazně poklesne, jde o vliv absorpce světla na částicích, které



Obr. 5. **Změny na kolimačním systému** (ztráty absorpce, degradace čoček a zrcadel) **stanoviště I**; na hlavní ose y intenzita čáry Ar I 404 ■, na vedlejší ose y poměr pozadí při 400 a při 200 nm ▲



Obr. 6. Změny na kolimačním systému (ztráty absorpcí, degradace čoček a zrcadel) stanoviště II; na hlavní ose y intenzita čáry Ar I 404 ■, na vedlejší ose y poměr pozadí při 400 a při 200 nm ▲

zanášejí kolimátor. Usazování prachu na optických prvcích ovlivňuje více absorpci v UV oblasti, proto byl sledován i poměr intenzity na pozadí při 400 a při 200 nm.

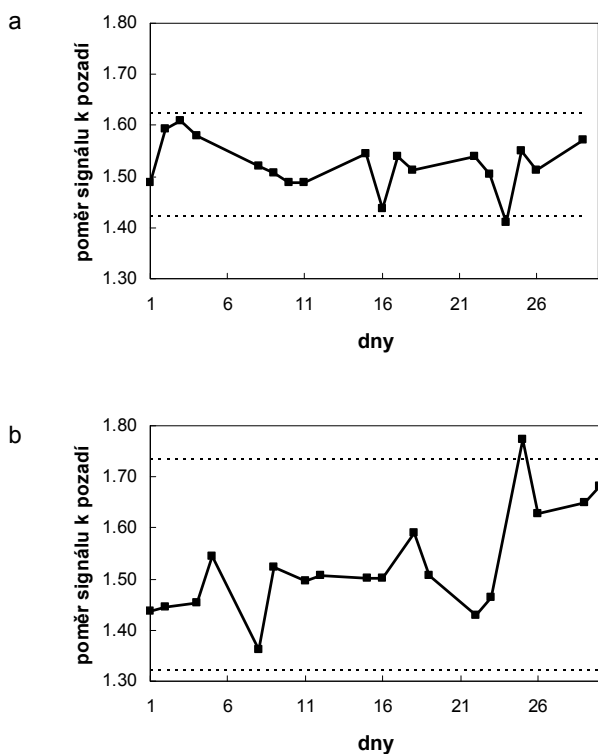
Na stanovišti I se zřejmě neusazoval prach na optickém systému, protože tendence mírného poklesu Ar I 404

odpovídá tendenci poklesu Mg II/Mg I. Na obrázku ze stanoviště II (obr. 6) je vidět prudký pokles v 25. dni měření, ale ten odpovídá poklesu energie generátoru z předchozího experimentu.

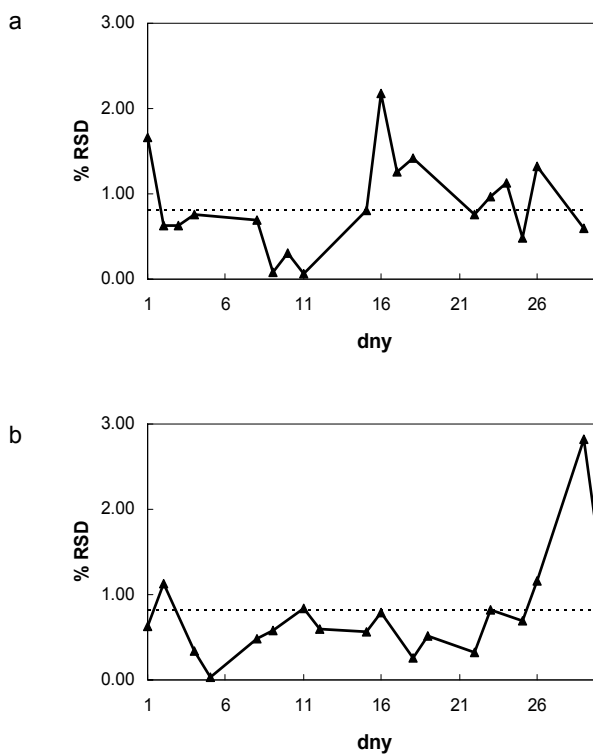
Zmlžovací systém

Účinnost zmlžovače byla sledována ukazatelem SBR (poměru signálu k šumu) u čáry Mg I 285 (obr. 7). Na stanovišti I byl poměr signál/šum poměrně stabilní ($1,52 \pm 0,05$ jednotek), zatímco na stanovišti II mají hodnoty dvakrát větší rozptyl ($1,53 \pm 0,10$ jednotek). Na obrázku jsou vyznačeny čárkovanou čarou meze v hodnotách dvojnásobku směrodatné odchylky. Na zvýšení rozptylu hodnot na stanovišti II má určité podíl nestabilita generátoru. Pokud by se tento test prováděl až po úplné stabilizaci systému, lze předpokládat dosažení lepších výsledků.

Přesnost zmlžovače byla diagnostikována pomocí RSD (relativní směrodatná odchylka v procentech) čáry Mg I 285 (obr. 8). Tady je naopak vidět výrazné zlepšení u série měření ze stanoviště II – téměř všechna stanovení intenzity čáry Mg I 285 mají RSD pod hranici 0,8 %, což lze přičíst generální údržbě přístroje po instalaci v nové laboratoři. Pouze 29. den byla zaznamenána velká odchyl-



Obr. 7. Změny v účinnosti zmlžovače vyjádřené jako časová závislost SBR (signal to background ratio – poměr signálu k pozadí) čáry Mg I 285 (čárkovaně jsou vyznačeny meze $\pm 2\sigma$); a) výsledky ze stanoviště I, b) výsledky ze stanoviště II



Obr. 8. Relativní směrodatná odchylka (% RSD, $n = 3$) intenzity čáry Mg I 285 jako funkce času (čárkovaně vyznačena hranice 0,8 % RSD); a) výsledky ze stanoviště I, b) výsledky ze stanoviště II

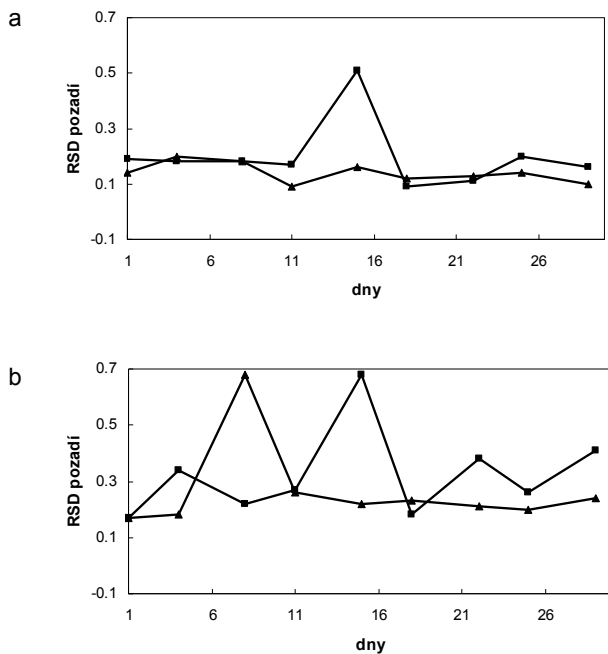
ka. Týž den se před měřením měnila argonová tlaková láhev a nastaly určité problémy s nastavením průtoku argonu. Tlak argonu zřejmě kolísal, plazma též zhasínalo, a to zřejmě ovlivnilo i činnost zmlžovače.

Detektor

Diagnostika detektoru (fluktuační, šum) probíhala měřením směrodatné odchylky (SD) intenzity signálu pozadí v UV oblasti při vlnové délce 190 nm (pro tyto účely byla zvolena čára Sn 189,989 {136}), do plazmatu byl nasáván pouze vzduch. Intenzita byla změřena 10× za sebou nejprve při zapnutém plazmatu (šum pozadí) a pak 10× po zhasnutí plazmatu (šum detektoru). Maximální směrodatná odchylka pozadí u obou měření byla na stanovišti I 0,20 (s výjimkou 15. dne). Na stanovišti II se odchylka výrazně zhoršila (viz obr. 9).

ICP systém jako celek

Tento test spočívá ve sledování detekčních limitů s použitím dvou čar, jejichž vlnová délka je ve stejné oblasti (kolem 230 nm) a které mají rozdílnou sumu ionizační a excitační energie – v tomto případě je to Ba II 233 (11,22 eV) a Zn II 206 (15,40 eV). Protože suma energií je u čáry Zn mnohem větší, jsou změny detekčního limitu mnohem více závislé na změnách podmínek v plazmatu.



Obr. 9. Diagnostika detektoru: závislost směrodatné odchylky pozadí při zapnutém (■) a vypnutém plazmatu (▲); porovnáni výsledků ze stanoviště I a II

Tabulka VI

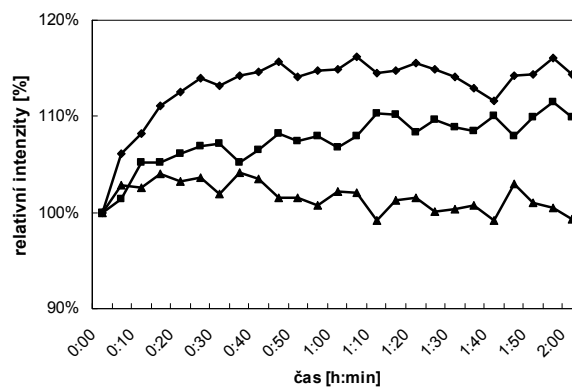
Zhoršení detekčních limitů u ICP spektrometru IRIS/AP po přestěhování

LOD [ppb]	Ba II 233	Zn II 206
Stanoviště I	7,1	9,2
Stanoviště II	12,3	21,4

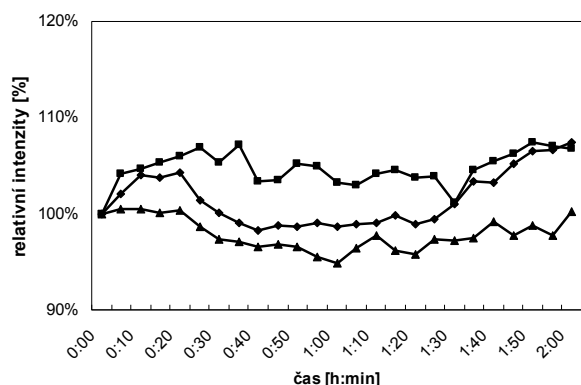
V tab. VI je vidět výsledek takového porovnání u testu provedeného na konci měsíčního testovacího období (před stěhování přístroje) a na začátku druhého období po přestěhování. Detekční limit byl vypočten jako trojnásobek směrodatné odchylky pozadí (nulový kalibrační roztok – blank – deionizovaná voda, 11 měření) lomeno směrnice kalibrační přímky pro danou čáru (dvoubodová kalibrace byla provedena stejným roztokem jako u všech předchozích experimentů s 0,1 ppm každého prvku). Z výsledků je vidět, že detekční limit se dramaticky zhoršil – u čáry Ba se zvýšil téměř dvojnásobně a u čáry Zn více než dvojnásobně.

Stabilita (drift)

Posledním experimentem bylo sledování stability intenzit vybraných čar (Ar I 404, Ba II 455 a Zn II 206) po delší dobu, tj. v rozmezí několika hodin (tzv. drift). Krátkodobá opakovatelnost (RSD) se v předchozích měřeních pohybovala v rozsahu 0,1–0,5 % u čáry Ba II 455 a v rozsahu 1,3–3,7 % u čáry Zn II 206. Úkolem bylo zjistit, jaká je dlouhodobá opakovatelnost. Měření proto probíhalo po dobu 2 h, intenzity čar byly zaznamenávány každých 5 min, čas nula byl 5 min po zážehu plazmatu. Na obr. 10 a obr. 11 jsou časové záznamy intenzit jednotlivých čar a také relativních intenzit (intenzita vztahena k hodnotě v čase nula).



Obr. 10. Drift – časová závislost relativních intenzit vybraných čar (stanoviště I); Ar I 404 (■), Ba II 455 (▲) a Zn II 206 (◆)



Obr. 11. Drift – časová závislost relativních intenzit vybraných čar (stanoviště II); Ar I 404 (■), Ba II 455 (▲) a Zn II 206 (◆)

Z obr. 10 je vidět, že u všech tří čar prudce narůstá v prvních 25–30 min jejich intenzita. V této době se zřejmě stabilizuje plazma – indukční cívka se zahřívá a mění tvar, zvyšuje se přenos energie na vzorek. Po uvedených 30 min se stabilizuje intenzita u Zn, u Ar zůstává mírný nárůst (způsobený zřejmě driftem optiky nebo detekčního systému), naopak u Ba klesá (způsobeno patrně driftem zmlžovacího systému). Pokud intenzity vyneseme do grafu v relativních hodnotách (vztahených na hodnoty v čase nula), všechny body se pohybují v rozmezí 99–116 % původní intenzity.

Test driftu na stanovišti II (obr. 11) vypadá ovšem zcela odlišně: počáteční nárůst intenzity způsobený stabilizací plazmatu trvá kratší dobu, jen asi 15–20 min. Poté intenzita u všech tří prvků výrazně klesá. U Ar a Zn se dokonce na 50 min dočasně stabilizuje, ale pak začínají hodnoty opět narůstat. Zřejmě zde jde o kombinaci více vlivů (kolísání průtoku argonu, drift ve zmlžovači a v optice atd.). Celkově však je rozptyl hodnot nižší, než v prvním testu, u Ar a Zn, kde se RSD mírně zlepšilo (tab. VII). Křivky relativních intenzit jsou oproti prvnímu testu posunuty směrem dolů a pohybují se v rozmezí 95 až 107 % původní intenzity.

Tabulka VII

Dlouhodobá opakovatelnost měření vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka v procentech ze všech 25 hodnot naměřených po dobu dvouhodinového testu

RSD [%]	Ar I 404	Ba II 455	Zn II 206
Stanoviště I	2,5	1,5	3,2
Stanoviště II	1,7	1,7	2,9

Z výsledků je tedy zřejmé, že u čáry Ba II 455 je dlouhodobá opakovatelnost přibližně třikrát horší než krátkodobá. Toto zhoršení opakovatelnosti nelze podstatně snížit tím, že se měření zahájí až po stabilizaci plazmatu. Čára Zn II 206 je na změny podmínek v plazmatu mnohem citlivější (jak bylo uvedeno už u testu detekčních limitů), a je tedy pro přesná měření na čarách tohoto typu nutné dodržet určitý časový odstup po zážehu plazmatu.

Závěr

Důležitým aspektem použití každé instrumentální techniky je určení výkonnosti systému. Pravidelným použitím diagnostických nástrojů před vlastním měřením lze ověřit, zda následně získané výsledky budou správné a přesné, nebo i předejít případným vážnějším poruchám přístroje. Oblast výzkumu testovacích a diagnostických nástrojů pro ověření výkonnosti instrumentace je velmi aktuální, snahou výrobců je nyní zavádět tyto nástroje přímo do programového vybavení přístroje a umožnit tak uživateli průběžný přehled o stavu přístroje. Kontrola výkonnosti byla zvláště důležitá právě při stěhování přístroje na nové pracoviště, neboť byl použit přístroj s detekcí CID (první aplikace použita v ČR), přičemž bylo nutné zjistit, jak ovlivní jednotlivé parametry výkonnost přístroje a v jakých mezích se pohybují, při správném fungování přístroje.

LITERATURA

1. Poussel E., Mermet J. M., Samuel O.: *Spectrochim. Acta, Part B* 48, 743 (1993).
2. Mermet J. M.: *Anal. Chim. Acta* 250, 85 (1991).

D. Švejcarová^a and M. Fišera^b (^a*Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology,* ^b*Department of Food Biochemistry and Analysis, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Czech Republic*): **Tools for Diagnostics of Inductively Coupled Plasma Spectrometers**

This review deals with the diagnostics of inductively coupled plasma – optical emission spectrometers (ICP-OES). Based on several simple measurements, the performance, precision and reliability of all parts of the instrument (generator, nebulizer, optical parts, detector) and stability of the whole system were tested. The tests were performed within one month and repeated after some time. The two test series were compared and the influence of instrument handling on the analytical results was discussed.

POROVNÁNÍ ZPŮSOBŮ PŘÍPRAVY OXIDICKÝCH VZORKŮ TAVENÍM PRO ANALÝZU METODOU RENTGENOVÉ FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE

ŠÁRKA VINKLEROVÁ

*Spektrometrická laboratoř, Hutní a chemické laboratoře,
ArcelorMittal Ostrava a.s., Česká republika
Sarka.Vinklerova@arcelormittal.com*

Došlo 1.10.07, přepracováno 31.3.08, přijato 17.4.08.

Klíčová slova : rentgenová fluorescenční spektrometrie,
příprava vzorků, tavené vzorky

Úvod

V chemických laboratořích nyní existuje mnoho přístrojů pro rychlou analýzu různých materiálů a rentgenový fluorescenční spektrometr je jedním z nejdůležitějších. Mezi nesporné výhody rentgenové spektrometrie¹ patří možnost stanovení složek v obsazích od několika ppm do desítek procent v nejrůznějších matricích. Nevýhodou oproti jiným analytickým metodám je řešení problémů při stanovení lehkých prvků. Oxidické materiály je možné převážně analyzovat ve formě tablet (lisované) nebo tzv. perly (tavené)². Tavení s boritany alkalických kovů v PtAu kelímcích je efektivní metoda rozložení matrice vzorku na reprodukovatelnou formu tuhého roztoku. Používá se tzv. „jednofázové“ tavení nebo „dvoufázové“ tavení.

Cílem této práce bylo porovnání uvedených metod přípravy vzorků a výsledků analýz vzorků připravených oběma metodami, vzhledem k zavádění nové metodiky přípravy vzorků v provozní laboratoři. V nově vydaných ISO normách se uvádí jako doporučená metoda k přípravě vzorků pro rentgenovou fluorescenční analýzu (RFA) odlévání perel. Metoda jednofázového tavení, která byla pro svou jednoduchost a rychlost dosud používána, byla porovnána s postupem dvoufázové přípravy vzorků podle normy³. Pro ověření výsledků analýz vzorků připravených oběma metodami byly použity certifikované referenční materiály (CRM) na bázi oxidů křemíku a hliníku.

Experimentální část

Příprava vzorků

Nejrozšířenější jsou dnes v praxi metody přípravy vzorků pro RFA analýzy lisováním, tavením, převedením

vzorku do roztoku – oxidické materiály. Cílem přípravy vzorku k analýze je získat homogenní vzorek o vhodné velikosti a mechanických vlastnostech (pevnost, odolnost proti otěru, stálost ve vakuu) a také potlačit vlivy rušící RFA analýzu – velikost částic, mineralogické složení a mezivprvkové ovlivnění.

Nejrozšířenější metodou přípravy oxidických materiálů pro RFA analýzu je tavení. Analytický vzorek se promíchá s vhodným tavidlem, popř. s oxidovadlem, roztaví se v muflové nebo vysokofrekvenční peci (VF) a nechá se v PtAu kelímku⁴ pod víčkem vychladnout. Výsledkem tohoto tzv. jednofázového tavení je skleněná – tzv. „perla“. Vzorek se převede do tuhého roztoku, čímž se zároveň homogenizuje. Běžně se používají teploty tavení 1200±50 °C, pro některé materiály na SiO₂ bázi stačí k vytavení vzorku teploty 1100±50 °C. Po vytavení vzorku s eutektickou směsí se přidá k tavenině 0,07±0,02 g I₂O₅ a kelímek se přiklopí víčkem. Tím se zvyšuje povrchové napětí taveniny, snižuje se smáčivost stěn kelímku taveninou a také se zamezuje praskání perel. Nepominutelnou výhodou je pouze malé množství vzorku (0,50–1,00 g), potřebné k přípravě taveného vzorku.

Při dvoufázovém tavení se vzorek s tavidlem navází do tavicího kelímku, směs se promíchá a vytaví se pod PtAu víčkem na VF peci 3–15 min při 1200 °C. Na pomocné VF peci se mezitím nahřeje PtAu odlévací miska. Podobně se postupuje při použití muflové pece k tavení vzorků. Z kelímku se sejme víčko a tavenina se po přidání 0,07±0,02 g I₂O₅ přelije do misky. Tavenina na misce se ochladí proudem vzduchu.

Jednou z možností je použití tavicí směsi metaboritanu (33,5 %) a tetraboritanu lithného (66,5 %) jako tavidla. Tato eutektická směs je použitelná k přípravě téměř všech oxidických materiálů. Při tavení dochází ke konstantnímu úbytku tavicí směsi, tzn. že je ve všech připravených vzorcích stejný. Pro přípravu tavených vzorků by poměr tavidla ku vzorku měl být zvolen tak, aby všechny prvky přítomné v analyzovaných materiálech mohly být homogenně převedeny tavením do boritanového tuhého roztoku a přesnost stanovení měřených stopových koncentrací prvků byla přijatelná⁵. Připravené perly nesmí mít na měřené ploše žádná vadná místa a hmotnostní podíl tavidla ku vzorku musí být pro analyzovanou materiálovou skupinu stejný.

Některé materiály se rozpouštějí v tavenině hůře. Nerozpuštěné „vměstky“ vzorku působí jako zárodek krystalizace a mohou způsobit prasknutí perly, nehledě k tomu, že taková analýza je zkreslená a výsledky nejsou správné.

Přístrojové vybavení

V hutních laboratořích se vysušené oxidické materiály připravují drcením a mletím na vibračních mlýnech.

Analýzy byly prováděny simultánně sekvenčním vlnově disperzním rentgenovým fluorescenčním spektrometrem ARL 9800XP (Thermo Fisher Scientific). Přístroj je vybaven rentgenovou lampou s Rh anodou, 16 monochromátory (součástí spektrometru pro analýzu jednotlivých

prvků simultánně) – Si, Mg, Al, Ca, Fe, Ti, Ni, Cu, K, Mn, P, S, Zn, Na, Cr, Pb a sekvenčním zařízením (tzv. goniometr), které umožňuje analyzovat další prvky pomocí výběru vhodných úhlů $\theta/2\theta$ (odpovídajícímu zvolené analytické čáře daného prvku – např. série $K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$, $L\beta$, atd.) na různých dovolených kombinacích krystal/detektor. Podmínky na RTG lampě máme pro většinu běžných analytických programů nastaveny na 40 kV, 70 mA.

Porovnání analýz vzorků z jednofázového tavení a odlévání na misku

Jednofázové tavení vzorků je využíváno hlavně z důvodu úspory času a energie pro přípravu běžných vzorků železných rud, dolomitů, vápenců, strusek, aglomerátů, šamotů, licích prášků, apod. Pro analýzy materiálů metodou rentgenové fluorescenční spektrometrie existuje zatím málo ISO a ČSN norem³. V této práci jsou porovnány výsledky analýzy CRM šamotů, připravených metodami jednofázového tavení (poměr vzorku a tavidla = 1:14) a odlévání na PtAu misku o průměru 4 cm (poměr vzorku a tavidla = 1:10 nebo 1:14). Navážka tavidla byla stanovena tak, aby odlévací miska byla taveninou zaplněna: 7,0000 g, resp. 7,7000 g, navážka vzorku byla 0,7000 g, resp. 0,5500 g, s přesností $\pm 0,0005$ g. Vzorky byly připraveny dvojmo a byly taveny na tavicí peci s vysokofrekvenčním ohřevem, při kterém kelímek se vzorkem a tavidlem tvoří jádro indukční cívky. K přípravě vzorků tavením byly používány upravené tavicí pece, vybavené cejchovaným pyrometrem (pro měření teploty taveniny). Pro tavení byly použity kelímky ze slitiny platiny (95 %) a zlata (5 %). Stejného složení bylo také víčko a odlévací

miska se zesíleným dnem (3 mm). Zesílené dno zabraňuje tepelné deformaci misky (miska byla použita pro odlití cca 50 vzorků bez deformace) a odlité perly mají rovný povrch. Kelímky se po vytavení vzorku vyvařovaly v 10% H_2SO_4 (vyčistily se od zbytků taveniny), byly dobře opláchnuty vodou a znovu se před dalším použitím vyžíhaly. Kelímky se leštily (přibližně po 50 taveních), aby stěny byly hladké a bylo možné taveninu jednoduše vylít z kelímku.

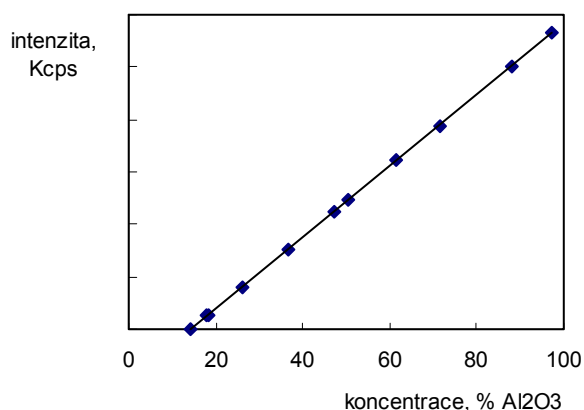
Bylo provedeno porovnání přípravy CRM vzorků šamotů metodou jednofázového tavení a odlévání na misku. Poměr tavidla a vzorku byl zachován 14:1 v obou metodách. Vzorky šamotů byly analyzovány z horní strany připravených perel po dobu 60 s na monochromátorech jednotlivých prvků. Do výsledkového souboru pro výpočet multivariabilní regrese byly uloženy měření intenzit následujících prvků: Si, Al, K, Fe, Ti, P, K, Ca, Mn, Mg. K výpočtu kalibračních křivek za použití CRM šamotů byl použit program multivariabilní regrese (MVR) a matematický model podle Lucas-Tootha:

$$C_i = (a_0 + a_1 \cdot I_i + a_2 \cdot I_i^2) \cdot \left(1 + \sum_{j=1}^n (\alpha_j \cdot I_j) \right)$$

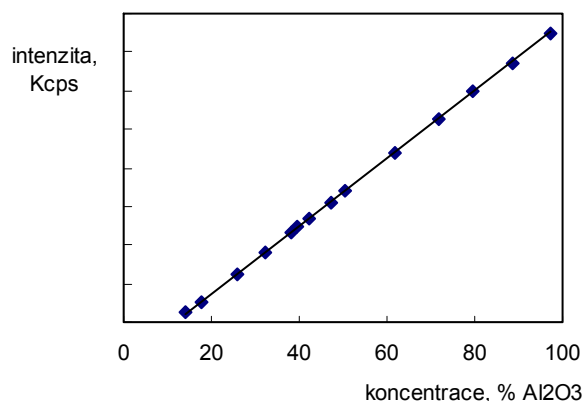
kde jsou a_0 , a_1 , a_2 koeficienty polynomu kalibrační křivky, C_i koncentrace stanovovaného prvku i , $I_{i(j)}$ intenzita stanovovaného prvku i (nebo ovlivňujícího prvku j), α_j korekční koeficient na absorpci hmotou ovlivňujícího prvku na stanovaný prvek.

Pro výpočet kalibračních křivek byly použity CRM a sekundární referenční standardy žáruvzdorných materiálů s koncentračním rozmezím hlavních složek 1,2 – 83 %

a



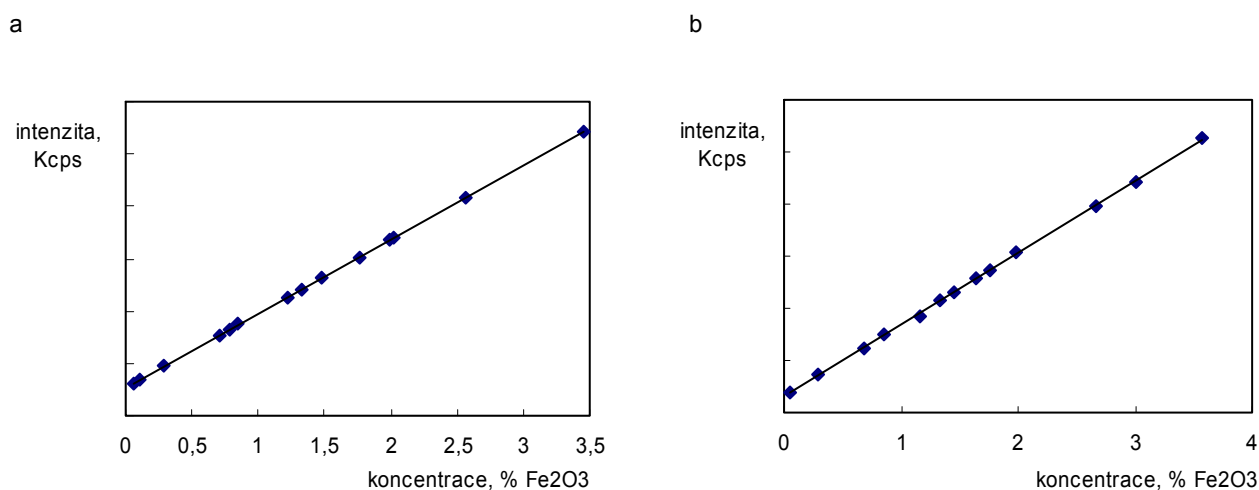
b



Obr. 1. Porovnání kalibračních závislostí pro Al_2O_3 ; a) vzorky tavené jednofázově, b) odlévané na misku

Koeficienty kalibrační křivky:

a_0	a_1	a_2	
0,09694	1,10367	$4,23163 \cdot 10^{-4}$	jednofázově připravené vzorky
-0,40229	2,61924	$-3,92157 \cdot 10^{-3}$	vzorky odlévané na misku



Obr. 2. Porovnání kalibračních závislostí pro Fe_2O_3 ; a) vzorky tavené jednofázově, b) odlévané na misku

Koeficienty kalibrační křivky

a_0	a_1	a_2	
-0,19209	0,03441	–	jednofázově připravené vzorky
-0,23445	0,32103	$3,35782 \cdot 10^{-3}$	vzorky odlévané na misku

Tabulka I

Reprodukovatelnost měření vzorků šamotů

Standard	Parametr ^{a,b}	% SiO_2	% Al_2O_3	% Fe_2O_3	% TiO_2	% K_2O	
CRM 139	<i>certifikováno</i>	82,41	13,8	0,84	0,53	0,51	
	jednofázové tavení	průměr	82,56	14,11	0,82	0,50	0,52
		SD	0,039	0,031	0,003	0,01	0,002
		RSD (%)	0,05	0,22	0,37	2,08	0,33
	odlévané perly	průměr	82,15	14,03	0,81	0,50	0,48
		SD	0,031	0,037	0,001	0,002	0,001
RSD (%)		0,04	0,27	0,13	0,34	0,29	
CRM 8 - 1 - 02	<i>certifikováno</i>	53,33	39,89	2,70	1,73	0,69 ^c	
	jednofázové tavení	průměr	53,45	39,78	2,71	1,76	0,70
		SD	0,03	0,03	0,005	0,012	0,016
		RSD (%)	0,05	0,08	0,17	0,70	0,23
	odlévané perly	průměr	53,58	40,09	2,69	1,73	0,67
		SD	0,016	0,047	0,002	0,004	0,002
RSD (%)		0,03	0,12	0,09	0,20	0,31	
CAS 10-Alumina refractory	<i>certifikováno</i>	1,26	97,7	0,06	< 0,01	0,08	
	jednofázové tavení	průměr	1,23	97,44	0,07	0,02	0,10
		SD	0,005	0,07	0,002	0,002	0,008
		RSD (%)	0,40	0,07	2,98	12,33	0,82
	odlévané perly	průměr	1,23	97,56	0,068		0,08
		SD	0,006	0,089	0,001		0,001
RSD (%)		0,49	0,09	0,97		0,75	

^a SD – směrodatná odchylka, ^b RSD – relativní směrodatná odchylka, ^c analýza je pouze informativní

Tabulka II
Reprodukovatelnost přípravy vzorku CRM šamotu – odlévané vzorky

CRM 8-1-03	% SiO ₂	% Al ₂ O ₃	% CaO	% Fe ₂ O ₃	% TiO ₂	% K ₂ O
Certifikováno	47,41	47,26	–	1,97	0,86	0,59
Průměr, %	47,684	47,257	0,315	1,970	0,859	0,580
SD, % ^a	0,162	0,123	0,002	0,022	0,002	0,005
RSD, % ^b	0,340	0,260	0,675	1,117	0,239	0,932

^a SD – směrodatná odchylka, ^b RSD – relativní směrodatná odchylka

SiO₂, 13,8 – 97,7 % Al₂O₃, < 0,01 – 3,3 % TiO₂, 0,06 – 3,5 % Fe₂O₃, do 3 % K₂O. Na obr. 1 jsou uvedeny kalibrační křivky Al₂O₃ pro vzorky z jednofázového tavení a vzorky odlévané, na obr. 2 jsou uvedeny kalibrační křivky Fe₂O₃. V tab. I jsou uvedeny výsledky testu opakovatelnosti 11 měření jednoho vzorku a v tab. II jsou uvedeny výsledky testu opakovatelnosti přípravy vzorku odlévaného na misku (11 vzorků).

Dosažené výsledky a diskuse

Při porovnání výsledků měření vzorků šamotů připravených odléváním na misku a jednofázovým tavením bylo zjištěno, že hodnoty stanovovaných oxidů jsou srovnatelné při porovnání správnosti výsledků v obou metodikách přípravy vzorku. V případě stanovení koncentrace 1,2 % SiO₂ byla RSD pro jednofázové tavení 8 rel.%, jinak se odchylky naměřených hodnot od certifikovaných pro většinu stanovovaných oxidů (SiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, TiO₂ a K₂O) pohybují od 0,2–1,0 rel.%.

Pokud se týká opakovatelnosti, byly zaznamenány signifikantní rozdíly u RSD vícenásobného měření jednoho vzorku v krátkém časovém úseku pro TiO₂ a Fe₂O₃ (tab. I). Je to dáno možnými rozdíly při přípravě perel, jejichž důvodem je zakřivení analyzovaného povrchu, popř. složením efektivní tloušťky vzorku, z které pochází 99,9 % získaného fluorescenčního záření a bývá tenká pouze několik mikronů (v závislosti na vlnové délce stanovované čáry a matici vzorku). V případě vzorku odlévaného na misku je analyzovaná plocha větší a povrch je rovnější. Při měření 11 vzorků připravených odléváním z jednoho standardu (8-1-03) rozdíly opakovatelnosti TiO₂ a Fe₂O₃ nebyly potvrzeny (tab. II).

Závěr

Výsledky analýzy vzorků šamotů připravených ve vysokofrekvenční peci metodou jednofázového tavení a připravených odléváním na PtAu misku prokázaly, že tyto metody jsou obě pro daný typ materiálu srovnatelné – stanovení SiO₂, Al₂O₃, K₂O. Rozdíly v RSD při opakovaném měření vzorku pro TiO₂ a Fe₂O₃ budou dále prověřovány na jiných CRM. Je možné prodloužit dobu měření

těchto prvků a zpřesnit analýzy. Vzhledem ke sjednocení přípravy vzorků odléváním na misku, budou provedeny analýzy dalších materiálů, zejména na bázi železných rud a ocelářenských strusek. Vzorky tak bude možné použít pro analýzu na kalibračních křivkách vypočítaných pomocí CRM materiálů a softwaru multivariabilní regrese (MVR) a navíc využít stejné tavené vzorky k analýze dalšího složení (např. stopových prvků nebo prvků, pro které neexistují CRM, bezstandardovými metodami).

LITERATURA

- Jenkins R.: *X-ray Fluorescence Spectrometry*, 2. vyd. A Wiley-Interscience publication, New York 1999.
- Van Grieken R., Markowicz A. A.: *Handbook of X-ray Spectrometry*, 2. vyd. Practical Spectroscopy Series, Volume 29, New York 2002.
- ČSN EN ISO 12677: *Chemický rozbor žáruvzdorných výrobků rentgenovou fluorescenční analýzou – Metoda tavené perly* (duben 2004).
- Lupton D. F., Merker J., Schölz F.: *X-Ray Spectrom.* 26, 132 (1997).
- Bower N. W., Valentine G.: *X-Ray Spectrom.* 15, 73 (1986).

Š. Vinklerová (*Metallurgical and Chemical Laboratories, ArcelorMittal Co., Ostrava, Czech Republic*): **Comparison of Techniques of Melting in Sample Preparation for X-ray Fluorescence Analysis of Oxide Materials**

A wide range of instruments are available for fast analyses of various materials. Of them, the X-ray fluorescence spectrometer is one of the most powerful tools for analyses of refractory materials from metallurgical production of, e.g., pressed or fused samples of oxides and metals. Two methods of preparation of oxide samples by melting with alkali borates are well known: the one-phase method (a sample with a melting agent is melted and cooled down in the same PtAu crucible) and two-phase method (a sample with a melting agent is melted in PtAu crucible and then poured into a hot PtAu dish for cooling). For testing the melting methods, certified reference materials based on silicon and aluminum oxides were selected. Analytical results for samples prepared by the two methods are discussed.

HPLC STANOVENIE SACHARIDOV V PROCESE MODELOVANÉHO ZRÝCHLENÉHO STARNUTIA PAPIERA

KATARÍNA HROBOŇOVÁ^a, JOZEF LEHOTAY^a,
MICHAL JABLONSKÝ^b a SVETOZÁR
KATUŠČÁK^b

^a Oddelenie analytickej chémie, Ústav analytickej chémie,
^b Oddelenie chemickej technológie dreva, celulózy a papiera,
Ústav polymérnych materiálov, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita,
Radlinského 9, 812 37 Bratislava
jozef.lehotay@stuba.sk

Došlo 14.5.07, prepracované 12.3.08, prijaté 12.6.08.

Kľúčové slová: papier; degradačné produkty; sacharidy;
HPLC

Úvod

Papier podlieha starnutiu, vplyvom ktorého sa rozpadajú dokumenty a knihy. Vzhľadom na množstvo týchto dokumentov a pokročilý stav ich znehodnotenia je snaha vypracovávať konzervačné metódy, ktorých základným cieľom je odstránenie hlavných príčin degradácie. Degradáčny procesy závisia od prítomnosti kyslých látok, vlhkosti, slnečného/UV žiarenia^{1,2}, teploty, oxidačných činidiel^{3,4} alebo mikroorganizmov^{5–7} a sú príčinou rozkladu celulózy a depolymerizácie celulózy, hemicelulózy a lignínu. Zníženie stupňa polymerizácie následne vedie k zmene mechanických a optických vlastností lignocelulóзовých vlákien^{8,9}. Sú známe tri spôsoby degradácie celulózy – degradácia teplom, oxidačná degradácia a kyslá alebo zásaditá hydrolýza. Znakom degradácie je roztrhnutie glykozidickej väzby a oxidácia –OH skupín v celulózovom reťazci alebo otvorenie β-D-glukopyranozového kruhu a postupné oxidačné reakcie. Výsledkom je tvorba nízkomolekulových produktov ako sú voda, CO, CO₂, atď. Impregnácia papiera vhodnými činidlami (napr. Bookkeeper disperzia založená na MgO v perfluórheptáne) je jednou z možností stabilizácie celulózy proti kyslej deštrukcii¹⁰.

Prirodzeným starnutím papiera dochádza ku vzniku uhlíkovodíkových fragmentov z celulózy a hemicelulózy^{11–13}. Druh a množstvo degradačných produktov závisia od podmienok starnutia a dĺžky expozície¹⁴. Glukóza a xylóza, produkty hydrolytickej degradácie celulózy a xylánu, sú hlavné degradačné produkty starnutia papiera pri teplote 90 °C a relatívnej vlhkosti 100 %. Zvýšenie teploty (150 °C) má za následok zvýšenie počtu druhov degradačných produktov počas starnutia papiera^{15,16}.

Na analýzu sacharidov sa vypracovali mnohé analytické techniky. Metódy stanovenia monosacharidov a disacharidov zahŕňujú kapilárnu elektroforézu¹⁷ a chromatografické metódy. Staršie metódy (TLC, papierová chromatografia) boli nahradené plynovou a kvapalinovou chromatografiou. Chromatografické metódy sa využívajú aj na identifikáciu sacharidov predovšetkým v kombinácii s detekčnými technikami ako sú napr. hmotnostná spektroskopia (MS), infračervená spektroskopia (IR) a jadrová magnetická rezonancia (NMR)^{18–20}. Iónovo-výmenná chromatografia a adsorpčná chromatografia v kombinácii s refraktometrickou (RI), spektrofotometrickou (UV)²¹, pulznou ampérometrickou^{22,23} detekciou a detekciou rozptylu žiarenia²⁴ sú najčastejšie využívané HPLC separačné techniky vďaka svojej separačnej účinnosti. Citlivosť UV a RI detektora je podobná, ale nie dosť vysoká na stopové koncentrácie sacharidov. Jednou z možností zvýšenia citlivosti je fluorescenčná detekcia založená na pred- alebo pokolónovej derivatizácii skúmadlami ako napr. 9-fluorometylhydrazín²⁵, kyselina 2-aminobenzoová²⁶, 1-fenyl-3-metyl-5-pyrazolón²⁷, dansylhydrazín²⁸ a iné.

Cieľom predkladanej práce bolo navrhnúť najvhodnejšie HPLC podmienky na stanovenie sacharidov a jej využitie na sledovanie degradácie vzoriek papiera po modelovanom zrýchlennom starnutí.

Experimentálna časť

Chemikálie a vzorky

Suspensia Bookkeeper na impregnáciu papiera – roztok MgO v perfluórheptáne (4,3 g l⁻¹, veľkosť častíc menej ako 1 μm) (Preservation Technologies, LP., USA).

Chemikálie na prípravu mobilných fáz – kyselina sírová (p.a.) (Microchem), kyselina octová (p.a.) (Microchem), acetonitril a metanol (pre HPLC) (Merck).

Chemikálie na derivatizáciu – derivatizačné skúmadlo dansylhydrazín (Sigma-Aldrich), kyselina trichlóroctová (p.a.) (Microchem).

Referenčné látky sacharidov – celobióza, D-arabinoza, D-fruktóza, D-galaktóza, D-glukóza, D-manóza, laktóza, D-xylóza a metyl-D-glukopyranozid (Merck).

Vzorka papiera – drevitý, strojne hladený, neglejený, novinový papier (hmotnosť: 45 g m⁻²; povrchové pH: 4,5 až 5,0; zloženie: 55 % mechanickej bielenej drevoviny, 20 % bielenej sulfátovej buničiny, 15 % zachytených odpadových vlákien, 10 % kaolínu) (Jihočeské papírny, JSC Větrní).

HPLC zariadenie a podmienky

Na separáciu sa použil kvapalinový chromatograf pozostávajúci z vysokotlakového čerpadla DeltaChrom SDS 030, dávkovacieho ventilu Rheodyne 7125, termostatu kolón LCT 5100, fluorescenčného detektora Shimadzu RF 551 a refraktometrického detektora Waters R401.

Na spracovanie signálu z detektora, zaznamenávanie, uchovávanie a vyhodnocovanie chromatografických záznamov sa použila datastanica CSW32.

Na separáciu a stanovenie uvedených sacharidov sa použili tri metódy:

Metóda I: Na separáciu sa použila chromatografická kolóna Polymer IEX v H^+ forme (250×8 mm I.D., $10 \mu\text{m}$) (Watrex) spojená s predkolónou Separon SGX C18 (10×4 mm I.D., $7 \mu\text{m}$) (Watrex). Mobilnou fázou bol 9 mmol l^{-1} roztok kyseliny sírovej. Prietok mobilnej fázy bol $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ a teplota kolóny $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Na detekciu sa použil refraktometrický detektor. Dávkovaný objem bol $20 \mu\text{l}$.

Metóda II: Separácia sa uskutočnila použitím chromatografickej kolóny Separon SGX NH_2 (150×3 mm I.D., $5 \mu\text{m}$) (Watrex) (kolóna A). Ako mobilná fáza sa použila zmes acetonitrilu a vody ($82:18 \text{ v/v}$). Prietok mobilnej fázy bol $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ a teplota kolóny $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Dávkovaný objem bol $20 \mu\text{l}$ (bez predkoncentrácie) alebo $500 \mu\text{l}$ (s predkoncentráciou).

Na on-line predkoncentráciu sa použila kolóna Separon SGX NH_2 (30 a 150×3 mm I.D., $5 \mu\text{m}$) (Watrex) (kolóna B) kondicionovaná s acetonitrilom. Po nadávkovaní $500 \mu\text{l}$ roztoku referenčných látok alebo extraktu vzorky do kolóny B, sa kolóna 3 min premývala acetonitrilom. Následne sa sacharidy eluovali opačným smerom z kolóny B do analytickej kolóny A mobilnou fázou (acetonitril-voda ($82:18 \text{ v/v}$)). Na detekciu sa použil refraktometrický detektor. Prietok mobilnej fázy na kondicionovanie a elúciu látok z predkolóny bol $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ a teplota kolóny a predkolóny bola $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Metóda III: Uskutočnila sa derivatizácia sacharidov podľa postupu uvedeného v práci²⁸: K $100 \mu\text{l}$ vodného roztoku vzorky v reakčnej nádobe sa pridalo $10 \mu\text{l}$ kyseliny trichlóroctovej ($10\% \text{ w/v}$) a $40 \mu\text{l}$ dansylhydrazínu ($5\% \text{ w/v}$ v acetonitrile). Zavretá reakčná nádoba sa temperovala 20 min na vodnom kúpeli pri teplote $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Na ukončenie reakcie sa reakčná nádoba ponorila do ľadového kúpeľa. Pred dávkovaním do chromatografickej kolóny sa zmes zriedila vodou v pomere 1:1.

Na separáciu sa použila chromatografická kolóna Nucleosil 120-5 C18 (250×4 mm I.D., $5 \mu\text{m}$) (Macherey-Nagel) spojená s predkolónou Separon SGX C18 (10×4 mm I.D., $7 \mu\text{m}$) (Watrex). Mobilnou fázou bola zmes acetonitrilu a vodného roztoku kyseliny octovej (80 mmol l^{-1}) v pomere $21:79 \text{ (v/v)}$. Prietok mobilnej fázy bol $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ a teplota kolóny $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Dávkovaný objem bol $20 \mu\text{l}$. Na detekciu sa použil fluorescenčný detektor ($\lambda_{\text{Ex}}=360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=470 \text{ nm}$).

Postupy

Priprava vzoriek papiera

Vzorka papiera (20 listov formát A4 a 160 listov formátu A5 zviazaných do knihy) bola kondicionovaná 24 h pri teplote $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (relatívna vlhkosť vzduchu $50 \pm 2 \%$). Papier bol rozdelený na dve skupiny:

A (neimpregnovaný): Vzorka papiera (20 listov, formát A4) sa uzavrela pomocou zvarovacieho prístroja do obalu z PET/Al/PE materiálu (trojvrstvová laminovaná fólia s hliníkovou medzivrstvou). Takto pripravené vzorky papiera sa zabalili ešte dvakrát do PET/Al/PE obalu. Pripravené vzorky papiera sa podrobili zrýchlenému modelovanému starnutiu pri teplote $98 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ počas 0 – 30 dní.

B (impregnovaný): Vzorka papiera (160 listov papiera formátu A5 zviazaných do knihy) sa v reaktore uchytila za hrebeň knihy do držiaka a do stredu otvorenej knihy sa zaviedla tryska. Papier sa 4 h vákuovo sušil pri tlaku $0,1 \text{ MPa}$ a teplote $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Potom sa ohrev vypol a impregnačný roztok (suspenzia Bookkeeper, 4 l) sa rozprašoval v reaktore 20 min pri teplote $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Následne sa nadbytočná impregnačná kvapalina vypustila a reaktor sa 4 h vymrazoval (teplota $-40 \text{ }^\circ\text{C}$, tlak $0,1 \text{ MPa}$). Na záver sa vzorka papiera po impregnácii klimatizovala 24 h pri teplote $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (relatívna vlhkosť vzduchu $50 \pm 2 \%$).

Impregnované listy papiera z vnútornej časti knihy (2×20 listov formátu A5 uložených vedľa seba) sa uzavreli do obalu z PET/Al/PE materiálu. Takto pripravené vzorky impregnovaného papiera sa zabalili ešte dva krát do PET/Al/PE obalu a použili sa na modelovanie zrýchleného starnutia papiera pri teplote $98 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ počas 0 až 30 dní.

Modelovanie zrýchleného starnutia papiera

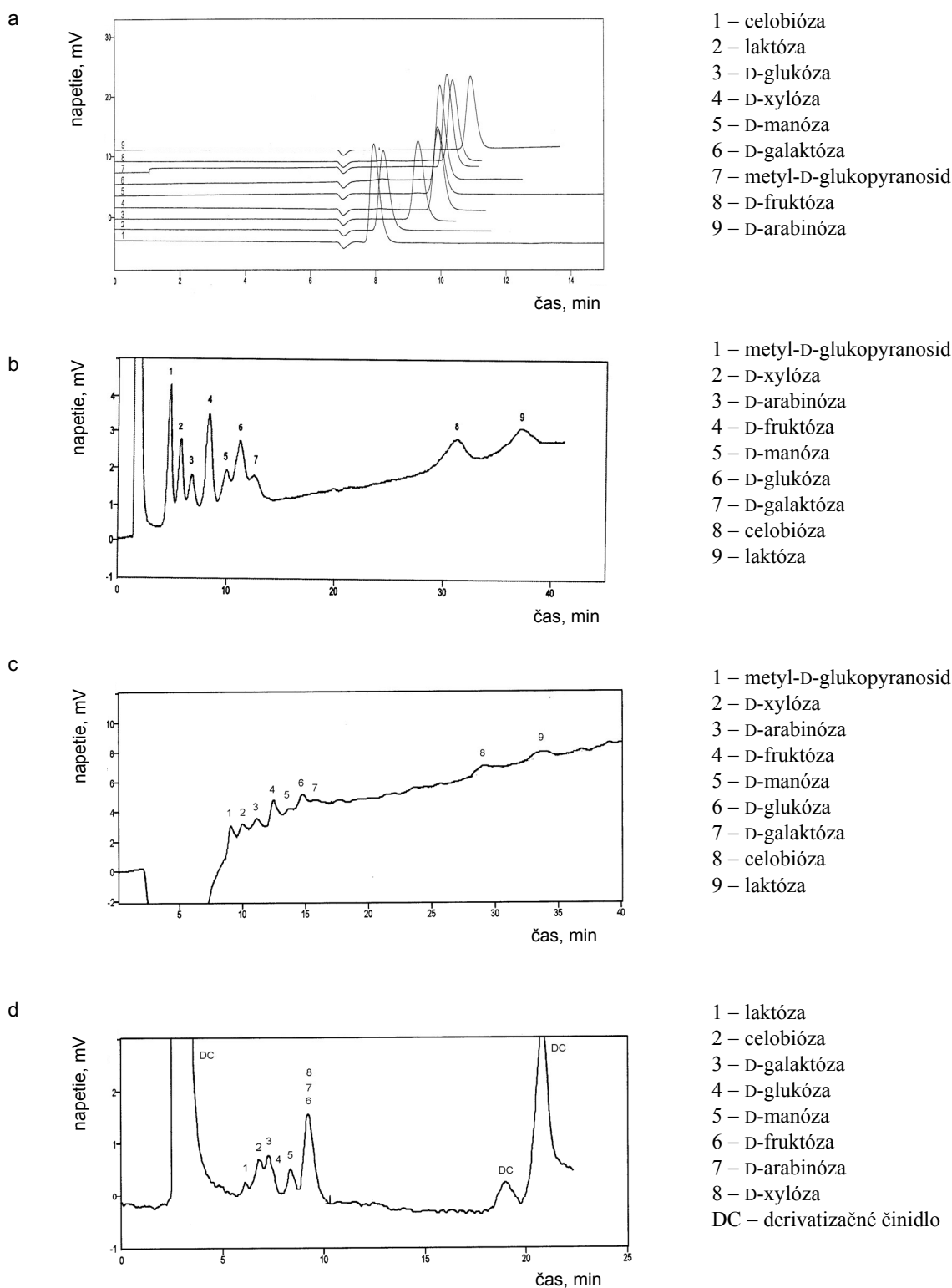
Modelovanie zrýchleného starnutia papiera sa uskutočnilo podľa normy²⁹ temperovaním vzoriek papiera uzavretých v troch obaloch z PET/Al/PE materiálu v cirkulačnej sušiarňi pri teplote $98 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ počas 0 , 2 , 3 , 5 , 10 , 15 , 20 , 30 dní.

Extrakcia impregnovaného a neimpregnovaného papiera kvapalinou – predseparačná úprava

K presne odváženej nastrihanej vzorke papiera (A alebo B) po modelovanom zrýchlenom starnutí (2 g) sa pridalo 15 ml deionizovanej vody (Millipore). Zmes sa 2 h premiešavala na trepačke. Čirý roztok sa prefiltraval cez fritu ($0,45 \mu\text{m}$). Filtrát sa použil na HPLC analýzu.

Výsledky a diskusia

Papier je relatívne stabilný materiál, avšak podlieha starnutiu, ktoré zapríčiňuje degradácia celulózy. Medzi degradačné produkty hydrolytickej degradácie celulózy a xylánu patria aj sacharidy. Druh a množstvo sacharidov závisí od podmienok a dĺžky starnutia. Z literárnych štúdií sa vybrala skupina sacharidov (celobióza, D-arabinóza, D-fruktóza, D-galaktóza, D-glukóza, D-manóza, laktóza, D-xylóza a metyl-D-glukopyranozid), u ktorých sa predpokladalo, že môžu byť degradačnými produktami starnutia papiera. Starnutie sa modelovalo formou zrýchleného starnutia pri teplote $98 \text{ }^\circ\text{C}$. Testované HPLC metódy sa aplikovali pre vzorku papiera impregnovanú „Bookkeeper“ roztokom a pre vzorku papiera bez impregnácie.



Obr. 1. HPLC chromatogramy analýzy sacharidov použitím kolón a) Polymer IEX-H, b) Separon NH₂ bez on-line predkoncentrácie, c) Separon NH₂ s on-line predkoncentráciou, d) Nucleosil 120-5 C18. Chromatografické podmienky uvedené v texte

HPLC separácia

Na separáciu vybraných sacharidov metódou HPLC sa testovali tri typy stacionárnych fáz.

V prvom kroku sa testovala iónovo-výmenná chromatografia (metóda I), kde sa separácia sacharidov uskutočnila na základe rozdielnosti pK_a hodnôt separovaných látok. Použitím chromatografických podmienok uvedených v experimentálnej časti sa však nedosiahla požadovaná separácia ($R_s \geq 1,0$) pre celú skupinu sledovaných sachari-

dov (tab. I, obr. 1a). Dosiachnuté hodnoty rozlišovacích faktorov pre skupinu látok xylóza/manóza/galaktóza/metyl-D-glukopyranozid/fruktóza boli veľmi nízke ($R_s = 0,3-0,6$). Na zlepšenie separácie uvedenej skupiny látok sa testoval vplyv koncentrácie kyseliny sírovej v mobilnej fáze v rozsahu $5-20 \text{ mmol l}^{-1}$, avšak výraznejšie zlepšenie sa nedosiahlo. Uvedená metóda je však vhodná na rýchlu separáciu (čas analýzy bol do 15 min) menšej skupiny sacharidov ako sú napr. laktóza, glukóza, xylóza, fruktóza, arabinóza.

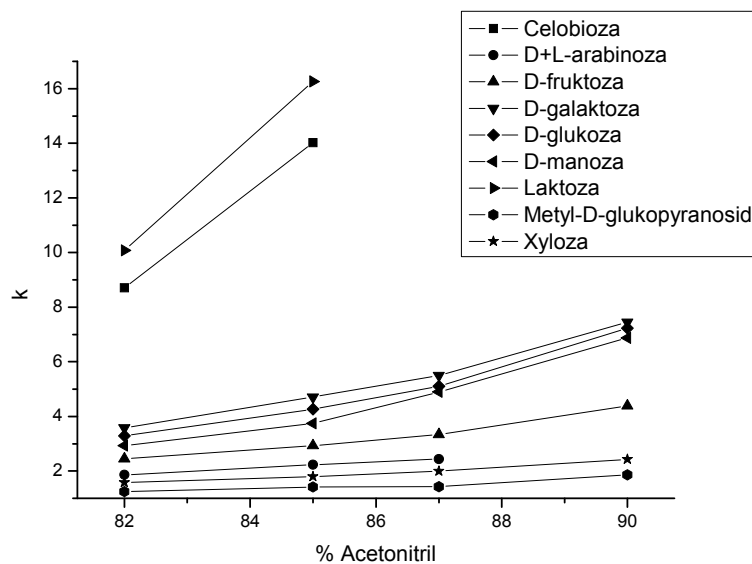
Účinnnejšia separácia (väčšie hodnoty R_s faktorov v porovnaní s metódou I) študovanej skupiny sacharidov sa dosiahla použitím NH_2 kolóny s mobilnou fázou acetonitril-voda, ktorých vzájomný pomer ovplyvňoval retenciu látok, ako to dokumentuje obr. 2. Výsledky separácie sacharidov použitím mobilnej fázy acetonitril-voda (82:18 v/v, metóda II) sú zhrnuté v tab. II. Doba analýzy bola 44 min (obr. 1b) a hodnoty rozlišovacích faktorov (R_s) boli v rozsahu 0,7–7,8. Mobilná fáza zloženia acetonitril-voda v pomere 82:18 (v/v) sa zvolila na separáciu sacharidov kvôli tomu, že sacharidy celobióza a laktóza už pri tomto zložení mali vysoké hodnoty retenčných faktorov, ktoré sa zvyšovaním koncentrácie acetonitrilu v mobilnej fáze zvyšovali a zároveň ich elučné píky boli veľmi široké.

Uvedené chromatografické podmienky boli použité na separáciu sacharidov priamo vo vodnom extrakte vzoriek papiera (vzorky A a B) po procese modelovaného zrýchleného starnutia. Koncentrácia sledovaných sacharidov však bola pod mezou stanovenia danej metódy (0,25 až $1,5 \text{ mg ml}^{-1}$). V prvom kroku sa na skoncentrovanie extraktov vzoriek použilo vákuové odparovanie. Tento

Tabuľka I

Hodnoty retenčných faktorov (k) a rozlíšenia (R_s) sacharidov použitím ionexovej HPLC metódy; $n = 3$, RSD = do 5 %, koncentrácia sacharidov $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$

Sacharid	Polymer IEX-H	
	k	R_s
Celobióza	0,13	
Laktóza	0,17	0,55
D-Glukóza	0,33	1,73
D-Xylóza	0,42	1,27
D-Manóza	0,41	0,31
D-Galaktóza	0,42	0,43
Metyl- D-glukopyranozid	0,48	0,64
D-Fruktóza	0,45	0,59
D-Arabinóza	0,93	1,26



Obr. 2. Závislosť hodnoty retenčného faktora (k) sacharidov od koncentrácie acetonitrilu v mobilnej fáze acetonitril-voda pre NH_2 kolónu. Chromatografické podmienky uvedené v texte

Tabuľka II

Hodnoty retenčných faktorov (k) a rozlíšenia (R_s) sacharidov použitím HPLC metód s NH_2 stacionárnou fázou; $n = 3$, RSD = do 5 %

Sacharid	SGX NH_2^a		SGX NH_2^b	
	k	R_s	k	R_s
Metyl-D-glukopyranozid	1,83		1,82	
D-Xylóza	2,50	1,33	2,35	1,11
D-Arabinóza	2,99	0,89	2,73	1,14
D-Fruktóza	4,08	1,26	3,17	1,43
D-Manóza	4,91	1,10	3,60	1,45
D-Glukóza	5,67	0,67	3,94	1,37
D-Galaktóza	6,50	0,68	4,25	1,32
Celobióza	18,16	7,83	8,74	8,82
Laktóza	21,00	1,33	10,37	2,12

^a Bez predkoncentrácie, dávkovaný objem 20 μl , koncentrácia sacharidov 2,5 mg ml^{-1} , ^b s predkoncentráciou, dávkovaný objem 500 μl , koncentrácia sacharidov 0,25 mg ml^{-1}

spôsob skoncentrovania vodných extraktov nebol vhodný, pretože objem odparovaného extraktu bol veľký (15 ml), čo predlžovalo čas úpravy vodných extraktov. V druhom kroku sa testovala možnosť on-line predkoncentrácie sacharidov na predkolóne s NH_2 stacionárnou fázou. Postup predkoncentrácie zahrňoval dva kroky: I) nadávkovanie väčšieho objemu vzorky (500 μl štandardného roztoku sacharidov alebo vodného extraktu vzoriek papiera), fokusácia zóny sacharidov na začiatku predkolóny a zároveň ich separácia od zložiek matrice, II) elúcia sacharidov z predkolóny do analytickej kolóny, kde sa uskutočnila ich separácia. Zloženie mobilnej fázy, ktorá sa použila na fokusáciu zóny sacharidov na začiatku NH_2 predkolóny sa volilo tak, aby sacharidy neeluovali z predkolóny (nahromaďovali sa na začiatku kolóny), kým zložky matrice vzorky eluovali s krátkymi elučnými časmi (do 2,5 min). Ako vyplýva zo závislosti retenčného faktora sacharidov od koncentrácie acetonitrilu v mobilnej fáze pre NH_2 kolónu a pre jednotlivé študované sacharidy (obr. 2), vhodnou mobilnou fázou na skoncentrovanie sacharidov v predkolóne bol acetonitril, ktorý bol tiež kompatibilný s mobilnou fázou pre analytickú kolónu (acetonitril-voda (82:18 v/v), metóda II). Na on-line predkoncentráciu sa testovali NH_2 predkolóny dvoch dĺžok 30 a 150 mm. Straty pri predkoncentracii použitím dlhšej predkolóny (150 mm) boli v rozsahu 40–55 %, kým použitím kratšej predkolóny (30 mm) 80–90 %. (Straty pri predkoncentracii sa zisťovali pre vzorku papiera A bez modelovaného procesu starnutia so štandardným prídavkom sacharidov s koncentráciou 0,25 mg ml^{-1} .) Vysoké straty pri predkoncentracii možno vysvetliť prítomnosťou vody,

ktorá bola použitá ako extrakčné činidlo vzoriek papiera. Množstvo nadávkovanej vodnej vzorky spôsobilo zmenu zloženia mobilnej fázy (acetonitril) použitej na on-line nahromadenie sacharidov na predkolóne, čo malo za následok čiastočnú elúciu sacharidov z predkolóny. Chromatografický záznam separácie sacharidov po on-line predkoncentracii dokumentuje obr. 1c. Chromatografické charakteristiky získané metódou s predkoncentraciou a bez predkoncentrácie sú zhrnuté v tab. II. Hodnoty retenčných faktorov pre separáciu s on-line predkoncentraciou sú nižšie v porovnaní bez on-line predkoncentrácie, čo bolo tiež spôsobené prítomnosťou väčšieho objemu vody vo vzorke dávkovanej do predkolóny (500 μl), ktorá znižuje retenčný faktor sacharidov na NH_2 kolóne, ako to dokumentuje obr. 2.

Tretia testovaná metóda bola založená na predkolónovej derivatizácii sacharidov s dansylhydrazínom (metóda III). Toto derivatizačné činidlo bolo zvolené preto, že reakcia je rýchla, uskutočňuje sa vo vodnom prostredí a citlivosť detekcie je dostatočne vysoká aj pre stopové koncentrácie sacharidov, zvlášť vo vodných vzorkách so zložitou maticou²⁹. Na separáciu derivatizačných produktov je vhodná chromatografia na obrátených fázach s fluorescenčnou detekciou. Použitím vhodných separačných a detekčných podmienok sa dosiahli pre študovanú skupinu sacharidov chromatografické charakteristiky (retenčný faktor v rozsahu 2,2–3,4 a hodnoty rozlíšenia v rozsahu 0,5–1,7) dokumentované v tab. III. Elučné píky s retenčným faktorom 0 a 6,5 prislúchali derivatizačnému činidlu. Chromatografický záznam separácie sacharidov po derivatizácii dokumentuje obr. 1d. Metyl-D-glukopyranozid nereagoval s derivatizačným činidlom. Výhodou tejto metódy bol kratší čas analýzy (25 min)

Tabuľka III

Hodnoty retenčných faktorov (k) a rozlíšenia (R_s) sacharidov použitím HPLC metódy založenej na derivatizácii sacharidov; $n = 5$, RSD = do 4 %, koncentrácia sacharidov 0,1 mg ml^{-1}

Sacharid	Nucleosil C18	
	k	R_s
Laktóza	2,23	
Celobióza	2,44	1,03
D-Galaktóza	2,50	0,82
D-Glukóza	2,71	0,79
D-Manóza	3,09	1,67
D-Fruktóza	3,41	1,28
D-Arabinóza	3,42	0,51
D-Xylóza	3,44	0,55
Metyl-D-glukopyranozid	–	–

Tabuľka IV
Medze detekcie a stanovenia testovaných HPLC metód

Sacharid	LOD [$\mu\text{g ml}^{-1}$]				LOQ [$\mu\text{g ml}^{-1}$]			
	metóda				metóda			
	I	II ^a	II ^b	III	I	II ^a	II ^b	III
Laktóza	250	1000	800	20	500	1500	1000	50
Celobióza	250	1000	800	20	500	1500	1000	50
D-Galaktóza	250	600	350	20	500	900	600	40
D-Glukóza	250	300	200	15	500	600	400	35
D-Manóza	250	350	300	10	500	750	500	30
D-Fruktóza	250	200	100	40	500	300	200	90
D-Arabinóza	250	350	200	20	500	750	500	40
D-Xylóza	250	200	150	20	500	350	250	40
Metyl-D-glukopyranozid	250	100	75	–	500	250	150	–

^a Bez predkoncentrácie, dávkovaný objem 20 μl , ^b s predkoncentráciou, dávkovaný objem 500 μl

v porovnaní s metódou II. Použitím uvedených podmienok sa však nepodarilo rozseparovať skupinu látok fruktóza/arabinóza/xylóza.

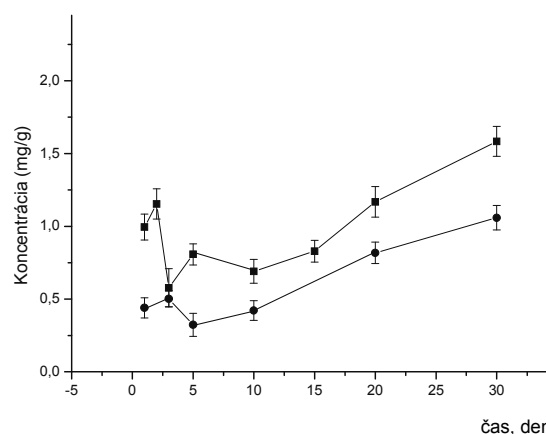
Jedným z rozhodujúcich kritérií medzi testovanými metódami bola medza stanovenia, keďže predpokladaná koncentrácia sacharidov vo vodných extraktoch vzoriek papiera bola nízka ($\leq \text{ppm}$). V tab. IV sú uvedené medze detekcie ($S/N = 3$) a stanovenia ($S/N = 10$) sacharidov pre testované chromatografické metódy. Použitím metódy s derivatizáciou a fluorescenčnou detekciou (metóda III) sa dosiahli medze stanovenia viac ako $10\times$ nižšie v porovnaní s ionexovou metódou (metóda I), metódou bez on-line a s on-line predkoncentráciou (metóda II). Vyššie medze stanovenia pre ionexovou metódu, metódu bez on-line a s on-line predkoncentráciou vyplývajú z použitia menej citlivej refraktometrickej detekcie a navyše pri použití on-line predkoncentráciou dochádzalo k vysokým stratám študovaných analytov.

Na kvantitatívnu analýzu sacharidov v extraktoch vzoriek papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí sa použila metóda kalibračnej závislosti. Pre študované sacharidy mali kalibračné závislosti lineárny priebeh v rozsahu koncentrácií od medze stanovenia jednotlivých sacharidov do $5,0 \text{ mg ml}^{-1}$ pre fruktózu a do $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ pre ostatné sacharidy s korelačnými koeficientami väčšími ako 0,995.

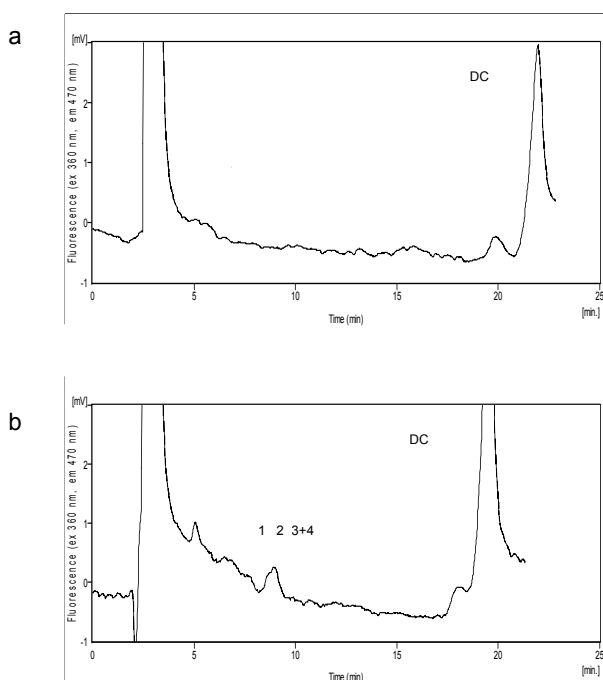
Analýza vzoriek papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí

HPLC metóda s derivatizáciou a fluorescenčnou detekciou sa použila na analýzu vodných extraktov vzoriek neimpregnovaného (A) a impregnovaného (B) papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí (doba inkubácie vzo-

riek papiera 0, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 dní) pri teplote $98 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. V extraktoch sa zistila prítomnosť niektorých sacharidov nad medzou detekcie použitej HPLC metódy. Koncentrácia sacharidov závisela od typu vzorky (A, B) a času inkubácie (0–30 dní). Závislosti celkového obsahu sacharidov v papieri od času inkubácie v intervale 0–30 dní sú znázornené na obr. 3. Vzhľadom na typ vzorky, vyššia koncentrácia sacharidov bola zistená v extraktoch neimpregnovanej vzorky (A) než v extraktoch vzorky impregnovanej Bookkeeper suspenziou (B). Tento výsledok je v súlade s predpokladmi, keďže cieľom impregnácie



Obr. 3. Závislosť celkovej koncentrácie sacharidov od času inkubácie vzoriek neimpregnovaného (■) a impregnovaného (●) papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí v intervale 0–30 dní



Obr. 4. HPLC chromatogram analýzy vodného extraktu neimpregnovanej vzorky papiera (A) po a) 0 a b) 30 dňoch modelovaného zrýchleného starnutia. Chromatografické podmienky uvedené v texte. 1 – D-manóza, 2 – D-fruktóza, 3 – D-arabínóza, 4 – D-xylóza, DC- derivatizačné činidlo

papiera s Bookkeeper suspenziou (časť Príprava vzoriek papiera) ako deacidifikačného procesu bolo zabránené štiepeniu celulóзовého reťazca počas starnutia papiera na mono- a disacharidy, čo má význam pri predĺžení životnosti a zlepšovaní kvality papiera. Z obr. 3 je tiež zrejme, že počas prvých 10 dní modelovaného zrýchleného starnutia vzoriek papiera koncentrácia sacharidov nemala monotónny charakter a pri dlhších intervaloch modelovaného starnutia (10–30 dní) koncentrácia stúpala. Pribeh závislosti nasvedčuje tomu, že sacharidy, ktoré vznikali štiepením celulóзовého reťazca počas 0–3 dní starnutia papiera (narastanie koncentrácie sacharidov) pravdepodobne reagovali s ďalšími látkami prítomnými v reakčnom prostredí a tým pribeh závislosti koncentrácie sacharidov od času inkubácie v intervale 3–10 dní nemal monotónny charakter. Po určitom čase inkubácie papiera (10 dní) sa reakčný systém zmenil a dosiahol sa stav, kedy už zrejme nedochádzalo k vedľajším reakciám vznikajúcich sacharidov, čo sa prejavilo zvyšovaním koncentrácie sacharidov od času inkubácie (10–30 dní).

V extraktoch vzoriek papiera sa zistila prítomnosť D-manózy a D-fruktózy – D-arabínózy – D-xylózy v koncentráciách nad medzou stanovenia metódy. Obr. 4 dokumentuje charakteristické chromatogramy analýzy vodného extraktu vzoriek neimpregnovaného papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí 0 a 30 dní.

Záver

HPLC metóda stanovenia sacharidov tvorí vhodný doplnok k metódam analýzy a kontroly kvality lignocelulóзовých materiálov v modifikačných procesoch. Výber separačných a detekčných podmienok závisí od koncentrácie sacharidov vo vzorke.

Na HPLC analýzu vodných extraktov vzoriek papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí bola vzhľadom na medzu stanovenia vhodnejšia metóda s derivatizáciou a fluorescenčnou detekciou. V extraktoch sa zistila prítomnosť sacharidov, ako degradačných produktov celulózy, nad medzou stanovenia použitej HPLC metódy. Koncentrácia sacharidov závisela od typu vzorky a času inkubácie.

Práca vznikla v rámci projektu Agentúry na podporu výskumu a vývoja Slovenskej republiky (projekt č. 20-035205 a 20-033004) a projektu Ministerstva školstva Slovenskej republiky KNIHA.SK 2003SP200280301. Účasť v projekte je podporovaná tiež z grantu Grantovej agentúry Slovenskej republiky (grant č. 1/2460/05).

LITERATÚRA

- Katuščák S.: *Wood Res.* 45, 1 (2000).
- Katuščák S., Ďurišová L.: *Wood Res.* 118, 75 (1988).
- Jablonský M., Vrška M., Katuščák S., Šutý Š.: *Chem. Papers.* S 99, 571 (2005).
- Valko L., Klein E.P., Kovařík-Bleha T., Šimin P.: *Eur. Polym. J.* 37, 1123 (2001).
- Katuščák S., Katuščáková G.: *Holzforchung* 41, 315 (1987).
- Kučera L. J., Katuščák S.: *J. Forest. Sui.* 144, 873 (1993).
- Katuščák S., Chovanec D., Katuščáková G.: *Drevársky Výskum* 120, 214 (1989).
- Kronek J., Rychlý J., Czomorová K., Kleinová A., Kirschnerová S., Vizárová K., Vrška M.: *ChemZi* 1, 217 (2005).
- Cedzová M., Vrška M., Szeiffová G.: *Chem. Listy* 99 (S), 442 (2005).
- Polovka M., Polovková J., Vizárová K., Kirschnerová S., Bieliková L., Vrška M.: *Vibration Spectroscopy* 41/1, 112 (2006).
- Shahani Ch. J.: *Proc. Conf. "Save Paper", Swiss National Library, Berne 2006.*
- Vives J. M. G., Escoda J. R. M., Guerra R. A., Hernandez L. A.: *Restaurator* 22, 187 (2001).
- Van Der Reyden D.: *JAIC* 31, 117 (1992).
- Feller R.: *15th Annual Meeting, American Institute for Conservation, Washington 1987.*
- Erhardt D.: *Paper Preservation Symposium*, (Smith R., Norris T., ed.), *Washington 1988.*
- Erhardt D., Von Endt D., Hopwood W.: *15th Annual Meeting, American Institute for Conservation, Washington 1987.*
- Hu Q., Hou T., Hu G., Fang Y.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, 1047 (2002).

18. Zhang T., Zhou Y., Liu D., Petrus L.: *Bioresource Technol.* 98, 1454 (2007).
19. Boldizsár I., Szücs Z., Füzfa Zs., Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr., A* 1133, 259 (2006).
20. Menavuvu B. T., Poonperm W., Takeda K., Morimoto K., Granström T. B., Takada G., Izumori K.: *J. Biosci. Bioeng.* 102, 436 (2006).
21. Molnar-Perl I.: *J. Chromatogr.* 891, 1 (2000).
22. Cai Y., Liu J., Shi Y., Liang L., Mou S.: *J. Chromatogr.* 1085, 98 (2005).
23. Cordella C., Militao J. S. L. T., Clement M.-C., Drajnudel P., Cabrollass D.: *Anal. Chim. Acta* 531, 239 (2005).
24. Karlsson G., Winge S., Sandberg H.: *J. Chromatogr., A* 1092, 246 (2005).
25. Rooyakkers D. R., Van Eijk H. M. H., Deutz N. E. P.: *J. Chromatogr., A* 730, 99 (1996).
26. Anumula K. R.: *Anal. Biochem.* 220, 275 (1994).
27. Shen X., Perreault H.: *J. Chromatogr., A* 811, 47 (1998).
28. Mopper K., Johnson L.: *J. Chromatogr.* 256, 27 (1983).
29. ASTM 6819-02 (Standard test method for accelerated temperature aging of printing and writing paper by dry oven exposure apparatus).

K. Hroboňová^a, J. Lehotay^a, M. Jablonský^b, and S. Katusčák^b (^a*Department of Analytical Chemistry, ^bDepartment of Chemical Technology of Wood, Pulp and Paper, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic*): **HPLC Determination of Saccharides in the Process of Accelerated Ageing of Paper**

In study of degradation products of paper, LC methods were tested for determination of some saccharides in water extracts of paper. Saccharides were analyzed by ion-exchange and partition chromatography with differential refractive index detection and on-line preconcentration, and by RP-HPLC with fluorescence detection based on pre-column derivatization with dansylhydrazine. The limits of determination for sugars (cellobiose, D-arabinose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-lactose, D-mannose, D-xylose and methyl D-glucopyranoside) were evaluated by all the tested methods. The degradation products of paper after accelerated ageing for 0–30 days at 98 °C were estimated. The presence of some saccharides (D-mannose, D-fructose, D-arabinose and D-xylose) above the limits of determination was proved. Their concentrations depend on the type of paper modification and the ageing time.



Česká společnost chemická
Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5
116 68 Praha 1
tel./fax: 222 220 184, redakce tel. 222 221 778
e-mail: chem.spol@csvts.cz
<http://www.csch.cz>

Proč se stát členem České společnosti chemické

Zapojení v České společnosti chemické, členu Asociace českých chemických společností, přináší individuálním chemikům kromě vlastního členství v největší a nejstarší profesní organizaci chemiků:

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCH,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění...
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCH,
- možnost dostávat 4× ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů,
- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- možnost objednání „osobního balíku předplatného“ Chemických listů a časopisů konsorcia EUChemSoc,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě, informace o dění v evropských chemických strukturách
- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu Eurchem, platného v celé EU,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCH,
- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- vedle individuálního členství je možné kolektivní členství firem,
- a řadu dalších služeb.

Jak se stát členem ČSCH

Členská přihláška je k dispozici na internetových stránkách ČSCH nebo na sekretariátu ČSCH. Členství je přístupné pro všechny zájemce o chemii a přijetí nového člena doporučí dva členové ČSCH (doporučení je možné nahradit odborným životopisem), členství nabývá platnosti po schválení hlavním výborem ČSCH.

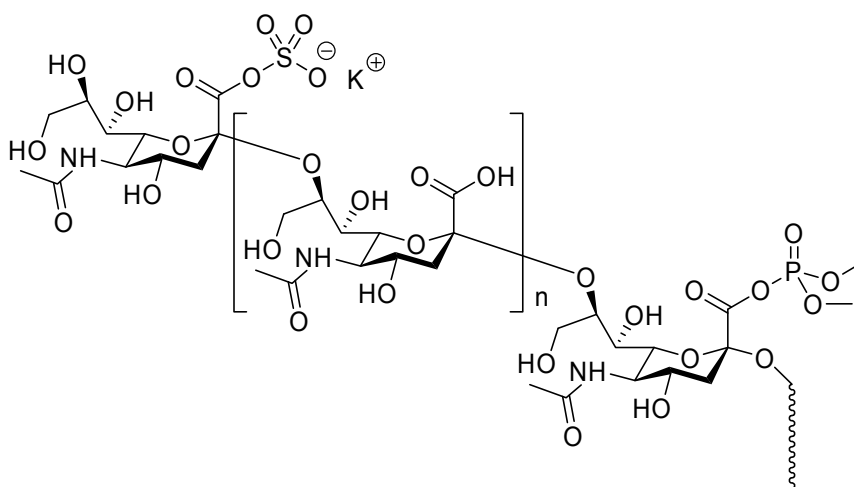
Výši členských příspěvků a možné slevy schvaluje na návrh předsednictva hlavní výbor ČSCH.

Ústav chemie a technologie
sacharidů VŠCHT Praha



Ústav živočišné fyziologie
a genetiky AV ČR

Česká společnost chemická



5th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience 2009

11.–13.11.2009
Novotného lávka 5, Praha 1

Vážení kolegové,

ve dnech 11.–13.11.2009 se koná pod patronátem České společnosti chemické v pořadí již pátá mezinárodní konference Polysacharidy, tentokrát pod rozšířeným názvem Polysaccharides-Glycoscience 2009. Obsah zahrnuje analytické techniky, chemické reakce a biologické účinky polysacharidů, inženýrské aspekty produkce polysacharidů a biodegradabilních plastů. Prostor je samozřejmě věnován také zdrojům polysacharidů určených k potravinářskému využití i polysacharidů s biologickými účinky.

Loňská konference výrazně posunula laťku tím, že většina přednášek byla prezentována v angličtině. Snad potřeba věnovat se větší brilantnosti v jazykové oblasti stimulovala i hlubší zamyšlení každého z autorů, co přesně chce před mezinárodním publikem prezentovat. Na druhé straně i nadále považujeme za podstatné praktické aspekty příspěvků a vítáme, účastní-li se jí lidé z praxe; nebráníme se tak pochopitelně ani česky prezentovaným příspěvkům. Účel odborného setkání spatřujeme spíše ve vzájemné komunikaci účastníků, než jen v izolovaných sděleních.

Loňský časový tlak v závěru konference nás vedl k rozhodnutí rozšířit konferenci na tři dny. Věříme, že tak bude vytvořen větší prostor k diskusi nad jednotlivými příspěvky a časově usnadní i Váš návrat domů.

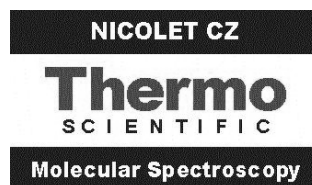
Doufáme, že obsah konference zaujme jak vědecké a výzkumné pracovníky, tak i producenty polysacharidů a společnosti, které aplikují polysacharidy v potravinářských, papírenských, farmaceutických nebo kosmetických výrobcích či při výrobě plastů.

Autory zvaných přednášek jsou přední odborníci ze Spojených států, Itálie a Rakouska. Mezi již tradiční účastníky konference patří vědci z České republiky, ze Slovenska a Polska. Nezbyvá než popřát konferenci úspěch a všem příjemné zážitky v malebné historické části hlavního města České republiky.

Věříme, že 5th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience 2009 se stane součástí aktivit nového uskupení s názvem Euroglycoscience Forum (<http://www.glycosciences.org.uk/>), které se vytvořilo v dubnu ve Štrasburku v rámci organizace European Science Foundation.

Evžen Šárka a Jana Čopíková
za vědecký výbor konference

Organizátoři konference si dovoluují uvést na tomto čestném místě firmy a instituce, které pomohly tuto akci uskutečnit.



ESF EuroGlycoSciences Forum
Research Network Programme

Konference Polysaccharides-Glycoscience zařazená pod číslem 2609 je spolufinancována Evropskou vědeckou nadací (European Science Foundation), jde o aktivitu ESF „The Euroglycoscience Forum“ – Research Network Programme.

INFLUENCE OF YEAST MORPHOLOGY ON THE PROPERTIES OF CELL WALL GLYCOPROTEINS**MARTA BRLEJOVÁ, MILAN ČERTÍK, PETER RAPTA, and VLASTA BREZOVÁ**

*Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic
marta.brlejova@gmail.com*

The work was focused on characterization of properties of cell wall glycoproteins from three yeast strains (*Candida albicans* CCY 29-3-162, *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26, *Pichia pastoris* CCY 34-29-2) growing on different cultivation media. Effect of these environmental conditions on protein/saccharide ratio of glycoproteins was analysed.

Antioxidant capacities as well as radical scavenging properties of isolated glycoproteins were measured by ABTS method and EPR technique, respectively.

NEW METHOD FOR PREPARATION OF CROSSLINKED HYALURONIC ACID DERIVATIVES WITH DIETHYLENTRIAMINE-PENTAACETIC ACID AND THEIR METAL COMPLEXES. SYNTHESIS, EVALUATION AND STRUCTURE ANALYSIS**RADOVAN BUFFA and VLADIMIR VELEBNY**

*CPN spol. s r.o., Dolní Dobrouč 401, 56102 Dolní Dobrouč, Czech Republic
buffa@contipro.cz, velebny@contipro.cz*

Macromolecular conjugates of hyaluronic acid with diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) – metal complexes have been synthesized and characterized by FTIR, NMR, SEC-MALLS and ICP analysis. Several parameters of crosslinking reaction as molecular weight of starting HA, temperature, equivalent of DTPA bis anhydride and reaction time have been studied. Relations between the molecular weight assigned by SEC-MALLS method, reaction parameters and rheological properties of final crosslinking products were investigated.

EXPERIENCE WITH THE ASSESSMENT OF BASIC SUGARS IN CEREAL GRAIN**PETR BUCHER^a and PETR MARTINEK^b**

*^a Potato Research Institute Havlíčkův Brod, Ltd., Laboratory Centre – Laboratory of Analytical Chemistry, Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod, ^b Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Czech Republic
bucher@vubhb.cz*

Contents of saccharose, glucose and fructose in grain and flour of various cereal species were determined using HPLC. These components together with asparagine are precursors of acrylamide (potential carcinogen) production via Maillard reaction. The effect of dissolvents (water, acetonitrile, acetone, ethanol and methanol), possibility of centrifugal separation and problems with changes in analyte concentration during the analysis are discussed. In wheat grain, the content of saccharose varies from 5000 to 10 000 mg kg⁻¹, glucose from 70 to 2000 mg kg⁻¹ and fructose from 80 to 450 mg kg⁻¹.

The study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project MSM6046137305.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ARABINOXYLAN FROM CEREALS**KRZYSZTOF BUKSA**

*Department of Carbohydrate Technology, University of Agriculture, Cracow, Poland
krzysiek_b@onet.eu*

Arabinoxylan isolated from cereals, especially from rye bran consists of α -L-arabinofuranose residues attached as branch-points to β -(1,4)-linked D-xylopyranose polymeric backbone chains; it is a hydrocolloid with interesting properties (high water-holding capacity, forming viscous solutions culminating in gels with high surface activity). Water soluble arabinoxylan e.g. improves bread quality leading to higher bread volume, softer bread crumb structure, longer shelf life and higher fibre content.

AN ARABINO GALACTAN-PROTEIN ISOLATED FROM INSTANT COFFEE POWDER OF *Coffea arabica*

MÁRIA MATULOVÁ^a, PETER CAPEK^{a*}, JÁN KOZÁK^a, LUCIANO NAVARINI^b, and FABIO S. LIVERANI^b

^a Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovakia, ^b Illycaffè S.p.A., Research & Innovation, via Flavia 110, I-34147 Trieste, Italy
chemcape@savba.sk

It is known that polysaccharides – cellulose, galactomannan and arabinogalactan-proteins (AGPs) represent a dominant part of mature coffee beans. AGPs constitute about 15–17 % of dry weight of beans. These macromolecules exist as an extremely heterogeneous mixture of acidic arabinogalactan-proteins. They have a highly branched structure, are glycosylated and possess a large scale of functions in biological processes. They have been recognized as roasted coffee aroma precursors and play an important role in determining some functional properties of coffee brews. Due to their highly branched structures, AGPs can be easily extracted from coffee beans. However, drastic industrial processing conditions during the instant coffee powder preparation causes significant structural modifications in AGP macromolecules including depolymerization of the main and side chains. The extent of degradation depends on industrial conditions used, i.e. roasting, extraction and spray drying processes. Up to now little attention has been dedicated to the study of AGPs modifications in instant coffee prepared from roasted *Coffea arabica* beans^{1,2}.

In the present work we reports on the isolation and structural characterization of AGP from instant coffee powder prepared from roasted *Coffea arabica* beans. Chemical and spectroscopic analyses revealed a high degree of AGP destruction in comparison with AGP from the green coffee. Its native average molecular mass (~ 650 000) was markedly reduced to about 5400. Structural studies on AGP indicated the presence of longer segments of non substituted 1,3-linked β Galp units in the backbone and lower degree of substitution by Ara_f residues in side chains in comparison with the native AGP. The intensity of signals in NMR spectra due to terminal 1,3-linked β Galp units of the backbone as well as α , β Galp residues of the reducing ends confirmed the presence of lower molecular mass fragments of AGP in instant coffee powder.

This work was supported by the Illy Caffè grant, VEGA Grant No. 2/0155/08, and APVV Grant No. 0030/08.

REFERENCES

1. Wolfrom L., Anderson E.: J. Agr. Food Chem. 15, 687 (1967).

2. Capek P., Matulová M., Navarini L., Suggi-Liverani F.: J. Food Nutr. Res. 48, 80 (2009).

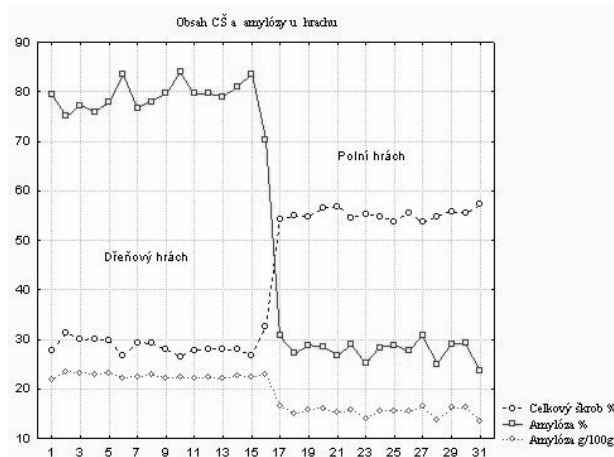
SLEDOVÁNÍ ZMĚN OBSAHU ŠKROBU A REZISTENTNÍHO ŠKROBU U HRACHU

RADMILA DOSTÁLOVÁ a JIŘÍ HORÁČEK

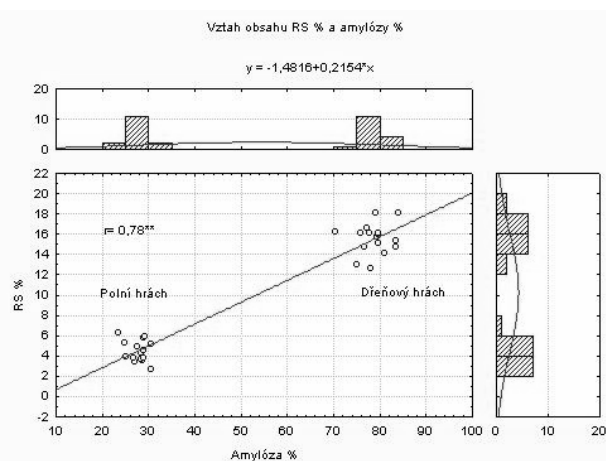
Agritec, výzkum, šlechtění a služby s.r.o., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk, Česká republika
dostalova@agritec.cz

U hrachu zaujímá největší podíl semene škrob. Hrách je možno rozdělit na skupiny: 1. Hrách polní – *Pisum sativum* L. ssp. *sativum* var. *sativum*, který se sklízí v plné zralosti, se vyznačuje kulatými hladkými semeny a oválnými škrobovými zrny 2. Hrách dřeňový – *Pisum sativum* L. ssp. *sativum* var. *medullare* se svrasklými semeny má škrobová zrna paprscitě rozštěpena, sklízí se v technologické zelené zralosti. K složkám, které pozitivně ovlivňují trávicí procesy, patří rezistentní škrob (RS). Englyst a spol.¹ ho definuje jako škrob a jeho degradační produkty, které zdravý člověk není schopný strávit a vsřebat v tenkém střevě. Z literárních zdrojů je zřejmé, že obsah RS závisí na množství amylosy a právě dřeňový hrách má vyšší obsah amylosy, než obilniny nebo pseudoobilniny³. V AGRITEC je k dispozici kolekce genových zdrojů hrachu (kulatosemenného, hrachu se svraštělým povrchem semen a intermediárního hrachu), u kterých byly zjišťovány korelace mezi obsahem škrobu a amylosy, amylopektinu a hrubého proteinu².

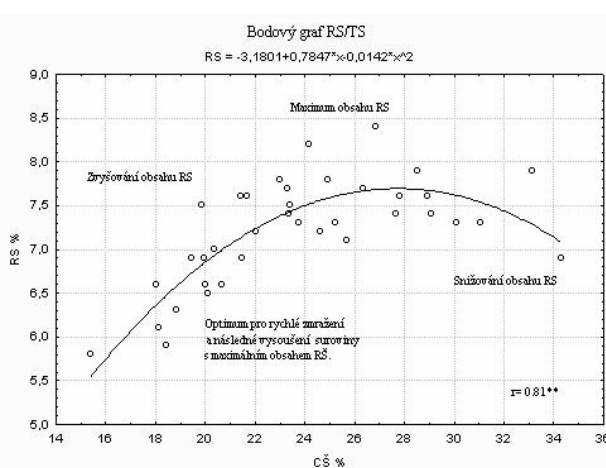
Cílem práce bylo zjistit obsah celkového škrobu, amylosy a rezistentního škrobu v semenech polního a dřeňového hrachu, zjistit a postihnout změny obsahu RS u dřeňového hrachu v různých termínech technologické sklizně.



Obr. 1. Grafické znázornění obsahu celkového škrobu %, amylosy % a v g/100 g sušiny



Obr. 2. Závislost obsahu RS na amylose



Obr. 3. Změny obsahu RS v průběhu dozrávání dřeňového hrachu – 3 termíny sklizně

Obsah celkového škrobu v semenech hrachu byl stanoven metodikou NIRS (Near Infra-Red Spektroskopie). Kalibrace přístroje byla ověřena pomocí série standardních vzorků hrachu se známým obsahem škrobu. Obsah škrobu v těchto standardních vzorcích byl stanovován pomocí komerčního kitu Megazyme (AOAC metoda 996.11).

Stanovení rezistentního škrobu (tj. škrobu, který nepodléhá enzymatické hydrolyze) bylo prováděno pomocí komerčního kitu Megazyme (AOAC metoda 2002.02).

Stanovením obsahu škrobu (2006–2007) polního hrachu byly zjištěny hodnoty v rozmezí 53,61–57,23 %. Tento obsah je dle klasifikační stupnice pro kulatosemenný hrách klasifikován stupněm 7-8-9 (vysoký-velmi vysoký). Průměrný obsah amylosy byl 27,87 % (obr. 1). Obsah RS se pohyboval od 2,68–6,25 %. U dřeňového hrachu byl zjištěn obsah škrobu v rozmezí 26,57–32,55 %. Dle klasifikační stupnice pro dřeňový hrách je klasifikován stup-

něm 4-5-6 (nízký-střední). Průměrný obsah amylosy byl 76,82 % z celkového obsahu škrobu (obr. 1). Obsah rezistentního škrobu se pohyboval v rozmezí 12,64–18,05 % v plné zralosti. V roce 2008 byly obsahy rezistentního škrobu (RS %) ve vzorcích dřeňových hrachů výrazně nižší než v předchozích ročnících. Obsah rezistentního škrobu v osivu kolísal v rozmezí 4,45–5,4 % RS v sušině.

Byly sledovány vztahy mezi obsahem amylosy a obsahem rezistentního škrobu u polního a dřeňového hrachu. Pomocí korelační analýzy byla zjištěna vysoce průkazná závislost obsahu amylosy a rezistentního škrobu u obou typů hrachů. Obsah RS na amylose lze vyjádřit vysoce průkazným korelačním koeficientem $r = 0,74^{**}$, což odpovídá mnoha literárním zdrojům^{4,5} (obr. 2). Podobně byla zjištěna i závislost celkového škrobu a RS, kdy korelační koeficient dosáhl hodnoty $r = -0,94^{**}$.

U dřeňového hrachu byly porovnávány obsahy RS ve třech termínech technologické sklizně.

Obsah RS nejdříve stoupá a dosahuje u některých kultivarů maximálních hodnot. Dále jeho obsah zřejmě stagnuje a později výrazně poklesne. Ve zralém semenu pak až na průměrnou hodnotu 4,84 % (obr. 3).

Tato práce byla podpořena grantem Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR MSM 2B06085 a MSM 2678424601.

LITERATURA

1. Englyst H., N., Kingman J. H., Cummings J. H.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 46, 33 (1992).
2. Hýbl M., Urban J., Václavíková J., Griga M.: *Czech J. Genet. Plant Breed.* 37, 114 (2001).
3. Mikulíková D., Čičová I., Antalíková G., Kraic J.: *Czech J. Genet. Plant Breed.* 41, 96 (2005).
4. Sajilata M. G., Singhal Rekha S. Kulkarni Pushpa R.: *Resistant Starch—A Review. Comprehensive reviews in food Science and Food Safety.* Vol. 5, str. 1. 2006.
5. Vasanthan T., Bhatta R. S.: *Starch* 50, 275 (1998).

INFLUENCE OF AGEING ON PROPERTIES OF STARCH – CLAY NANOCOMPOSITES

PETR DUCHEK^{a*}, JAROMÍR DLOUHÝ^a, MILENA ŠPÍRKOVÁ^b, ADAM STRACHOTA^b, and RADOMÍR ČERSTVÝ^a

^a University of West Bohemia, Faculty of Mechanical Engineering, Univerzitní 20, 306 14 Plzeň, ^b Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, Czech Republic
duchekpe@kmm.zcu.cz

Nanocomposites based on thermoplastic cationized starches and sodium montmorillonite were prepared. Both mechanical properties of the product and its structure

proved that cationization of the starch matrix lowers the tensile strength and the modulus. On the contrary, ageing of the thermoplastic starch itself and its low-cationized derivative improves its mechanical properties expresively. The clay nanofiller generally increases the strength of the material even at low concentrations.

The authors wish to thank the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (TIP grant No. FR - TII/566) for financial support.

LIGHT MICROSCOPY AND IMAGE ANALYSIS AS A SUITABLE SCREENING METHOD FOR CHARACTERIZATION OF WHEAT STARCH GRANULES

VÁCLAV DVOŘÁČEK*, JAN LUKÁŠ, DAVID NOVOTNÝ, and LUDMILA PAPOUŠKOVÁ

*Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Prague 6 - Ruzyně, Czech Republic
dvoracek@vurv.cz*

The light microscopy with subsequent image analysis was used for characterization of starch granules in two model doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) differing in the presence or the absence of 1B/1R rye translocation. There were analyzed more than 12 000 starch granules of each sample and verified an optimal number of starch granules for obtaining of representative results about size and shape distribution of starch granules. There were found out that the optimal number of analyzed starch granules should exceed more than 4000 granules. We confirmed the typical bimodal starch distribution in the wheat samples as well. In spite of high genetic similarity between the both lines there were detected the significantly higher value of circularity in the translocated wheat line (L110) and the trend of higher diameter average of starch granules in the wheat line (L159) characterized by the absence of 1B/1R translocation.

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Projects No. IG58076.

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI ŠKROBU U TRITIKALE

OLDŘICH FAMĚRA^a, MARKÉTA MAYEROVÁ^b, JAN LIPAŤSKÝ^b, BOŽENA RILJÁKOVÁ^a a LENKA KOUŘIMSKÁ^a

^a Česká zemědělská univerzita v Praze, ^b Výzkumný ústav rostlinné výroby v Praze, v.v.i., Česká republika
famera@af.czu.cz

Tritikale je plodinou s vysokým obsahem škrobu. Výrobky ze škrobu se uplatňují při nejrůznějších potravi-

nářských a nepotravinářských průmyslových výrobcích. Vzhledem ke špatné vypíratelnosti lepku u tritikale bude jeho uplatnění spíše pro kvasné technologie, především pro výrobu ethanolu. Zvýšená spotřeba ethanolu je vyvolána zavedením přidávání ethanolu do automobilového benzínu.

V maloparcelkových pokusech (sklizeň 2007 a 2008) s odrůdami tritikale ozimého (Kitaro, Lamberto, Lupus, Ticino, Tricolor) byly uplatněny 2 intenzity pěstování: úsporná (90 kg N ha⁻¹) a intenzivní (120 kg N ha⁻¹ a 1 fungicid). Pokusy byly založeny na třech stanovištích v bramborářské výrobní oblasti (Humpolec, Lukavec, Pernolec) a na jednom stanovišti v picinářské výrobní oblasti (Vysoké n. Jiz.).

Podmínky pro tvorbu škrobu v zrna tritikale byly v obou ročních příznivé a bylo dosahováno obdobného obsahu škrobu v zrna, v roce 2007 v průměru 68,6 %, v 2008 69,0 %. Mezi zkoušenými odrůdami byly zjištěny rozdíly mezi dvěma skupinami odrůd. V průměru celého pokusu dosahovaly vyššího obsahu škrobu Lupus 69,4 %, Ticino 69,3 % a Tricolor 69,1 %. Odrůdy Lamberto 68,3 % a Kitaro 68,2 % měly o 1 % hodnoty nižší, a to jak při nižší, tak i při zvýšené dávce dusíkatého hnojení. Dvě varianty pěstitelské technologie se lišily především dávkou dusíku. Projevil se protiklad s dusíkatými látkami v zrna. Zvýšené dusíkaté hnojení (intenzivní technologie) snižovalo v obou letech obsah škrobu o 0,4 %. Nejvíce se tento trend projevil na nejméně úrodném stanovišti ve Vysokém, kde rozdíl činil 1,2 % ve prospěch nižšího hnojení dusíkem. Mezi dalšími pokusnými místy nebyl zjištěn průkazný rozdíl 68,4 % (Lukavec) až 69,0 % (Pernolec a Humpolec).

Také výnosově dopadly v průměru oba ročníky podobně – 2007 8,15 t ha⁻¹ a 2008 8,10 t ha⁻¹. Významně se lišily technologie pěstování. Zvýšená dávka dusíku podpořila výnos zrna o 0,91 t ha⁻¹. Nevýznamně vyšší výnosy poskytly odrůdy Lamberto a Lupus 8,66 t ha⁻¹, dále Kitaro 8,50 t ha⁻¹, Ticino 8,47 t ha⁻¹. Nejnižší výnos byl u odrůdy Tricolor 6,50 t ha⁻¹.

Při hodnocení hektarového výnosu škrobu byl rozhodující výnos zrna u jednotlivých variant pokusu, protože rozdíly obsahu škrobu v zrna byly malé. Průměrné hektarové výnosy škrobu byly proto vyšší u variant s vyšší dávkou dusíku o 0,49 t ha⁻¹. Významně se odlišila odrůda s nízkým výnosem zrna Tricolor 4,39 t ha⁻¹ škrobu. U ostatních odrůd byl výnos škrobu v užším rozmezí 0,14 t ha⁻¹, Lamberto 5,92 t ha⁻¹, Ticino 5,86 t ha⁻¹, Lupus 5,81 t ha⁻¹, Kitaro 5,78 t ha⁻¹.

Práce vznikla za podpory projektu NAZV č. IG57056 a výzkumného záměru MSM 6046070901.

SORPTION PROPERTIES OF PLUM PUREE EDIBLE FILMS: EFFECT OF APPLE PUREE AND WHEY PROTEIN ISOLATE

EBRU FIRATLIGIL-DURMUS, and OZGUL EVRANUZ

*Istanbul Technical University, Food Engineering Department, Istanbul, Turkey
ebruf@itu.edu.tr*

An edible film is defined as a thin layer of edible material formed on a food as a coating or between food components.

Edible films, by regulating transfer of moisture, oxygen, carbon dioxide, lipid, aroma and flavor compounds in food systems, can increase food product shelf-life and improve food quality. Although the use of edible films in food products may seem new, the idea of edible films and coatings has intrigued packaging and food scientists for a long time. For instance, during the twelfth and thirteenth centuries, dipping of oranges and lemons in wax to retard water loss was practiced in China. Edible films and coatings find use in variety of applications including casings for sausages, chocolate coatings for nuts and fruits, and wax coatings for fruits and vegetables.

The use of fruit puree is increasing because of its functional properties in food processing and storage. High fruit production, to be low cost source, to be easy to process and to use as natural, healthy food additive are increasing its importance.

Objectives of this research were to (1) obtain edible film that increased shelf life from plum puree, (2) determine the effect of apple puree and whey protein isolate addition (10, 30 and 50 % of plum puree's dry matter) on sorption properties of films.

REFERENCES

1. Alhamdan A. M., Hassan B. H.: *J. Food Eng.* 39, 301 (1999).
2. Iglesias H. A., Chirifie J.: *Handbook of Food Isotherms: Water Sorption Parameters for Food and Food Components*. Academic Press, Florida 1982.
3. McHugh T. H., Huxsoll C. C., Krochta J. M.: *J. Food Sci.* 61, 88 (1996).
4. McHugh T. H., Krochta J. M.: Permeability Properties of Edible Films, in *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, (Krochta J. M., Baldwin E. A., ve Nisperos-Carriedo M. O., ed.), pp. 139–189. Technomic Publishing Inc., USA 1994.

MODIFIED HYALURONIC ACID HYDROGELS

MARCELA FOGLAROVA and VLADIMIR VELEBNY

*CPN spol. s r.o., Dolní Dobrouč 401, 56102 Dolní Dobrouč, Czech Republic
foglarova@contipro.cz, velebny@contipro.cz*

Tyramine-substituted hyaluronan is a promising substance for tissue engineering and other applications. Hydrogel is formed after enzyme and hydrogen peroxide is added. Present results indicate that tyramine substitution of about 5 % is sufficient for preparation of material with interesting mechanical and biological properties. Cells encapsulated within hydrogel during cross – linking reaction remain metabolic active for at least 10 days of culture.

THE MULTIVARIATE ANALYSIS OF VIBRATIONAL SPECTRA OF WOOD MUSHROOMS OF GENERA *Phellinus* AND *Inonotus*

KARIKOGA GORDON GOMBA^{a*}, JANA ČOPIKOVÁ^a, MICHAEL TOMŠOVSKÝ^b, and ANDRIY SYNYTSYA^a

*^a Institute of Chemical Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6, ^b Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic
gkgomba@vscht.cz*

A set of samples (fruit bodies and submersion cultures) originated from wood mushrooms of genera *Phellinus* and *Inonotus* were analysed by FT-IR (transmittance of KBr pellets, ATR) and FT-NIR (diffuse reflectance) spectroscopy. Purification of some samples by washing with dilute HCl in 80% ethanol led to some spectroscopic changes, which were more pronounced for submersion cultures. Normalised spectra were used for hierarchy cluster analysis (HCA), and second derivatives (SD) of these spectra for principal component analysis (PCA). Fruit bodies and submersion cultures were successfully discriminated by HCA (Ward method, Manhattan distances) and by a principal component (PC) 1, which accounted for 46 % (FT-IR transmittance), 61 % (FT-IR ATR) and 78 % (FT-NIR) of the variation in all variables. The major PC1 extremes contributing to discrimination were assigned to proteins, aromatics and polysaccharides. Raw and purified submersion cultures of genus *Phellinus* were discriminated by PC2. The combination of PC1 and PC3 allowed fruit bodies of genera *Phellinus* and *Inonotus* to be discriminated mainly due to the differences in the contribution of aromatics and polysaccharides, while discrimination of *Phellinus* species was unsuccessful.

This work was supported by the by the Czech Science Foundation (project 52 /07/J03) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM 6046137305).

CHARACTERIZATION OF STARCH-CONTAINING CERAMIC SUSPENSIONS AND CERAMIC GREEN BODIES PREPARED BY STARCH CONSOLIDATION CASTING

EVA GREGOROVÁ^a, ZUZANA ŽIVCOVÁ^a, WILLI PABST^a, and MARTIN ČERNÝ^b

^a Institute of Chemical Technology, Prague (Department of Glass and Ceramics), Technická 5, 166 28 Prague 6,

^b Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, V Holešovičkách 41, 182 09 Prague 8, Czech Republic
Eva.Gregorová@vscht.cz

This work deals with the characterization of unfired bodies (so-called green bodies) of alumina (Al₂O₃) ceramics prepared by the starch consolidation casting technique. Three native starch types (potato, corn and wheat starch) have been used and the influence of the type and amount of starch on the strength and shrinkage of the as-prepared samples is studied. Part of the work is a rheological study of ceramic suspensions with different starch types.

ANALYSIS OF MIXED-LINKED (1→3)(1→4)-β-D-GLUCAN IN WHEAT CULTIVARS (*Triticum aestivum* L.) AND POSSIBILITIES OF ITS UTILIZATION

MICHAELA HAVRLETOVÁ^{a*}, SVETLANA ŠLIKOVÁ^a, VALÉRIA ŠUDYOVÁ^a, PAVOL HAUPTVOGEL^a, and ALENA BURGÁROVÁ^b

^a Slovak Agricultural Research Centre-Research Institute of Plant Production Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68, Piešťany, Slovak Republic, ^b Department of Nutrition and Food Evaluation, Faculty of Chemistry and Food Technology, Slovak University of Technology Bratislava, Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slovak Republic
havrlentova@vurv.sk

On the field experiment in the locality of the Slovak Agricultural Research Centre-Research Institute of Plant Production Piešťany (Slovak Republic) a set of both Slovak landraces and Slovak modern cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) was grown in the year 2008. Grain samples of 16 landrace cultivars (Šamorínska, Bučianska červenoklasá, Bučianská V.T. 16, Bučianská 316, Košútská, Radošinská Dorada, Radošinská Karola, Radošinská Norma, Radošinská poloranná 562, Radošinská ranná 594, Slovenská B, Slovenská 2, Slovenská 777, Trebišovská 76,

Vígľašská červenoklasá, and Vrakúnská) and 15 modern ones (Ilona, Ignis, Viador, Pavlína, Torysa, Zerda, Veldava, Markola, Stanislava, Venistar, Verita, Solara, Vanda, Alacris, and Genoveva) were analyzed in two duplications for the β-D-glucan content enzymatically by Megazyme assay kits.

The average content of β-D-glucan was in Slovak wheat cultivars 0.71 %. Modern cultivars disposed of 0.58 % of β-D-glucan. Higher amounts (0.84 % in average) were showed in landraces, what was 31 % more than in modern cultivars. Cultivars with the highest content of β-D-glucan (Košútska, Radošinská Dorada, and Radošinská Karola with the content > 1.00 %) can be used in breeding programme and seed processing in food industry as a convenient raw material for production of functional foods.

In view of consumers' requirements for healthy nutrition, the food industry regulates the development of new products directed to functional foods and ingredients. Functional foods are eatables which provide besides their initial function (satiation and nutrition of the organism) also the health benefit to a consumer. The functional food must fulfil the following requirements: it must be a food consisting of natural components and not a tablet or powder; it can and should be consumed as part of the daily meals; its special regulation lies in regulating the particular process ongoing in the human organism. A certain portion in the production of functional foods should be created by foods, which are naturally enriched with vitamins, minerals, antioxidants, suitable enzymes, etc.

For preparation of functional foods either the addition of natural raw material with beneficial quality parameters or supplementation of isolated parts (β-D-glucan hydrogels for example) is possible. The aim of our next experiments was the microbiological and sensoric evaluation of food (bread and ketchup) with the addition of β-D-glucan hydrogels isolated from wheat. The sensoric evaluation of bread was done by six evaluators. In addition to the positive sensoric and microbiological influence of β-D-glucan, the rheological behaviour and water activity was monitored with the results that the addition of the given hydrogels moderately decreased the water activity. The tomato ketchup was warehoused at laboratory temperature for 180 days and subsequently a sensoric evaluation of the influence of hydrogels addition on warehousing and the sensoric quality was done. Lastly, the microbiological purity of the food was controlled.

The results showed that cereal hydrogels addition to food does not influence the food quality negatively and therefore it is perspective in further exploitation for preparing new, health-beneficial forms of food. Based on the experimental results, it can be concluded that the addition of β-D-glucan can contribute to improve not only the sensoric quality but also the health aspect of the types of food mentioned in this work. Moreover, the addition of β-D-glucan positively affected the rheological properties of the bread dough and also contributed to softening of the acid taste of ketchup, which could be exploited in producing

new innovated products. Consumption of these innovated products, especially bread, could have a preventive effect on the civilization diseases linked with food.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0770-07 and No. APVV-SK-CZ-0028-07.

CONTENT OF (1→3)(1→4)- β -D-GLUCAN IN WHEAT CULTIVARS AFTER ARTIFICIAL INFECTION WITH FUNGI *Fusarium culmorum* SACC.

MICHAELA HAVRENTOVÁ*, SVETLANA ŠLIKOVÁ, VALÉRIA ŠUDYOVÁ, and PAVOL HAUPTVOGEL

*Slovak Agricultural Research Centre-Research Institute of Plant Production Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic
havrentova@yuvr.sk*

The wheat spikes of 16 landrace cultivars (Šamorínska, Bučianska červenoklasá, Bučianská V.T. 16, Bučianská 316, Košútská, Radošinská Dorada, Radošinská Karola, Radošinská Norma, Radošinská poloranná 562, Radošinská ranná 594, Slovenská B, Slovenská 2, Slovenská 777, Trebišovská 76, Vigľašská červenoklasá, and Vrakúnská) and 15 modern ones (Ilona, Ignis, Viador, Pavlína, Torysa, Zerda, Veldava, Markola, Stanislava, Venistar, Verita, Solara, Vanda, Alacris, and Genoveva) were inoculated with conidial suspensions of *Fusarium culmorum* isolate in the field during flowering in the year 2008. The inoculation of cultivars contained a highly pathogenic isolate from the area of Radošina, *Fusarium culmorum* (RA/02), and originates from the microorganism collection held at the Research Institute of Plant Production in Piešťany. At anthesis, twenty-five spikes from each cultivar were sprayed (block 1) with *Fusarium culmorum* and were covered for 24 hours with a yellow bag. The spikes were visually evaluated on a 0–100 % scale at 10, 15, and 20 days after inoculation. After ripening, twenty-five spikes were harvested manually from each plot of blocks (block 1. inoculated, block 2. uninoculated). The areas under disease progress curves (AUDPC) were computed, β -D-glucan and deoxynivalenol (DON) content in grains were determined using Megazyme and Ridascree® Fast DON assay kits.

The average content of β -D-glucan was in Slovak wheat cultivars from uninoculated block 0.71 % and from inoculated block 0.46 %, respectively. Modern cultivars disposed of 0.58 % β -D-glucan from uninoculated block and 0.40 % from inoculated block. The content of β -D-glucan was in landraces cultivars 0.84 % from uninoculated block and 0.51 % from inoculated variant. The modern cultivars had 21.6 % less of monitored polysaccharide than landraces cultivars from inoculated block. Cultivar

Šamorínska disposed of the highest content of β -D-glucan (0.66 %). The lowest β -D-glucan contents were in modern cultivars, mostly in Verita, Veldava, and Markola. The highest reduction in β -D-glucan content was in landrace cultivar Košútská (59 %) and the minimal reductions (< 5 %) were in modern cultivars, mainly in Vanda, Alacris, and Genoveva.

The mean AUDPC value for tested cultivars was 470. The mean AUDPC value was lower (308.6) for landraces than for modern cultivars, where the mean value was 642.2. The average kernel contamination with DON was 34.4 mg kg⁻¹. The landrace cultivars accumulated 67.4 % less DON than modern ones. The DON accumulation in landrace cultivars was in the range from 1.6 mg kg⁻¹ to 48.6 mg kg⁻¹. The low DON contents were in Radošinská Norma, Radošinská ranná 594, and Radošinská Dorada. On the other hand, high DON contents were in Vigľašská červenoklas and Bučianska 316 detected. The range of DON accumulation was in landrace wheat cultivars between 23.2 mg kg⁻¹ and 143.1 mg kg⁻¹. High DON contents were in cultivars Veldava, Ignis, and Vanda and low in Solara and Genoveva.

The explanation for the β -D-glucan decreasing in infected material is that most parasitic biotrophs derive nutrients from shoot tissue and have no alternative energy sources¹ and therefore they appear to absorb nutrients from the host plant, mostly β -D-glucan, a storage polysaccharide used as a source of energy and material² in mature cereal grains. Another explanation could be that in cereal grains β -glucanases are involved in a variety of physiological processes such as the defense against pathogens³ and this enzyme is able to degrade the (1→3)(1→4)- β -D-glucan present in the cell walls of the Gramineae grass species.

These preliminary results obtained from the grain analysis of wheat landrace and modern cultivars showed that content of β -D-glucan decrease after artificial inoculation with fungi (*Fusarium culmorum*). There was also a positive relationship between the content of β -D-glucan and resistance to *Fusarium culmorum* in AUDPC values and DON accumulation observed. Landraces dispose of higher β -D-glucan content and showed higher resistance in comparison to modern wheat cultivars what is compared to the association of avenantramide⁴ and β -D-glucan⁵ concentration in oat grain with crown rust incidence and genetic resistance.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. „APVV-SK-CZ-0028-07“.

REFERENCES

- Schulze-Lefert P., Panstruga R.: *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 641 (2003).
- Hoson T. J.: *Plant Res.* 115, 277 (2002).
- Simmons C. R.: *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 325 (1994).
- Wise M. L., Doehlert D. C., McMullen M. S.: *Cereal Chem.* 85, 639 (2008).

5. Havrlentová M., Masár Š., Gubiš J.: *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2008*: kniha příspěvků. 216 (2008).

DEFORMATION CURVES IN TENSILE TESTS OF β -GLUCAN FILMS

ANNA HEJLOVÁ and JIŘÍ BLAHOVEC

Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 Suchbátka, Czech Republic
hejlova@tf.czu.cz

Mechanical properties of β -Glucan (hereafter β -glucan) foils were studied in tensile tests, using the testing machine Instron. The basis of these tests is deformation curve, obtained at constant deformation rate. A considerable portion of nonelastic deformation was observed in all cases. Basic parameters derived from the curves as the tensile strength, elongation and moduli were examined. The deformation curves were analysed by the Bluehill software and by Excel. Various methods of Young's modulus computation were discussed.

This work was supported by the Czech Science Foundation (project 525/09/1133) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6046070905).

LIEHOVARNÍCKE VYUŽITIE FRAKCIÍ KUKURICE

VIERA HORVÁTHOVÁ^a, HANA NOVANSKÁ^a, VLADIMÍR ONDÁŠ^a a DANIELA MIKULÍKOVÁ^b

^a Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, ^b Výskumný ústav rastlinnej výroby SCPV, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika
viera.horvathova@ucm.sk

Kukurica má v rámci obilnín významné postavenie. Má vysoký potenciál úrodnosti a je vhodná pre izoláciu škrobu i výrobu liehu. Z pohľadu svetovej i domácej produkcie sa zaradila medzi najdynamickejšie sa rozvíjajúce plodiny. Etanol sa dá z kukurice vyrobiť zo zrnovej aj lignocelulózovej časti, avšak predfermentačná úprava je rôzna¹⁻³. Práca sa zaoberá výrobou etanolu z vlákniny vznikajúcej ako odpad pri výrobe kukuričného škrobu (5% obsah škrobu) a zo zošrotovaného kukuričného zrna (61% obsah škrobu). 10% suspenzia sušiny týchto substrátov bola hydrolyzovaná prípravkom termostabilnej α -amylázy pri 120 °C, pululanázou a glucoamylázou pri 60 °C. Enzý-

movou hydrolyzou kukuričného šrotu sme získali 716,3 mg glukózy/g sušiny, hydrolyzou vlákniny z 1 gramu sušiny to bolo 69,2 mg glukózy. Zo škrobového hydrolyzátu, ktorý sa podrobil etanolovej fermentácii za použitia kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* CCY-11-3 sme získali 0,46 g etanolu/g glukózy v prípade kukuričného šrotu a 0,48 g etanolu/g glukózy v prípade vlákniny. Tuhý podiel po enzýmovej hydrolyze bol pred fermentáciou oddelený filtráciou a spracovaný: (1) kyslou hydrolyzou koncentrovanou H₂SO₄ alebo HCl pri 120 °C, (2) hydrolyzou pôsobením multienzymového prípravku (zmes celulózy, arabinázy, β -glukanázy, hemicelulózy a xylanázy) a (3) predhydrolyzou koncentrovanou H₂SO₄ alebo HCl pri 120 °C s následnou hydrolyzou pôsobením multienzymového prípravku. Najvyšší výtťažok redukujúcich sacharidov – 586,7 mg g⁻¹ sušiny vlákniny a glukózy – 116,7 mg g⁻¹ sušiny vlákniny bol dosiahnutý po kyslej predúprave s HCl. Na fermentáciu lignocelulózoých hydrolyzátoov boli použité kvasinky *Pichia stipitis* CCY 39-50-1 alebo *Candida shehatae* CCY 29-68-4. V prípade kvasiniek *Pichia stipitis* CCY 39-50-1 sa množstvo etanolu pohybovalo v intervale od 0,38 do 0,43 g bezvodého etanolu na 1 g redukujúcich sacharidov. V prípade kvasiniek *Candida shehatae* CCY 29-68-4 sa množstvo získaného etanolu pohybovalo v intervale od 0,10 do 0,16 g bezvodého etanolu na 1 gram redukujúcich sacharidov.

V tejto práci bola taktiež uskutočnená simultánna sacharifikácia a fermentácia kukuričného šrotu. 10% suspenzia bola v prvom kroku stekutená termostabilnou α -amylázou pri 120 °C, v druhom kroku prebehlo 30 minútové predscukrenie pululanázou, glucoamylázou a multienzymovým celulózoým prípravkom pri 60 °C. Množstvo bezvodého etanolu dosiahnuté po fermentácii hydrolyzátu kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* bolo 0,51 g na 1 g sušiny kukuričného šrotu, použitím kvasiniek *Pichia stipitis* CCY 39-50-1 to bolo 0,44 g a kvasinkami *Candida shehatae* CCY 29-68-4 sa získalo 0,34 g etanolu/g sušiny kukuričného šrotu.

Práca vznikla za finančnej podpory projektu APVV LPP-0251-07.

LITERATÚRA

- Cardona A. C., Sánchez J. Ò.: *Bioresour Technol.* 98, 2415 (2007).
- Atkin D. E., Rigsby L. L.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 144, 59 (2008).
- Sun Y., Cheng J.: *Bioresour. Technol.* 83, 1 (2002).

POTENTIAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF WATER SOLUBLE POLYSACCHARIDES OF THE OIL PUMPKIN BIOMASS

ZUZANA KOŠŤÁLOVÁ, ZDENKA HROMÁDKOVÁ, ANNA EBRINGEROVÁ, and JÁN HIRSCH

*Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia
chemhrom@savba.sk*

Polyphenols and carotenoids exhibit potent radical scavenging activity. Carotenoids¹, fat-soluble plant pigments, are commonly found in fruits and vegetables, those with the strongest colors being the healthiest. In human organism, carotenoids play two primary roles: exert antioxidant activity, but some are also converted into vitamin A. Considerable antioxidant activity has been also reported with polyphenols and those conjugated with polysaccharides².

Pectic polysaccharides, cell-wall components, have recently been shown to exert an antioxidative effects^{3,4}. The polysaccharide conjugate extracts from green tea possessed antioxidant activity even after most of the components that produce interference were removed⁵. The uronic acid content of different fractions was quantified, and polysaccharides with high uronic acid content had stronger reactive oxygen species scavenging activities. Rao et al.⁶ suggested, that apart from phenolic acids, the presence of sugars with >C=O (uronyl/acetyl) groups and degree of polymerization impart strong antioxidant activity to the polysaccharides.

The pumpkin belongs to the family Cucurbitaceae. Three of these, *Cucurbita maxima* Duchense, *Cucurbita moschata* Duchense and *Cucurbita pepo* L. represent economically important species. The most important technological indices of pumpkin fruits are dry matter, the content of soluble solids and carotenoids¹. Strong correlation between the total carotenoids content of pumpkin fruits and antioxidative activity was found⁷. The fruit biomass of pumpkins, after removing seeds, contains next to pectin a large variety of other biologically active compounds⁸. Nara et al.³ evaluated the antioxidant activity of water soluble polysaccharides extracted from *Cucurbita maxima* Duchense. The samples contained no polyphenols, suggesting that the DPPH radical scavenging activity was caused by polysaccharides rather than antioxidative polyphenols. The antioxidant efficiency was enhanced proportionally to the total sugar content.

The standard pumpkin (*Cucurbita pepo* L) and the hull-less oil pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. *Styriaca*) are economically important horticultural plants in Slovakia. The scope of this work was to study antioxidant activities of the polysaccharide fractions isolated from the seeded pumpkin of both fruits. The biomasses were dewatered by drying on air and by solvent exchange with ethanol. The

polysaccharide fractions were extracted using sequential extraction (water and 1 % NaOH) and/or by three-step extraction procedure using 0.1M EDTA, 1 % and 5 % NaOH as extractants. Short ultrasound treatments at various conditions were applied in the first step. Fractions extracted by alkali showed the highest antioxidant activity by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. These samples possessed also significant antioxidant effects in the DPPH radical scavenging test. This work will focus on the main components and structure of extracted polysaccharides from pumpkin in connection with their antioxidant activity.

Grant SAV-FM-EHP-2008-03-05 and the Slovak Grant Agency VEGA, grant No. 2/0062/09 financially supported this work.

REFERENCES

- Gajewski M., Radzanowska J., Danilcenko H., Jariene E., Cerniauskiene J.: Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 36, 73 (2008).
- Ohkami H., Tazava K., Kobayashi K., Fujimaki M.: J. Exp. Clin. Cancer Res. 165, 33 (1997).
- Nara K., Miyoshi T., Honma T., Koga H.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 1486 (2006).
- Yang X., Zhao Y., Lv Y.: J. Agric. Food Chem. 55, 4684 (2007).
- Chen H., Zhang M., Xie B.: J. Agric. Food Chem. 52, 3333 (2004).
- Rao R. S. P. R., Muralikrishna G.: Phytochemistry 67, 91 (2006).
- Paulauskiene A., Danilcenko H., Jariene E., Gajewski M., Seroczynska A., Szymczak P., Korzeniewska A.: Veg. Crops Res. Bull. 65, 137 (2006).
- Caili F., Huan S., Quanhong L.: Plant Foods Hum. Nutr. 61, 70 (2006).

KOMPOSITNÍ MOUKY – CHARAKTERISTIKY ŠKROBU A PEČIVA

MARIE HRUŠKOVÁ, IVAN ŠVEC, MICHALA KUBALOVÁ, MARKÉTA BACHANOVÁ a TATÁNA HOFMANOVÁ

*Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
Marie.Hruskova@vscht.cz*

Pšeničná mouka světlá jako základní surovina pro výrobu pečiva může být upravena přidávkou netradičních plodin (vytvoří tzv. kompozitní mouky) s cílem získat cereální výrobky srovnatelné kvality s vyšší nutriční hodnotou. V pekařské technologii patří škrob k důležitým složkám pšeničné mouky a jeho chování při zahřívání závisí na mnoho vnějších a vnitřních faktorech. Změny vlastností škrobové suspenze ve třech fermentačních fázích pekařského procesu mají vliv na vlastnosti finálního vý-

robku a uplatňují se také v procesu pečení. Přidavky 10 a 20 % prosa, kukuřice, pohanky, sóji, lupiny, amarantu a quinoi k pšeničné mouce světlé vznikají různé druhy kompozitní mouky s nutričním přínosem pro výrobu netradičních pekařských výrobků.

Amylograf jako uzančení rotační viskozimetr firmy Brabender (ICC 126/1) popisuje změny chování moučné suspenze v rotující nádobě při konstantním zvyšování teploty. Pekařský pokus podle interní metodiky umožňuje připravit pečivo za standardních podmínek a posoudit jeho objektivní (měrný objem, plocha řezu, penetrace) i smyslové charakteristiky (model pro senzoričnou analýzu). Získané amylografické křivky zachycují průběh změny viskozity kompozitní mouky v závislosti na množství a druhu netradiční plodiny. Ve srovnání s pšeničnou moukou světlou byl zjištěn příznivý vliv 10% přídavku sledovaných plodin na vlastnosti finálního výrobku. Vyšší koncentrace prosa, sóji, lupiny, amarantu a quinoi naopak negativně ovlivnila amylografické maximum i senzoričké charakteristiky pečiva.

FIRST EXPERIENCE WITH CULTIVATION OF HIMEMATSUTAKE MUSHROOM (*Agaricus brasiliensis*) IN THE CZECH REPUBLIC

IVAN JABLONSKÝ, RUDOLF RYZNER,
and MILAN LIBICH

Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic
I.Jablonsky@seznam.cz

This mushroom was found in Brazil in 60ties last century and later on it became matter in issue of taxonomic studies. Originally the fungus was named *Agaricus blazei* Murill, however, the identification was changed by Wasser et al. (2002) as *A. brasiliensis* Wasser et al. Nevertheless, Kerrigan (2005) insisted on the name *A. subrufescens* Peck. However, the most widely used name now is *Agaricus brasiliensis*.

Glucans isolated from fruit bodies of the mushroom are sources for preparation of different nutraceuticals. The structure of glucans and their significant health effects were published in series of papers (e.g. Mičková and Synytsya et. al. 2006).

Because of the shortage of information dealing with cultivation of this mushroom, we established a series of growing experiments. Based on existing information, that the fungus can be grown on the same compost with the same casing soils that are used for *A. bisporus* cultivation. In the period of spawn running the temperature was kept at 24–26 °C and for fructification support the temperature fluctuation between 22 °C and 25 °C was set at 12 hour intervals; the illumination was set to 50–100 Lux.

To determinate optimal fruit body setting condition and the yield, three variants were carried out. In the first variant colonized casing soil was ruffled, in the second variant the patches of mycelia on casing surface were covered by low layer of casing soil, while control plot was untreated. Date of the first harvest and total yields on different variants were compared. The ruffling showed to have significantly negative effect on the mushroom production.

It was also found out, that *A. brasiliensis* differs from *A. bisporus* in the way of pinning. Whereas in *A. bisporus* visible nodules develops on mycelium and subsequently smooth primordia are formed, on *A. brasiliensis* culture disorganized primordia under the casing surface. The wrinkle-shaped primordia of *A. brasiliensis* are gradually turning to fruit bodies with regular shape and smooth pileus surface.

This work was supported by NAZV Agency (Project QH 82173).

REFERENCES

1. Kerrigan R. W.: *Agaricus Subrufescens, a Cultivated Edible and Medicinal Mushroom, and its Synonyms*, 2005, vol. 97, 12–24.
2. Mičková K., Synytsya A., Čopíková J.: Chem. Listy 100, 839 (2006).
3. Wasser S. P., Didukh M. Y, de Meijer A.: Int. J. Med. Mushrooms 4, 267 (2002).

CONTENT OF CARBOHYDRATE COMPOUNDS IN CANNED EDIBLE MUSHROOMS

GRAŻYNA JAWORSKA, EMILIA BERNAS,
and RADOŚLAWA SKOCZEŃ-SŁUPSKA

Department of Raw Materials and Fruit and Vegetable Processing, University of Agriculture, Balicka 122 Str. 30-149 Krakow, Poland
rrgjawor@ar.krakow.pl

The contents of total carbohydrates, total sugars, dietary fibre—including soluble and insoluble fractions, chitin, chitosan and beta-glucanes in the canned pilei of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Boletus edulis* were compared. The total carbohydrates constituted 63–72 % of dry matter with the highest contribution of total dietary fibre together with its insoluble fraction and chitin. Except for chitosan content, these values were the highest in the canned *P. ostreatus*.

THE CONTENT OF SELECTED CARBOHYDRATES IN THE FRESH AND COOKED SEVERAL VARIETIES OF IMMATURE SEEDS FLAGEOLET BEANS TYPE

JACEK SŁUPSKI, JACEK ACHREM-ACHREMOWICZ, ZOFIA LISIEWSKA, and GRAŻYNA JAWORSKA

*Department of Raw Materials and Fruit and Vegetable Processing, University of Agriculture, Balicka 122 Str. 30-149 Krakow, Poland
rrgjawor@ar.krakow.pl*

The aim of the work was the evaluation of total sugars, starch and dietary fiber contents in immature flageolet type bean seeds. The beans were harvested when the dry matter was 40%. The seeds were cooked to consumption consistency in water. Fresh bean seeds contained 1.42–1.63 g of total sugars, 21.85–22.39 starch and 12.44–12.49 g fiber. Cooking resulted in a decrease of all the analyzed components by 42–49 %, 11–12 % and 34–37 % respectively.

THERMAL AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF ACETYLATED DISTARCH ADIPATE PRODUCED FROM CASSAVA STARCH

LESŁAW JUSZCZAK^a, TOMASZ ZIĘBA^b, ARTUR GRISZKIN^b, SŁAWOMIR PIETRZYK^a, and TERESA FORTUNA^a

*^aDepartment of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Agriculture, Balicka 122 Str. 30-149 Krakow, Poland, ^bDepartment of Food Storage and Technology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, C.K. Norwida 25/27 Str., 50-375 Wrocław, Poland
rrjuszcz@cyf-kr.edu.pl*

The effect of dual chemical modification on thermal and rheological properties of cassava starch was investigated. The modification decreased phase transition temperatures (T_O , T_P , T_E) and pasting temperature but has no effect on gelatinization enthalpy (ΔH). The obtained starch derivatives were characterized by higher viscosities of pastes after cooling, apparent viscosities during flow and higher values of storage (G') and loss (G'') moduli.

EFFECT OF SUGAR TYPE ON HIGH-METHOXY AND LOW-METHOXY PECTIN GELS

DOROTA GAŁKOWSKA, LESŁAW JUSZCZAK, and MARIA SŁOWIK

*Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Agriculture, Balicka 122 Str. 30-149 Krakow, Poland
dgalkowska@ar.krakow.pl*

The effect of sucrose and fructose on physical properties of model high-methoxy (HM) and low-methoxy (LM) pectin gels (pectin concentration 0.5, 0.4, 0.1 wt.% and 0.8, 0.6, 0.3 wt.% for HM and LM pectin gels, respectively) was studied. The gels were characterised by back extrusion test, low amplitude oscillatory measurements of storage and loss moduli, as well as by colour description. Replacement of sucrose by fructose caused changes in the above characteristics.

EFFECT OF PECTIN ADDITION ON THERMAL DENATURATION OF WHEY PROTEINS

RENÁTA KOVÁČOVÁ^{a*}, ANDRIY SYNYTSYA^b, and JIŘÍ ŠTĚTINA^a

*ICT Prague, ^aDepartment of Dairy and Fat Technology, ^bDepartment of Carbohydrate Chemistry and Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
renata.kovacova@vscht.cz*

The influence of addition of different types of pectins on thermal denaturation of whey proteins was observed by both dynamic light scattering (DLS) and differential scanning calorimetry (DSC). The addition of high esterified pectin successfully prevent to huge aggregation at denaturation temperatures of pure β -lactoglobulin as well as proteins in rennet whey. The DSC was used for characterization of differences in thermodynamic behavior of whey proteins in presence of structurally different pectins.

RELATIONSHIP BETWEEN CONTENT OF SOIL POLYSACCHARIDES AND SOME SOIL DIAGNOSTIC PARAMETERS

JANA KREJČOVÁ

*Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 00 Praha 6 - Ruzyně, Czech Republic
krejcova@vurv.cz*

This paper has evaluated the relationship between the soil polysaccharides (PS) content and other parameters commonly used for soil diagnostics (oxidizable carbon (C_{ox}), total nitrogen (N_t), total sulphur (S_t), pH_{H_2O} , cation

exchange capacity (CEC) and also plant nutrients (K, Ca, Mg).

Tested soils were collected from 30 sites of The Czech Republic (Haplic Luvisol, Eutric Cambisol). Samples were taken from the topsoil (0–30 cm). Sieved air-dried samples were used for analyses.

The strong positive correlation of soil polysaccharide content and oxidizable carbon ($R_{0.05} = 0.81$), total nitrogen ($R_{0.05} = 0.80$) and total sulphur content ($R_{0.05} = 0.82$) was found. According to presented results the soil polysaccharide content can be a suitable parameter for diagnostics of soil environment as well as oxidizable carbon, total nitrogen or sulphur contents. In the contrary, there was no significant correlation between PS and pH_{H_2O} ($R_{0.05} = -0.15$), CEC ($R_{0.05} = -0.31$ plant nutrients (Mg: $R_{0.05} = -0.03$, Ca: $R_{0.05} = 0.27$), except potassium content (value of this correlation coefficient was statistically significant ($R_{0.05} = 0.39$) but it was very low).

COMPLEX STARCH TRANSFORMATION IN POTATO AS DETERMINED BY DMA

MAGDALENA LAHODOVÁ and JIŘÍ BLAHOVEC

*Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic
lahodova@tf.czu.cz, blahovec@tf.czu.cz*

Principle of Dynamic Thermo Mechanical Analysis (DMA, DMTA) is based on the specimen loading by definite force (strain, stress) and by the measurement of strain response at stress temperature. These data allow us to create dependencies of elasticity module and loss angle on time, on the force frequency, on the deformation etc.

DMA was applied to potato cortex tissue of 5 cultivars in the temperature range of 30–90 °C and constant air humidity of 90 %. The scan parameters used were: rate of temperature change 1 °C per minute, deformation in bending at frequency of 1 Hz. The obtained scans indicate the peak in both parts (real and imaginary) of modulus of elasticity as the main process of heating at temperatures higher than 70 °C. The peak was observed at temperatures higher than the corresponding peak for extracted potato starch. Characteristic temperatures of the peak were well obtained in replicated experiments whereas the peak characteristic values were very variable.

The specimen was mechanically fixed into two points so that the longitudinal axis is perpendicular to the fixing jaws and free length of the specimen between jaws was 10 mm. The height of the fixed specimen was appr. 3 mm. Gained behaviours are used for the characteristic material properties determination, for material damages, measurement of creep, for crystallization degree or for gel point determination. The peak is identified and discussed with the process of starch complex starch transformation in potato cellular structure (CSTPC) as result of starch gelatinization and induced pasting process. Results of DMA

analysis showed possibility of its usage for gel point observation. For better reproduction of results is necessary to repeat measurements on the same experimental conditions. Next measurements will be based on the smaller temperature step.

The potato tissue expresses similar temperature dependent deformation as the extracted starch. DMA applied to the potato tissue indicates either gelatinization or pasting starch processes similarly as the extracted starch. The starch pasting is the strongest process indicated in a potato cellular structure during its heating.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM 6046070905).

REFERENCES

1. Lahodová M., 2008: Potato DMA at temperature between 30 and 90 °C, BPS, Book of abstracts, p. 39
2. Ratnayake W., Jackson D. S.: Adv. Food Nutr. Res. 55, 221 (2009).
3. Singh N., Singh J., Kaur L., Sodhi N. S., Gill B. S.: Food Chem. 81, 219 (2003).

FRUCTANS: OCCURANCE, STRUCTURE AND HEALTHY PROPERTIES

RENATE LÖPPERT^{a*}, WERNER PRAZNIK^a, and EVA CIESLIK^b

^a *Department of Chemistry, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria,*

^b *Centre of Food Monitoring and Certification, Agricultural University, Cracow, Poland
renate.loepfert@boku.ac.at*

Fructans are fructose-based oligo- and polymers that occur as reserve carbohydrates in about 15 % plant species. The inulin-type fructan consisting of $\beta(2\rightarrow1)$ linked fructofuranosyl units is found in composites such as chicory and jerusalem artichoke. The levan-type fructan, consisting of $\beta(2\rightarrow6)$ linked fructofuranosyl units, and the mixed-type fructan, consisting of $\beta(2\rightarrow1)$ and $\beta(2\rightarrow6)$ linked fructofuranosyl units with more or less branched structures, is found in monocots such as cereals, *allium* L. species (onion, garlic) or agave. Fructans from different crops are applied in daily diet products as well as raw materials for novel food (organic products) and spirituous beverages.

The reason of the explosion of fructan application in food products is the health promoting effects of fructo-oligo- and polysaccharides for the human body. Fructans are soluble non-digestible carbohydrates promoting formation of microflora population in colon system with healthy bifidogenic effects (prebiotics). Additionally, they interfere with glucidic and lipidic metabolism and the facilitation of mineral absorption. With respect to this back-

ground, products with well-defined technological properties, such as improved solubility or increased thermal stability or better pH-resistance, were developed.

These new materials may be obtained for instance by membrane filtration and/or chromatography which 'cut' sections of interest from native fructan distribution profiles. Another possibility is the application of enzymes to modify inulin and sucrose for production of 'tailored' fructooligosaccharides (FOS).

Utilization of jerusalem artichoke powders and chickory inulin in bakery products and the use of *Agave tequila* Weber var. Azul as feedstock for the Tequila production and basic material for functional food or organic products will be discussed in detail.

ÚČINEK AMIDOVANÉHO PEKTINU A CHOLESTYRAMINU NA HOMEOSTÁZI CHOLESTEROLU U POTKANŮ

**MILAN MAROUNEK^{a,b}, ZDENĚK VOLEK^a,
EVA SKŘIVANOVÁ^a a JAN TŮMA^c**

^a Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha, ^b Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Praha,

^c AarhusKarlshamns, Praha, Česká republika
marounek.milan@vuzv.cz

V pokusech s potkany jsme srovnali amidovaný pektin, cholestyramin, a kombinaci obou sorbentů cholesterolu. Krmivo potkanů obsahovalo 1 % cholesterolu a 5 % palmového tuku. Krmivo pokusných potkanů bylo doplněno o 5 % amidovaného pektinu či 2 % cholestyraminu, dále i o jejich kombinaci. Pektinamid, cholestyramin a jejich kombinace snížily sérový cholesterol z 2,63 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ na 1,56, 1,70 a 1,62 $\mu\text{mol ml}^{-1}$. Obdobně byl snížen obsah cholesterolu v játrech z 4,91 mg g^{-1} na 2,41, 2,52 a 2,43 mg g^{-1} . Uvedené koncentrace byly v pokusných skupinách sníženy téměř na úroveň negativní kontroly (bez cholesterolu v krmivu). Pektinamid, cholestyramin a jejich kombinace zvýšily koncentraci neutrálních sterolů v exkrementech z 40,6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ na 51,2, 43,5 a 50,9 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Podobně byla zvýšena koncentrace žlučových kyselin z 3,2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ na 6,0, 12,0 a 12,4 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Celkové množství sterolů v exkrementech potkanů přijímajících pektinamid, cholestyramin a kombinaci obou sorbentů činilo 57,2, 55,5 a 63,3 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Výsledky lze shrnout do konstatování, že pektinamid v trávicím traktu sorbuje především neutrální steroly (cholesterol, koprostanol) a cholestyramin žlučové kyseliny. U kombinace obou sorbentů bylo celkové množství vyloučených sterolů signifikantně vyšší než v případě samotného pektinamidu nebo cholestyraminu. Potvrdil se tak předpoklad, že účinky látek s různým mechanismem působení mohou být aditivní. Nežádoucí vedlejší účinky cholestyraminu při léčbě hypercholesterolemie jsou známy¹⁻³. V našem pokuse měly obě skupiny potkanů přijímajících cholestyramin zvýšenou

hladinu sérových aminotransferas. Sorbenty neutrálních sterolů by možná pomohly terapeutické dávky cholestyraminu snížit.

Finančně podpořeno projektem MZE 0002701404.

LITERATURA

1. Knodel L. C., Talbert R. L.: *Med. Toxicol.* 2, 10 (1987).
2. Scheel P. J. Jr., Whelton A., Rossiter K., Watson A.: *J. Clin. Pharmacol.* 32, 536 (1992).
3. Vroonhof K., van Rijn H. J., van Hattum J.: *Neth. J. Med.* 61, 19 (2003).

GENETICKY PODMIENENÁ ADHÉZIA ŠKROBU NA BIELKOVINY V ZRNE OZIMNEJ PŠENICE

**DANIELA MIKULÍKOVÁ^{a*}, LENKA KLČOVÁ^a,
ŠTEFAN MASÁR^a, ALŽBETA ŽOFAJOVÁ^a
a VIERA HORVÁTHOVÁ^b**

^a Výskumný ústav rastlinnej výroby, Centrum výskumu rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany,
^b Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda, Námestie Jozefa Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovenská republika
mikulikova@vurv.sk

Jedným z hlavných ukazovateľov chlebo-pekárskej kvality pšenice je tvrdosť endospermu zrna. Je daná stupňom adhézie škrobových granúl na bielkovinový matrix, ktorá je sprostredkovaná friabilinom¹. Podstatnú časť tejto bielkoviny tvoria puroindolín a (Pina) a puroindolín b (Pinb), ktoré sú podmienené puroindolínovými gémi, lokalizovanými na krátkom ramene 5D chromozómu². Divý typ pšenice má mäkký endosperm, má dominantné funkčné alely pre oba puroindolínové gény³ (*Pina-D1a* a *Pinb-D1a*) a nachádza sa v ňom friabilín, lokalizovaný medzi škrobom a bielkovinou. V tvrdej pšenici v dôsledku mutácie puroindolínových génov tento proteín chýba, prípadne je nefunkčný (má zmenenú štruktúru, preto stratil schopnosť väzby medzi bielkovinovou a škrobovou zložkou endospermu).

Vzhľadom nato, že sa u nás zatiaľ neštudovala tvrdosť zrna na molekulárnej úrovni, cieľom práce bolo pomocou vhodných markerov polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)^{4,5} monitorovať výskyt funkčných aj mutovaných alel puroindolínových génov *Pina* a *Pinb* v 100 registrovaných a 24 historických slovenských odrodách ozimnej pšenice.

V hodnotených odrodách pšenice sme identifikovali 3 kombinácie alel puroindolínových génov: 1) dominantné funkčné alely oboch génov (divý typ s mäkkým endospermom) – *Pina-D1a/Pinb-D1a*, 2) funkčná alela *Pina* génu a nulová alela *Pinb* génu – *Pina-D1a/Pinb-D1b* a 3) nulová alela *Pina* génu a funkčná alela *Pinb* génu – *Pina-D1b/Pinb-D1a*. V žiadnej odrode pšenice sme nepotvrdili prí-

tomnosť nulovej alely oboch puroindolínových génov.

V súčasných slovenských odrodách bol najviac zastúpený (61,0 %) divý typ pšenice s mäkkým endospermom s dominantnými funkčnými alelami oboch puroindolínových génov. Pomerne častý bol však aj výskyt recesívnej nulovej alely *Pinb-D1b*. Táto alela *Pinb-D1b* má bodovú mutáciu⁶ v prvej báze tripletu GGC→AGC (zámena aminokyselín glycín→serín) v polohe 46 puroindolínového génu *Pinb*. Jej výskyt bol v súčasných odrodách 38,0 %, v historických dokonca až 91,7 %. Táto nulová alela bola častejšia v odrodách oz. pšenice s dobrou chlebopekárskou kvalitou (Alacris, Alana, Axis, Balada, Blava, Bona Dea, Bruta, Charger, Hana, Ilona, IS Karpatia, Ludwig, Sulamit). Preukázala sa aj v historických odrodách Slovenská 777 (I–V), Stupická Bastard (I–V), Kaštická bezosinatá (I–III), Radošínska Dorada (I–V), Slovenská 200/I, Slovenská B (I–II) a Bučianska červenoklasá (I–II). Nulová alela *Pina-D1b*, ktorá spôsobuje väčšiu tvrdosť endospermu⁷ než nulová alela *Pinb-D1b*, sa našla iba v odrode Rheia. Uvedené odrody môžu slúžiť ako donory nulovej alely *Pina* a *Pinb* génov pre molekulárne šľachtenie za účelom zvýšenia tvrdosti zrna ako jedného z ukazovateľov kvality oz. pšenice.

Genotypy s nulovou alelou *Pinb-D1b* mali oproti divému typu *Pinb-D1a* významne ($P < 0,05$) dlhšie zrná a významne ($P < 0,01$) väčší pomer dĺžky zrna k šírke. Okrem toho mali svetlejšie zrna, komponenty farby zrna (RGB) mali významne ($P < 0,01$) vyššie hodnoty. Genotypy s *Pinb-D1a* mali tmavšie zrna, komponenty farby – červená (R) zelená (G) a modrá (B) mali významne ($P < 0,01$) nižšie hodnoty.

Práca vznikla za podpory Ministerstva pôdohospodárstva SR (projekt 2006 UO27/091 05 01/091 05 11 Biologické faktory podmieňujúce efektívnu a konkurencieschopnú rastlinnú výrobu) a APVV projektu VMSP-P-0047-09.

LITERATÚRA

- Greenblatt G. A., Bettge A. D., Morris C. F.: *Cereal Chem.* 72, 172 (1995).
- Dubreil L., Gaborit T., Bouchet B., Gallant D. J., Broekaert W. F., Quillien L., Marion D.: *Plant Sci.* 138, 121 (1998).
- Morris C. F.: *Plant Mol. Biol.* 48, 633 (2002).
- Gautier M. F., Aleman M. E., Guirao A., Marion D., Joudrier P.: *Plant Mol. Biol.* 25, 43 (1994).
- Tranquilli G., Lijavetzky D., Muzzi G., Dubcovsky J.: *Mol. Gen. Genet.* 262, 846 (1999).
- Giroux M. J., Morris C. F.: *Theor. Appl. Genet.* 95, 857 (1997).
- Morris C. F., Massa A. N.: *Cereal Chem.* 80, 674 (2003).

AGING OF CELLULOSE – A SURVEY OF RECENT KNOWLEDGE

MILOSLAV MILICHOVSKÝ^a, MICHAELA FILIPI^a, SVATAVA MILICHOVSKÁ^b, PAVEL HAVELKA^c, and TOMÁŠ SOPUCH^d

^a Department of Wood, Pulp and Paper, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentska 95, 530 10 Pardubice, ^b Brozikova 436, 530 09 Pardubice, ^c VUOS a.s., Pardubice-Rybitví, ^d AliaChem a.s., division Synthesia, Pardubice-Semtín, Czech Republic
miloslav.milichovsky@upce.cz

Terms as recycling, secondary fibres, paper recovery, preservation and conservation of culture heritage on wood and paper basis etc. are connected with aging of ligno-cellulosic materials like paper and other cellulosic products. Especially, the cellulose as skeletal component of natural cell-walls is most important. The aging of paper is evoked by mechanical influence, physical influence (temperature, rel. humidity), chemical and photochemical influence, biochemical influence and also sometimes by radiochemical influence. By aging there are changed hypermolecular properties of paper (hornification), partly reversible process revitalised by beating and chemical composition of lignin and cellulose – fully irreversible deteriorative processes with fatal impact on cellulosic matter. Recently findings based on experimental observations by help of synchrotron X-ray microtomography, thermal techniques, chemi-luminescence and EPR techniques but predominantly UV-VIS spectroscopy of oxidised cellulose solution accompanied with appropriate chemical analysis afforded new information.

A specific role during aging plays the light-sensitivity of lignin causing the low photo-stability and material discolouration. However, due to structures of lignin compounds corresponding to the hindered phenols, lignin can act as effective antioxidants capable to scavenge reactive radical intermediates.

Cellulose aging is evoked by acid and enzymatic hydrolysis, by chemical and photochemical oxidation or by combination of both reactions – oxidative or photo-oxidative hydrolysis. As typical, due to these reactions cellulose and cellulosic materials are getting more fragile and yellow. The detailed knowledge of nitroxide-mediated oxidation of cellulose including its degradation and destruction has helped to better understanding of cellulose material aging because oxides of nitrogen pollute the air. The hypothetical mechanism of degradation and destruction of cellulose aging process during its acid oxidation process under the influence of air pollution is presented. This enables the process of cellulose aging followed by change of its appearance properties, fatal decreasing of fibre mechanical properties and finished by totally decay of cellulosic material to be explained. A key role in the oxidative hydrolysis of cellulose matter plays a transient intermediate PAGA-GA which is responsible for fully

following destruction of oxidized cellulose. Both – the oxidative and photo-oxidative hydrolyse of cellulose – have a destructive character on cellulosic materials accompanied by water elimination. Denaturing of polysaccharide materials is obviously evoked by presence of nitrogen oxides in atmosphere.

The authors thank the Ministry of Industry and Ministry of Education of Czech Republic for financial support. This research was supported by grants IMPULS FT-TA4/051 and INGO LA 287.

PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF $\beta(1-3)$, $(1-6)$ -D-GLUCAN FOILS

MIROSLAV NOVÁK^a, JÍŘÍ BLAHOVEC^b, ANNA HEJLOVA^b, ANDRIY SYNYTSYA^a, ONDREJ GEDEON^a, ALLA SYNYTSYA^a, PETR SLEPIČKA^a, VÁCLAV PROCHÁZKA^a, and JANA ČOPIKOVÁ^a

^a *Institute of Chemical Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6, ^b University of Agriculture in Prague, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 Suchdol, Czech Republic novaks@vscht.cz*

$\beta(1-3)$, $(1-6)$ -D-glucan (hereafter β -glucan), either itself or in combination with other proper substances, can be used in the form of foil as a bio-artificial wound dressing. The main effect of such a skin substitute, in addition to wound protection, is to promote wound healing by stimulating the host to produce various cytokines, whose stimulates the production of components in the basement membrane, preventing dehydration and increasing inflammation, and promotes the formation of granulation tissue. A good bio-artificial dressing, besides its wound-healing qualities, to the same degree necessitates certain physical and mechanical properties, *e.g.*, strength, flexibility, porosity, *etc.* Thus, for complex understanding of mechanism of physical and mechanical effects is important to know macrostructure of prepared foils and their surface shape.

β -Glucan foils were prepared by casting and drying of suspension of β -glucan, isolated from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Identity, chemical composition and structure of prepared foils from β -glucan were tested by FTIR spectroscopy, elemental analysis and X-ray diffraction. Appearance of foil surface was observed by microscopic methods and strength of foils was examined by tensile tests.

This work was supported by the by the Czech Science Foundation (project 525/09/1133) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM 6046137305).

MODIFIED CHITOSAN HYDROGEL MEMBRANES FOR TECHNICAL AND PHARMACEUTICAL APPLICATIONS

JADWIGA OSTROWSKA-CZUBENKO and MILENA PIERÓG*

Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, Gagarina St, 87-100 Toruń, Poland mili@doktorant.umk.pl

Chitosan is a cationic linear polysaccharide usually obtained by alkaline deacetylation of crustacean chitin from crab and shrimp shell wastes. Recently, chitosan and chemically and/or physically modified chitosan attracted interest as membrane materials for different kinds of pharmaceutical and technical applications. Chitosan membranes are modified by different methods, including blending, multilayer casting and crosslinking.

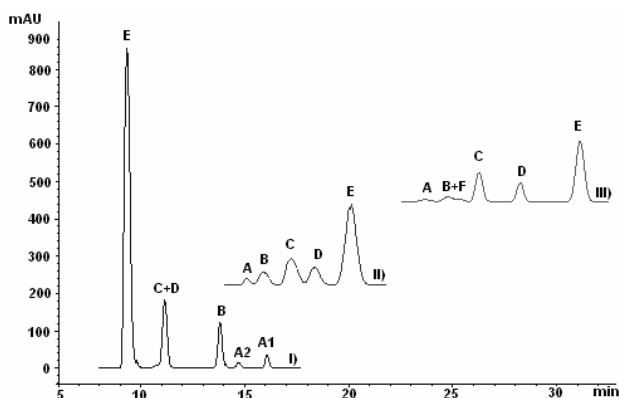
In the present work we have obtained three-component hydrogel membranes by crosslinking of chitosan (Ch) by low-molecular compounds. Glutaraldehyde (GA), sulfuric acid (H₂SULF) and trisodium citrate (Na₃CIT) were used as non-ionic and ionic crosslinking agents, respectively. Molecular and supermolecular structure as well as some physicochemical properties of synthesized three-component Ch/GA/SULF and Ch/GA/CIT membranes were studied using FTIR spectroscopy, X-ray diffraction method, SEM/EDX and AFM analysis. The results were compared to those obtained earlier for two-component Ch/GA, Ch/SULF, Ch/CIT ones and for unmodified Ch membrane. The results show that modification of chitosan membrane by adding low molecular crosslinking agents leads to the formation of covalently and ionically crosslinked chitosan membranes. The crosslinking process influences the supermolecular structure of chitosan membrane (its crystallinity) and its properties (swelling behaviour). SEM and AFM images indicate that the effect of modification on chitosan membrane morphology is rather small.

VYUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE PŘI STANOVENÍ OLIGOSACHARIDŮ

KLÁRA POCEDIČOVÁ*, LENKA DIBLÍKOVÁ a LADISLAV ČURDA

Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika hellerok@vscht.cz

Pro stanovení cukrů se využívá řada technik, jako jsou kapalinová chromatografie s pulsní amperometrickou detekcí, iontově výměnná, kapalinová chromatografie s reverzní fází, ligand výměnná (založená na tvorbě komplexu mezi hydroxylovou skupinou cukru a vícemocného kovového prvku, jako je Pb²⁺), afinitní chromatografie,



Obr. 1. Chromatogramy stejného vzorku pro jednotlivé kolony; I) NH_2 kolona, II) vápenatá kolona, III) olovnatá kolona; A: galakto-oligosacharidy (1 a 2 různé druhy), B: laktosa, C: glukosa, D: galaktosa, E: fruktosa-vnitřní standard, F: disacharidy

plynová chromatografie a také kapilární elektroforéza¹. V potravinářství se nejvíce pro stanovení mono- a oligosacharidů využívá kapalinová chromatografie s refraktometrickou detekcí (RI). Používají se různé kolony např. iontově výměnná (vápenatá, olovnatá, ale i vodíková) či se skupinou NH_2 vázanou na silikagel. Rozdíl mezi použitými kolonami je v pořadí dělení cukrů, citlivosti a také v různých mobilních fázích. Zatímco kolona s aminově vázaným silikagelem špatně dělí monosacharidy glukosu a galaktosu, tak vzniklé oligosacharidy je schopna rozdělit velmi dobře a identifikovat di- a trisacharidy, kdežto na iontově výměnné koloně je odhaleno daleko menší množství oligosacharidů².

V mé práci jsem se zaměřila na stanovení směsi sacharidů vzniklých při transgalaktosylační reakci, jednalo se tedy o následující směs sacharidů: galakto-oligosacharidy, laktosa, glukosa, galaktosa a fruktosa používaná jako vnitřní standard. Tato směs byla analyzována na dvou iontově-výměnných a jedné koloně s navázanou NH_2 skupinou. První iontově-výměnnou kolonou byla vápenatá, tato kolona výborně dělí monosacharidy a laktosu, nedělí ovšem oligosacharidy. Druhou kolonou byla také iontově-výměnná olovnatá, tato kolona dělí monosacharidy a laktosu, ale již částečně dělí oligosacharidy. Třetí byla kolona s vázanou NH_2 skupinou, tato kolona dělí oligosacharidy, ale nedělí vznikající monosacharidy. Pro iontově-výměnné kolony byla použita voda jako mobilní fáze a v případě NH_2 kolony byl mobilní fází acetonitril ve směsi s vodou. Detektor pro všechny tři kolony byl ELS.

Chromatogramy separované směsi sacharidů jsou znázorněny na obr. 1.

Tato práce byla podporována MŠMT, České republiky (Výzkumný záměr 140 MSM 6046137305).

LITERATURA

1. Karlsson G., Winge S., Sandberg H.: J. Chromatogr., A 1092, 249 (2005).

2. Indyk H. E., Edwards M. J., Woollard D. C.: Food Chem. 57, 580 (1996).

FRUCTOOLIGOSACCHARIDES AS TEXTURE IMPROVING AGENT IN MILK DESSERTS

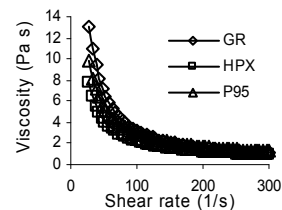
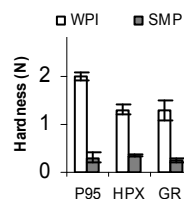
ELIZA POTOCKA^a, WALDEMAR GUSTAW^b, and EWA SOLARSKA^a

^a Department of Biotechnology, Human Nutrition and Sciences of Food Commodities, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, ^b Department of Milk and Hydrocolloids Technology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland
elizapotocka@wp.pl

Rheological properties of milk desserts are mainly affected by the type and amount of gelling agent¹. Inulin is natural component of several fruits and vegetables and is considered, not as an additive, but as native and safe ingredient². Inulin addition to fat free dairy dessert increased sweetness, thickness and creaminess³. No published data exists on influence of inulin on rheological properties of whey protein desserts.

Materials and methods: Inulins GR, HPX and oligofructose P95 (Beneo-Orafti, Belgium); WPI, WPC65 and WPC85 (Milei, Germany), SMP (Biomlek Poland), waxy maize starch (National Starch, Germany) and carrageenan (Sigma Aldrich, Poland) were used. Their chemical composition was evaluated using AOAC methods⁴. Desserts were prepared by mixing 4 % protein, inulin 4 or 5 %, starch 3 or 4 % and carrageenan (0.05, 0.1 or 0.2 %). Rheological properties of dairy desserts were analyzed using RS-300 ThermoHaake rheometer. The hardness and adhesiveness were analyzed using TA-XI2i texture analyzer.

Results and discussion: Dairy desserts with starch, carrageenan, inulin or oligofructose and skimmed milk powder (SMP) was compared with desserts obtained with whey proteins (WPI or WPC). All obtained dairy desserts showed shear-thinning flow behavior. This type of behavior is accordance with previous observations on dairy desserts obtained with inulin³. In comparison to whey proteins desserts, SMP produced desserts with lower apparent viscosity. The addition of inulins or P95 modified rheological properties of dairy desserts. caused decrease of dairy dessert hardness. The highest value of hardness



was observed for dessert obtained with 4% P95 (about 2N). Dessert obtained with addition of inulin GR and HPX had similar values of hardness. The addition of carrageenan caused significantly increase in hardness and decrease in adhesiveness of dairy desserts. The effect 4% inulin or oligofructose addition on rheological properties of dairy dessert was clearly dependent on starch and carrageenan concentration. Obtained results are of interest in formulation of whey protein desserts particularly in terms of increased nutritional value products.

REFERENCES

1. Mleko S., Gustaw W.: *Milchwissenschaft* 3, 149 (2000).
2. Milo L.: *Food Technol.* 58, 71 (2004).
3. Tarrega A., Costell E.: *Int. Dairy J.* 16, 1104 (2006).
4. AOAC, Official methods of analysis, 15th Edn., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC (1990).

MOLECULAR DIMENSION AND STRUCTURE OF WATER SOLUBLE POLYSACCHARIDES BY MEANS OF ADEQUATE CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES WITH DIFFERENT DETECTION SYSTEMS

Invited lecture

WERNER PRAZNIK^{a,*}, RENATE LOEPPERT^a, and ANTON HUBER^b

^a *Plant Carbohydrates group, Department of Chemistry, University of Natural Resources and Applied Life Science, Vienna, Austria,* ^b *CePoL/MC - Central Polymer Lab / Molecular Characteristics, IfC -Institut für Chemie, KF- Univ Graz, Austria*
werner.praznik@boku.ac.at

Due to the fact that oligo- and polysaccharides from natural resources typically are broad distributed heterogeneous mix, preparative and analytical fractionation combined with controlled enzymatic and pure chemical fragmentation need to be applied to achieve information about sugar moieties, linkages types, branching characteristics and molecular dimension.

Additionally polysaccharides are made by nature in a rather complex sequence of synthesis-, transformation-, transportation- and disassembling-processes and prior to analysis pass a number of isolation- and purification- and dissolution-steps. Hence, history of polysaccharide material may become as essential for obtained analytical results as the general polymer-chemical background.

Because of the fact that polysaccharides are broad distributed materials with several superimposed heterogeneities any of these distributions must be considered with

respect to mass fractions profile as well as to molar fractions profile. Mean values on molecular characteristics may provide first order information; however, as even slight variations in any of the distributions may cause significant changes of surface / interface-qualities of polysaccharide materials, state of the art characterization regards actual distribution-data rather than mean values.

A chance to separate polysaccharide fractions due to differences in component mean-dimensions is entropy-controlled size-exclusion chromatography (SEC). Such SEC-elution profiles provide distributions of fractions with similar / identical excluded volumes with the need to consider the actual excluded volume for each of these fractions as a result from basically three groups of contributing influences: molecular dimension (1) scaled by molecule conformation (2) and milieu conditions (3). Interpretation of SEC separated polysaccharide characteristics based on on-line detected elution profiles of mass, scattering and viscosity provides absolute information about dimension and conformation distributions. However, due to the pronounced and permanently active tendency of polysaccharides to form supermolecular structures, such absolute information is rather 'apparently absolute' than 'truly absolute'.

Under this aspect a new approach for particular glucans being independent on supermolecular structures – quantitative labeling of the unique terminal hemiacetal groups on each glucan molecule combined with determination of mass and molar glucan concentrations – was developed and provides information on *de facto* molecular dimensions of individual glucans. In this case SEC-separation with mass detection (refractive index) and molar detection (fluorescence of labeled hemiacetals) is applied.

Furthermore comprehensive analysis of polysaccharides – such as long-chain branched (lcb)-glucans (native amylose), short-chain branched (scb) glucans (amylopectin), fructans and plant gums – will be presented. In this frame determination of molecular dimension (e.g. molar mass), molecular conformation (e.g. branching pattern) and interaction with solvent/environment (e.g. status of dissolution / aggregation) will be shown. Additionally Thin Layer Chromatography (TLC) combined with acidic and enzymatically catalyzed hydrolysis will be demonstrated as a useful tool for analysis of constituting sugar moieties. Information on structural details of identified moieties may be achieved by means of reductive methylation prior to gas chromatography (GC) and flame ionization detection (FID) or mass spectroscopy (MS).

ROLE OF NON-STARCH COMPONENTS OF THE SURFACE OF WHEAT STARCH GRANULES ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ENZYMIC STARCH HYDROLYSATES

JUSTYNA ROSICKA-KACZMAREK* and EWA NEBESNY

*Technical University of Lodz, Institute of Chemical Technology of Food, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, Poland
rosicka_j23@tlen.pl*

Apart from starch its granules of different botanical origin contain various amounts of other components such as: lipids, proteins and pentosans. Friabilins (circa 15 kDa) rank among proteins contained in the surface of starch granules¹. Most important members of this group of proteins are puroindoline A and puroindoline B, which are generally regarded as markers of hardness of cereal endosperm. Owing to the occurrence of tryptophan domain in their polypeptide chains both puroindoline A and B are capable of binding lipids. It gave rise to a hypothesis that lipids participated in binding of puroindolines with the surface of starch granules^{1,3,4}.

Objectives of this work were: verification of the hypothesis postulating that puroindolines display various affinities for the surface of starch granules isolated under industrial conditions from starch samples produced from 3 different wheat varieties, and determination of their impact on physicochemical properties of enzymatic starch hydrolysates. Three different starch fractions: A, B and C were used in our experiments. These starch fractions differed in dimensions of starch granules and their chemical composition. Fractions of starch granule associated proteins (SGAPs), which were extracted by using different solvents and extraction conditions (dependent on composition of fractions of surface-bonded lipids), were subjected to qualitative and quantitative analyses and their effect on physicochemical characteristics of hydrolysates of fraction A of starch was determined.

These investigations were carried out by means of differential scanning calorimetry (DSC), X-ray crystallography and polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE).

Our experiments revealed that the size of starch granules affected the quantity of substances associated with their surface such as proteins, lipids and pentosans. The greatest amounts of proteins and lipids were adsorbed on the smallest starch granules. We found that lipids interacted with members of puroindoline family of proteins exposed on the surface of starch granules. The presence of surface-bound proteins in wheat starch granules contributed to worse filtration performance and lower degree of saccharification of glucose syrups produced from starch. We found a correlation between the percentage content of puroindolines in total surface proteins and the color of starch hydrolysates.

The percentage content of friabilins (puroindolines) in total surface proteins was the highest for the largest starch granules (fraction A which was subjected to hydrolysis) as compared to the smaller starch granules (fractions B and C). This percentage content of puroindolines depends on the botanical source of starch. DSC analyses revealed different amounts of amylose-lipid complexes (AML) in wheat starch granules, related to their size and the type of solvent used for protein extraction from the surface of these granules. This in turn affected the susceptibility of starch to gelatinization and digestion by α -amylase. When proteins were extracted with 2% aqueous solution of SDS the content of AML in starch was doubled and the starch was more resistant to hydrolysis catalyzed by α -amylase although its gelatinization begun and was completed at relatively lower temperatures. When friabilins (puroindolines) were extracted from the surface of starch granules with 0.05N NaCl in 50% isopropanol (1:1) the changes in AML polymorph (from amorphous to crystalline) were observed. However, the total AML content in starch did not change. By contrast, protein extraction with 2% SDS solution resulted in a concomitant increase in AML concentration and its conversion from amorphous form to the crystalline one, which in turn decreased the susceptibility of wheat starch to hydrolysis by α -amylase.

This work is financially support by the Ministry of Science and High Education Project No. NN312 314337.

REFERENCES

1. Baldwin P. M.: *J. Sci. Food Agric.* 55, 87 (2006).
2. Bhave M., Morris C. F.: *Plant Mol. Biol.* 66, 221 (2008).
3. Feiz L., Martin J. M., Giroux M. J.: *J. Cer. Chem.* 85, 45 (2008).
4. Gazza L., Corona V., Bogini G., Pogna N. E.: *J. Cer. Sci.* 34, 243 (2001).

SEED TYPE IDENTIFICATION BY USING IMAGE ANALYSIS – CORRELATION OF NUTRITIVE COMPOUNDS WITH SIZE, SHAPE AND COLOR CHARACTERISTICS

IVA SMÝKALOVÁ^a, MIREK HÝBL^b, MARTIN PAVELEK^c, and JIŘÍ HORÁČEK^a

*^a Department of Biotechnology, ^b Department of Grain Legumes, ^c Department of Technical Crops, Agritec Plant Research, Ltd., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk, Czech Republic
smykalova@agritec.cz*

Image analysis is the method in agriculture/biology suitable to analyse differences among varieties based on evaluation of qualitative and quantitative characteristics of seeds¹. In the study differences in seed morphology were investigated by digitalized image system software Nis-



Fig. 1. MaxFerret- projection of object at $\alpha = 0,10,\dots,180$

Elements v.2.3 (Lim, Prague, Czech Republic) based on scanning (size and shape). The color of detected images of seeds were captured by camera DUS-U1 with macrooptik lens Cosmocar (color). Mathematical morphological operations extracted parameters such as Area, MaxFerret, Elongation, Circularity etc. (Fig. 1.) with a view on varietal differences in shape, size and color of seeds of model crops - pea (large seedy crop) and flax (small seedy crop) – Fig. 2. The generated data were statistically evaluated (Statsoft. Inc., USA). In addition of the other report² results of image analysis (determination of classes of highly contrasting seeds – visible clear differences) were taken in comparison/correlation with agricultural important compounds in seeds utilized in food/feed industry, in pea polysaccharides and in flax fatty acids. The compounds, which did not correspond directly with size and color of seeds, can be helpfull in granding system of seed technology. In pea content of polysaccharides in % of DW for the tested varieties Alan=53.81, Bohatýr=56.16, Herold=56.76, Janus=50.15, Romeo=53.27, Smaragd=51.75, Tyrkys=54.02 a Zekon=50.62 was determined. In flax fatty acids composition suggest about significant varietal differences.

The results of data analysis confirm positive correlation content of fat (%) and colour parameters for flax seeds. If the compounds effected the coloration of seeds (Fig. 3.), then we could detect the flax with low-linoleic (v. Lola 4.1%) and high-linoleic (v. Rina 60.1%) varieties of brown colorated seeds high distinct from yellow varieties (Amon and Jantar). Although the similar situation couldn't be found for pea, the obtained I.A. parameters were used for the identification of pea varieties. The seed characterization and classification method was developed for evaluation of genetic resourses similar to Canadian granding machine vision system for lens³.

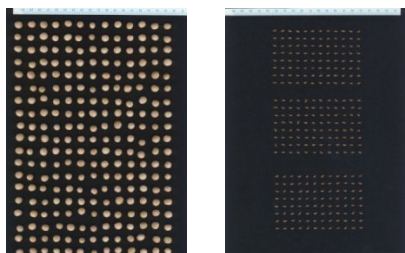


Fig. 2. Pea v. Alan (left) and flax v. Venica (right)

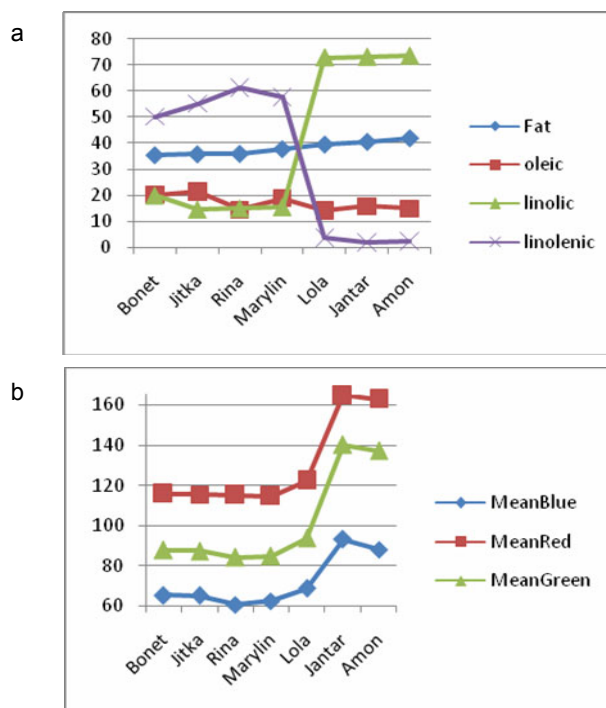


Fig. 3. Flax - fatty acid composition (a) and RGB values (b)

This project was financially supported by the Ministry of Education, Czech Republic (MSM No. 2678424601).

REFERENCES

1. Venora G., Grillo O., Shahin M. A., Symons S. J.: Food Res. Int. 40, 161 (2006).
2. Wiesnerová D., Wiesner I.: Comput. Electronic Agr. 61, 126 (2008).
3. Shanin M. A., Symons S. J.: Can. Biosystems Eng. 43, 7.7 (2001).

STORAGE STABILITY OF THE QUAIL (*Coturnix coturnix*) EGG PASTA

KRZYSZTOF SURÓWKA^a, MAGDALENA RZEPKA^a, ALEXANDER DANDAR^b, and JOZEF AUGUSTIN^b

^a Department of Refrigeration and Food Concentrates, University of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Kraków, Poland, ^b Ustav biotechnologie a potravinarstva FCHPT STU Bratislava, Slovak Republic
rtsurowk@cyf-kr.edu.pl

The objective of the study was to analyse storage stability of the quail (*Coturnix coturnix*) egg pasta obtained from common wheat flour. Thus, the Accelerated Shelf Life Test (ASLT) was employed with rising temperature and air humidity. Analysis of the sorption iso-

therm as well as microbial and sensory assays revealed that the shelf life of the product strongly depends on air humidity and can be stable for 12 months, when the product is stored at 20 °C under the conditions recommended by Polish Standard.

BIODEGRADOVATELNÉ PLASTY PŘIPRAVENÉ Z ACETYLOVANÉHO B-ŠKROBU

EVŽEN ŠÁRKA^a, ZDENĚK KRULIŠ^b, JIŘÍ KOTEK^b, LUBOMÍR RŮŽEK^c, KATEŘINA HRUŠKOVÁ^a, LENKA CIHELKOVÁ^a, ZDENĚK BUBNÍK^a a VLADIMÍR POUR^a

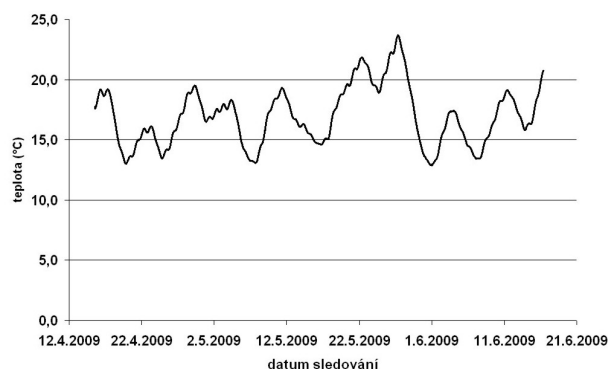
^a Ústav chemie a technologie sacharidů, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b ÚMCH, AV ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ^c Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU Praha, Kamýčká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol, Česká republika
evzen.sarka@vscht.cz; krulis@imc.cas.cz; ruzek@af.czu.cz

Při zpracování pšeničné mouky na škrob se během rafinace dvě velikostní skupiny škrobových zrn oddělují, takže výsledným produktem je komerční A-škrob o velikosti zrn 10–40 μm a B-škrob s menšími škrobovými zrny. Chemické složení a struktura zrn B-škrobu ovlivňují jeho funkční a fyzikálně-chemické vlastnosti (měrný povrch, krystalinitu, charakteristiky mazovatění ad.)¹. Jeho využitelnost je dosud omezená (vyšší energetická náročnost při sušení, nižší kvalita) a hledají se proto další aplikace.

Jednou z možností jeho dalšího použití je do biodegradabilních plastů. Podle Thakore a spol.² esterifikace škrobu umožňuje zvýšit termoplastické charakteristiky jako tepelnou odolnost, hydrofóbnost a krystalinitu těchto materiálů. Byla provedena proto nejprve acetylace průmyslového B-škrobu, která byla realizována v laboratorní aparatuře. Vzhledem k tomu, že menší zrna mají nižší reaktivitu s acetanhydridem než velká, bylo nutné syntézu acetylovaných škrobů optimalizovat z hlediska reakční doby, způsobu dávkování a přídavku činidel, které upravovaly charakter vzniklé suspenze. Šlo především o zamezení vzniku pevných agregátů v míchané směsi. K tomuto účelu byly zkoušeny následující látky: síran sodný, silikagel a povrchově aktivní látky. Různě měněné reakční podmínky ovlivňovaly i konečný stupeň acetylce.

Připravený acetát škrobu byl poté násobně promýván, za mokra desintegrován a usušen. Vzniklý materiál byl namlet na šrotovacím mlýnku a použit k přípravě kompozitů, ze kterých byly tvarovány zkušební plastové fólie o tloušťce 0,5 mm.

U zkušebních těles připravených plastů byly pomocí trhacího stroje Instron 5800 vyhodnoceny následující cha-



Obr. 1. Průběh vnitřní teploty kompostéru

rakteristiky: modul pružnosti, mez kluzu, poměrné prodloužení na mezi kluzu, mez pevnosti, poměrné prodloužení na mezi pevnosti a poměrné prodloužení při přetržení. Mechanické vlastnosti byly porovnávány s plastem z čistého PCL a PCL s A-škrobem v acetylované podobě.

Biodegradabilita vyrobených plastů byla testována ve směsném substrátu, vyrobeném a umístěném ve dvou kompostérech AL-KO K390 ve venkovním prostředí při průměrné teplotě $17,0 \pm 2,4$ °C (viz obr. 1).

Substrát v kompostéru³ byl připraven ze zeleného komunálního odpadu, bílé vrchovištní rašeliny a jílovité výkopové zeminy. U plastů byly určeny jejich mechanické charakteristiky. Kromě vlastností plastů před a po kompostování byla testována i odolnost plastů vůči vodě.

Příspěvek byl zpracován v rámci řešení grantového projektu GA ČR 525/09/0607 „Biodegradabilní kompozitní materiály na bázi B-škrobu s upotřebením v zemědělství“ a výzkumného záměru MSM 6046070901 „Setrvalé zemědělství, kvalita zemědělské produkce, přírodní a krajinné zdroje“.

LITERATURA

- Šárka E., Bubník Z.: Chem. Listy, v tisku
- Thakore I. M., Desai S., Sarawadade B. D., Devi S.: Eur. Polym. J. 37, 151 (2001).
- Růžek L., Růžková M., Koudela M., Voříšek K.: Zahradnické využití substrátů z rašeliny a zelených komunálních odpadů. *Odpadové fórum 2008, Milovy 16.-18.4.2008*, s. 3126.

CHARAKTERIZACE ACETYLOVANÉHO B-ŠKROBU MĚŘENÍM VELIKOSTI ČÁSTIC POMOCÍ IMAGE ANALYSIS A LASEROVÉ DIFRAKCE A HODNOCENÍM SPEKTER NMR A FT-IR SPEKTROSKOPIE

JAROSLAV KOLÁČEK^a, EVŽEN ŠÁRKA^{a*},
ANDREY SYNYTSYA^a, RENÁTA KOVÁČOVÁ^b,
RICHARD HRABAL^c a ZDENĚK BUBNÍK^a

^a Ústav chemie a technologie sacharidů, ^b Ústav technologie mléka a tuků, ^c Centrální laboratoře, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
evzen.sarka@vscht.cz

Připravený acetylovaný B-škrob byl usušen a mechanicky desintegrován. Následně byla proměřena velikost částic dvěma instrumentálními technikami – analýzou obrazu a metodou laserové difrakce. Stupeň acetylce byl stanoven pomocí ¹H NMR spekter. U jednotlivých vzorků byla proměřena rovněž FT-IR spektra, která byla statisticky vyhodnocena pomocí PCA. Při stupni acetylce DS > 1 byly významně odlišné vzorky A- a B-škrobu a vzorek B15, který obsahoval silikagel.

Příspěvek byl zpracován v rámci řešení grantového projektu GA ČR 525/09/0607 „Biodegradabilní kompozitní materiály na bázi B-škrobu s upotřebením v zemědělství“.

IMAGE ANALYSIS AS A TOOL FOR SUGAR AND STARCH TECHNOLOGY

EVŽEN ŠÁRKA and ZDENĚK BUBNÍK

Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, ICT Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
evzen.sarka@vscht.cz

The size of particles is a very important parameter for modelling of many engineering processes or designing food machines and devices.

The image analysis system (delivered by LABORATORY IMAGING Co., Prague, Czech Republic), involves a suitable measurement methodology (selection of the optimal magnification level, setting-up lighting, and creating a subroutine including contrast and threshold values).

Our department uses image analysis to measure particle size in these areas of sugar technology: growth of the precipitate in a prelimer¹, 1st and 2nd carbonation slurry² or sugar slurry for crystallization.

We use this method in starch industry for surface and volume models of wheat, barley and legume seeds, identification of native or modified starches. E.g. a geometric model based on image analysis measurement, consisting of two cone frustums provided the best approximation of

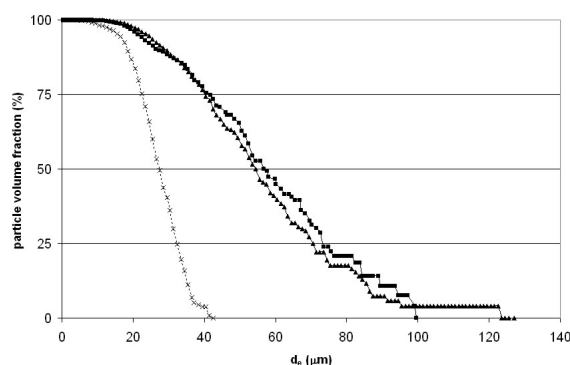


Fig. 1. **Cumulative distribution curves;** - -x- - wheat acetylated distarch adipate (ADA), --■-- potato ADA, --▲-- cationic starch

volume for a barley kernel³, and on the other hand geometry of wheat kernels⁴ and most of bean varieties allowed to be well modelled as triaxial ellipsoid. Two sphere segments approximation was more suitable in the volume computation of both red and green lentils than oblate sphere approximation. The percentage difference between volumes estimated by the pycnometric method and that of optimized models was lower than 7.3 %. Besides this the method enables to determine specific area of seeds.

Identification of native or modified starch powders or suspensions is based on determined size distribution and comparison with known samples.⁵ Iodine inking of starch granules enables identification in mixtures with other materials as well. Often the starch modification doesn't influence starch granule size significantly therefore the sample can be compared with other modified or native starches (see Fig. 1)

Digital image processing approach could potentially be a simple, rapid, and non-invasive alternative to the traditional measurement methods.

This research was supported by the Research Intention "Theoretical Fundamentals of Food and Biochemical Technologies" of MSMT CR, No. MSM 6046137305.

REFERENCES

- Šárka E., Bubník Z., Hinková A.: *Zuckerind.* 131, 551 (2006).
- Šárka E., Bubník Z., Kadlec P., Veselá-Trilčová A.: *J. Food Eng.* 87, 45 (2008).
- Sýkorová A., Šárka E., Bubník Z., Schejbal M.: Size distribution of barley grains. *Sborník 4. konference Polysacharidy/ Polysaccharides 2008*, CD-ROM. ČSCH, Praha 2008.
- Firatligil-Durmuş E., Sýkorová A., Šárka E., Bubník Z., Schejbal M., Příhoda J.: Geometric parameters of wheat grains using image analysis and FEM approach. *18th International Congress CHISA 2008*, CD-ROM. Praha 2008.
- Šárka E., Bubník Z.: *Starch*, in press.

VARIATION IN THE CONTENT OF DIETARY FIBRE IN BREAD WHEAT VARIETIES

**ZUZANA ŠRAMKOVÁ^{a,*}, EDITA GREGOVÁ^b,
ERNEST ŠTURDÍK^a, MICHAELA HAVRENTOVÁ^b,
and JANA JUROVATÁ^c**

^a Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Research Institute of Plant Production, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, ^c University of Ss. Cyril and Methodius, J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovak Republic
zuzana.sramkova@stuba.sk

Common wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most widely cultivated crops, and thus it presents the main source of nutrients to the majority of the world's population. Numerous studies demonstrated the beneficial effects of fibre consumption in protection against heart disease and cancer, normalization of blood lipids, regulation of glucose absorption and insulin secretion and prevention of constipation and diverticular disease^{1,2}. Products with a high content of dietary fibre are considered an essential part of a healthy diet.

In this study, we analyzed a set of 72 wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) kept in the collection of the Genebank Piešťany in order to find the variation in the content of dietary fibre and components thereof (namely β -glucans). Soluble fibre such as (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan (referred to as β -glucan), plays a role in the prevention and treatment of serious human health conditions, including high serum cholesterol and cardiovascular diseases, obesity and non-insulin-dependent diabetes³. β -Glucans were shown to have immunostimulating activity⁴. Wheat is not generally thought of as a β -glucan source; levels are usually less than 1 %, commonly about 0,6 %. However, specific histochemical techniques reveal a distinct localisation in the aleurone and adjacent sub-aleurone region. New friction/abrasion pre-processing techniques for wheat are able to access this region in a more precise fashion than has been achieved with conventional milling. Moreover, the β -glucan content of cereal grains is genotype-dependent and high level of variability was found among other cereal crop species such as oat and barley.

The results showed that the content of total dietary fibre in common wheat varieties varied between 10,3–15,7 %. The β -glucan levels varied from 0,19 to 1,68 %. We can conclude that the differences in composition between wheat varieties were genetically determined. The application of genome mapping allows revealing the associations between the variation in composition and specific genome regions, thus facilitating the development of molecular markers which are used by plant breeders to select for varieties with enhanced health benefits.

This work was supported by the Slovak Grant Agency for Science VEGA (Grant No. 1/0845/08), AV (Grant No. 4/0013/07) and by the Slovak Research and Development Agency APVV (Grant No. VMSP-P-0022-07).

REFERENCES

1. Weickert M. O., Pfeiffer A. F.: *J. Nutr.* 138, 439 (2008).
2. Napolitano A., Costabile A., Martin-Pelaez S., Vitaglione P., Klinder A., Gibson G. R., Fogliano V.: *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 19, 283 (2009).
3. Shimizu C., Kihara M., Aoe S., Araki S., Ito K., Hayashi K., Watari J., Sakata Y., Ikegami S.: *Plant Foods Hum. Nutr.* 63, 21 (2008).
4. Dalmo R. A., Bøgwald J.: *Fish Shellfish Immunol.* 25, 384 (2008).

OBRAZOVÁ ANALÝZA JAKO OBJEKTIVNÍ METODA HODNOCENÍ STŘÍDY PEČIVA

**IVAN ŠVEC, MARIE HRUŠKOVÁ,
MARIE KRPÁLKOVÁ a MARTA KOSTELANSKÁ**

VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
Ivan.Svec@vscht.cz

Analýza obrazu je v současné době v cereálních laboratořích zavedena např. pro porovnání různých druhů a krajových typů pečiva nebo také pro hodnocení změn v receptuře. V této práci byla použita pro hodnocení vlivu ročníku sklizně na vzhled střídy pečiva připraveného ze čtyřiceti vzorků maloobchodních mouk vyrobených ve čtyřech ročních. Dále byl testován vliv přísady mléčných složek a komerčních pekařských zlepšovadel na vzhled střídy pečiva připraveného z komerční pšeničné mouky. Pekařský pokus s těstem kompletní receptury byl proveden podle interní metodiky VŠCHT Praha. Byl hodnocen tvar a měrný objem pečiva, senzorický profil a penetrace střídy. Následně byla provedena analýza obrazu pomocí programu Lucia G 3.52. Zjištěné rozdíly ve vzhledu pečiva byly statisticky posouzeny korelační a variační analýzou a metodou hlavních komponent.

Výsledky pekařského pokusu a korelační analýzy potvrdily význam měrného objemu pro celkovou jakost a penetrace střídy pro spotřebitelskou kvalitu pečiva. Vzhled střídy pečiva z maloobchodních mouk vyrobených v roce 2003 byl průkazně odlišný v porovnání s ostatními ročníky – byla zjištěna nejmenší hodnota střední plochy póru (průměr souboru 0,84 mm²), nejvyšší počet pórů na cm² (43) a zároveň nejnižší objemy pečiva (273 ml/100 g). Naproti tomu v ročníku 2005 byla stanovena střední plocha póru největší s 33 póry na cm², proto také průměr měrného objemu pečiva v souboru vzrostl o 25 % (341 ml/100 g). Analýza hlavních komponent prokázala rozdílný vliv mezi skupinami mléčných složek a zlepšujících přípravků. Přídavek mléčných surovin způsobil celkově mírný pokles měrných objemů pečiva a snížení střední plochy póru v průměru o 33 % (1,05 proti 1,51 mm²). Pekařské přípravky zvýšily měrný objem pečiva, ale nárůst střední plochy póru byl v průměru skupiny nevýznamný (1,56 vs. 1,51 mm²).

DERIVATIVES OF OXIDIZED CELLULOSE

TOMÁŠ TAUBNER^a, JIŘÍ SOBEK^b, PAVEL HAVELKA^c, FRANTIŠEK KVASNIČKA^a, ANDRIY SYNYTSYA^a, and JANA ČOPÍKOVÁ^{a*}

^a Institute of Chemical Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6, ^b Institute of Chemical Process Fundamentals of the ASCR, v.v.i., Rozvojova 2, 165 02 Prague 6 – Suchbátka, ^c Výzkumný ústav organických syntéz a.s., Rybitví 296, 533 54 Rybitví, Czech Republic
Jana.copikova@vscht.cz

The reactivity of Na⁺ salt of oxidized cellulose and its oligosaccharides with chitosan will be presented. Hydrolysis of Na⁺ salts of oxidized cellulose was carried out in homogenous system by means with microwave (MW) irradiation at constant conditions (100 °C, 950W). The reaction progress was monitored by capillary isotachopheresis and size exclusion chromatography. Reactivity of oxidized cellulose or its hydrolysates with NH₂ groups of chitosan was promoted by MW irradiation. Reaction was monitored by infrared spectroscopy.

This work was supported by the Ministry of Industry and Trade (project 2A-ITP1/041).

CHARACTERIZATION OF CHITINOUS POLYAMINOGLYCOSIDES

GALINA TIŠČENKO^{a*}, JIŘÍ SÍMŮNEK^b, JIŘÍ BRUS^a, MILOŠ NETOPILÍK^a, ZUZANA WALTEROVÁ^a, MICHAL PEKÁREK^a, JIŘÍ LENFELD^a, and INGRID KOPPOVÁ^b

^a Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of Czech Republic, v.v.i., Heyrovský Sq.2, 162 06 Prague 6, ^b Institute of Animal Physiology & Genetics, Academy of Sciences of Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic
tiscenko@imc.cas.cz, simunek@iapg.cas.cz

When degraded, the linear biopolymer chitosan forms polyaminoglycosides (chiPAGes) consisting of GlcNH₂ and GlcNHCOCH₃ units linked with β-glycosidic bonds. ChiPAGes show high biological activity (antimicrobial, anticancerogenic, anti-inflammatory, antidiabetic, and etc.). In this study, chiPAGes prepared by enzymatic, oxidative or microwave degradation were characterized by CP MAS ¹³C NMR, MALDI TOF MS, FTIR and GPC.

INFLUENCE OF DRYING ON RHEOLOGICAL PROPERTIES OF MARSHMALLOWS

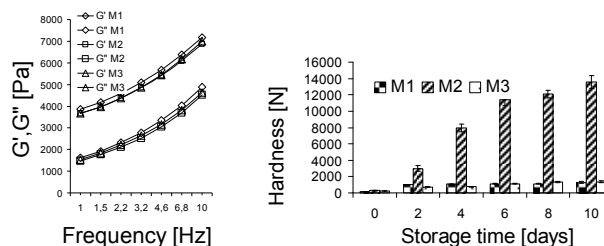
MARTA TOMCZYNSKA-MLEKO

Department of Milk and Hydrocolloids Technology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland
martamleko@tlen.pl

Marshmallows are foamed polysaccharide confectionery products. They are prepared traditionally from a mixture of gelatin, sugar, and water, but carrageenan, starch, locust bean gum and other polysaccharides are also used. Marshmallows texture can range from very light, moist frappes, to firm, elastic marshmallows, and to dry crisp candies. Researchers have suggested that hardening of stored marshmallows can be caused by loss of moisture which influence their plasticity². No published data exists on influence of storage of marshmallows on their rheological properties.

Materials and methods: Three different commercial marshmallows (M1, M2 and M3) were used. Their chemical composition was evaluated using AOAC methods³. Viscoelastic properties of marshmallows were analyzed using RS-300 ThermoHaake rheometer. Marshmallows were stored in humidity chamber for 10 days (25 °C, humidity 42 %). Every 2 days texture profile analysis by double compression (TA-XI2i texture analyzer) was performed.

Results and discussion: All analyzed marshmallows were elastic materials as storage modulus G' was several times higher than G'' loss modulus. M1 was characterized by the highest values of moduli and this product had the highest sucrose concentration (79.4 %) in comparison to M2 (76.1 %) and M3 (77.5 %). Storage decreased springiness, cohesiveness and resilience and increased hardness and gumminess and chewiness. For M2 much higher values of hardness were measured (chart). This product was characterized by the lowest fat content (0.09 %) in comparison to M1 (0.32 %) and M3 (0.24 %). High correlations were observed between hardness and gumminess, hardness and chewiness and between gumminess and chewiness (R² = 0.97–0.99). Tan et al.² concluded, that the main mechanism of hardening in marshmallows is because of moisture loss with sucrose crystallization possibly playing a role while for Gelatine B 2.2% formulation, gel networking seemed to be a factor. Our results show, that dif-



ferences in marshmallows fat content are probably responsible for different behavior of this product at the storage. Fat can inhibit water migration from inside of the product. Asama et al.⁴ invented fat-and-oil compositions for inhibiting water migration from foods. Edible films could also prevent marshmallows water loss.

REFERENCES

1. Campbell G. M., Mougeot E.: *Trends Food Sci. Tech.* 10, 283 (1999).
2. Tan J. M., Lim N. H.: *Int. J. Food Sci. Tech.* 43, 1699 (2008).
3. AOAC, *Official Methods of Analysis*, 15th Edn., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC (1990).
4. Asama K., Fujinaka M., Kida H.: European Patent Application EP1787521 (2008).

PREPARATION OF SORBENTS BASED ON CHITOSAN DERIVATIVES

JAN TUMA* and ANDRIY SYNYTSYA

*Institute of Chemical Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6, Czech Republic
jan.tuma@vscht.cz*

Chitosan is a linear polysaccharide (polymer of 1,4 bound 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose) obtained by *N*-deacetylation of chitin. Chitosan and its derivatives are important in many applications included pharmaceutical and biomedical ones. Some chitosan derivatives are also shown to have a cholesterol lowering effect. Quaternary salt of chitosan (*N*-trimethyl chitosan) and acylated chitosan (palmitoyl chitosan) were prepared and characterized. Quaternization of chitosan is carried out by methyl iodide/potassium carbonate in methanol, acylation was done by the reaction with palmitoyl chloride in DMF. Purity and substitution degree was controlled by FTIR spectroscopy and NMR.

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (project No. CEZ: MSM6046137305).

VARIABILITY OF NON-STARCH POLYSACCHARIDES IN GRAIN OF VARIOUS BARLEY GENOTYPES

KATEŘINA VACULOVÁ^a, RENATA MIKULÍKOVÁ^b, MARTA BALOUNOVÁ^a, and KAROLÍNA BENEŠOVÁ^b

^a *Agrotest Fyto, Ltd., Havlickova 2787, 767 01 Kromeriz,*

^b *Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Malting Institute, Mostecka 7, 614 00 Brno, Czech Republic
vaculova.katerina@vukrom.cz*

Mixed linkage (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) beta-glucans and pentosans (mainly arabinoxylans) are the major endosperm cell-

wall polysaccharides and the most important non-starch polysaccharides (NSP) of barley and wheat, respectively. These polysaccharides, although minor components of the whole grain, significantly affect the industrial and feeding utilization of these cereals. Their content varies depending on the genotype, climatic and cropping conditions¹.

A set of 21 cultivars and 80 new lines of spring barley with hulled and hullless grain and a genetically different amylose/amylopectin ratio (presence of the recessive allele of the gene waxy encoding a decreased proportion of amylose was checked by molecular markers²) was used to study the content and variability in NSP and their relation to genotypic differences, *N*-substances content and kernel weight. The content of beta-glucans was determined using an FIA method (flow-injection analysis, according to EBC method 8.13.2), the content of pentosans using the spectrophotometric method (the measurement was made at 510 and 552 nm according to Douglas³), and the content of *N*-substances according to Dumas (ICC method No. 167).

The content of beta-glucans in grain ranged from 2.6 % to 10.9 % (KM2619.413.4.03 – a new line with hullless grain and waxy allele), pentosans from 3.68 % to 8.23 % (KM2691.386/5.10.03 – a new line with covered grain), while beta-glucans were higher in the group with hullless and pentosans in materials with covered grain. The significant negative correlation ($r = -0.45^*$) was calculated between the two groups of NSP. Differences in grain hull content and the presence of an allele of the gene waxy affected both the level and direction of the interrelationship between NSP content and other characteristics examined. Whereas there was a significant positive correlation between kernel weight and beta-glucan content ($r = 0.74^{**}$) and, on the contrary, negative correlation to pentosan content ($r = -0.39^*$) in materials with hullless grain and standard starch composition, such trends were weak and insignificant in other sets.

In contrast with results reported by some foreign authors⁴, our findings document that materials with markedly different NSP content suitable for different non-malting use can be selected among hullless barley accessions.

Financial support from the Ministry of Agriculture and Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic under projects QH91053 and MSM2532885901 is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Ehrenbergerová J., Vaculová K., Psota V., Havlová P., Šerhantová V.: *Plant Soil Environ.* 49, 443 (2003).
2. Vaculová K., Ehrenbergerová J., Pouch M.: In: *Proceedings to the Meeting of the Eucarpia Cereal Section, Lleida (Spain), 13–17 November 2006*, (J. L. Molina Cano et al, ed.). 289–293. Options méditerranéennes, SERIE A: Séminaires Méditerranéens, Numéro 81. CIHEAM, Zaragoza 2008.
3. Douglas S.G.: *Food Chemistry* 7, 139 (2001).
4. Helm J. H., Juskiw P. E., Oatway L., Sauer W. C.:

Genetic and Environmental Effects on the Feed Quality of Hulless Barley. Final Report, Farming for the Future Project #94M616 (2001) <http://www.aari.ab.ca/index.cfm>.

SEED IDENTIFICATION BY MEANS OF IMAGE ANALYSIS AND LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS: CASE STUDIES

Invited lecture

GIANFRANCO VENORA* and OSCAR GRILLO

Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, via Buganvillea 20, 95041 Caltagirone, Italy
venora@granicoltura.it

Vision is the fundamental cognitive and exploration method. In research, as well as in industry, many analysis and evaluations are entrusted to vision. Electronics and computer science have created possibilities replacing visual assessment and this has spurred a wealth of research in this area.

Seed identification by specialized technicians is slow and somewhat subjective giving results which may be difficult to quantify both for business and technological implications. Therefore, it is important economically and technically to implement repeatable and quick automated methods to identify and classify seeds. Automatic systems can be based on seed images, from which the characteristics for the classification, such as size, shape, colour and texture, can be obtained quickly.

For many years at the Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia laboratories, we have advantaged of image analysis technology, to develop applications or macros for routine analysis in various seed identification challenges. Some case studies, are here reported and discussed.

Seed colour and size determine the appearance of grain legumes such as lentils (*Lens culinaris Medik.*) for its quality colour grading. Seeds images were captured by a flatbed scanner, to measure seed size, shape and mean colour on individual seeds with a specifically developed tool based on image analysis library KS-400 V 3.0 (Carl Zeiss, Germany). Each seed imaging data were computed with a Linear Discriminant Analysis algorithm (Classifier) to identify five landraces and three varieties of lentil. This LDA algorithm was used also in the other case study to develop classifiers. The performance of the lentil classifier was 99.8 % for the training sets and 97.1 % for the independent test set. In addition to commercial international trade, lentil seed characterisation is very important to identify and catalogue in a biodiversity conservation program¹.

Statistical classifiers to identify 15 landraces of bean (*Phaseolus vulgaris L.*), one landrace for two cultivation regions and two landraces for different harvest years were obtained. The macro, called Bean.mcr, works quickly and accurately. The performance of the four classifiers was as

follows: the first, for the identification of 15 landraces, 99 % training set and 98.20 % test set, respectively; the second, to identify two harvest years, 99 % and 100 %; the third, to identify three harvest years, 100 % and 98.82 %; the fourth, for the identification of the two different cultivation regions, 94.5 % and 82.40 %. The macro gives, to a certain extent, the possibility of tracing beans yield, in order to get a “market card” for landrace beans².

Cultivar identification of *Vicia sativa L.* (common vetch) is done on distinctive traits relieved at variety registration following official protocols (UPOV). Seeds morpho-colorimetric features of nine cultivars of common vetch (*Vicia sativa L.*) and one of hairy vetch (*Vicia villosa Roth*) were measured on acquired images by flatbed scanner, using a specifically developed macro called Vetch.mcr. The performance of classifier was 99.2 % in the training set and 88.20 % in the test set respectively³.

Digital images acquired by a flatbed scanner of ex situ germplasm stored in a Germplasm Bank were used. The analysed accessions refer to 148 taxonomic units belonging to 102 genera and 47 families, typical of the Mediterranean flora. This method allowed carrying out a database for the characterization of autochthonous germplasm in entry to the bank and the realization of statistic classifiers for the discrimination of genera and species. Such classifiers showed a performance included between 74.3 % and 96.4 % (ref.⁴).

The proportion of vitreous kernels in a sample is an internationally recognized specification for determining the value of durum wheat (*Triticum durum Desf.*). Vitreous kernels are mostly related to quality, which affects the pasta performance during cooking. Vitreousness and the amount of shrunken kernels are visually assessed during the grading process.

A machine vision system was developed to determine the percentage of vitreous, starchy, piebald and shrunken kernels in approximately 100 grain samples, using a trans-illuminated image of one layer of non-singulated kernels (in bulk) acquired by a digital camera. Classification models were developed with stepwise LDA, as well as an on-line Bayesian classifier integrated with the image analysis system. The overall correct classification in Starchy classifier was high 98.58 % in the Training set, made up of 6679 grains, following the Linear Discriminant Analysis classification, of 30 Italian cultivars harvested in 2005 in three localities. An independent Test set was constituted by samples collected in 30 Sicilian Storage Centres in the 2007 harvest season, the overall classification was 96.03%. For the Shrunken classifier 95.27% of the Training set and 99.58 % of the Test set were correctly classified. The image analysis system was more reliable than the human inspectors who validated the system, both for the same samples measured many times and at different times⁵.

REFERENCES

1. Venora G., Grillo O., Shahin M. A., Symons S. J.: Food Res. Int. 40, 161 (2007).

2. Venora G., Grillo O., Ravalli C., Cremonini R.: *Sci. Hortic-Amsterdam* 121, 410 (2009).
3. Venora G., Grillo O., Miceli C. *Proceedings of the 53rd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Torino, Italy - 16/19 September, 2009*. Abstract accepted, 2009.
4. Bacchetta G., Grillo O., Mattana E., Venora G.: *Flora* 203, 669 (2008).
5. Venora G., Grillo O., Saccone R.: *J. Cereal Sci.* 49, 429 (2009).

GLUCAN – MAGIC BULLET OR BIG CON?

Invited lecture

VÁCLAV VĚTVIČKA

Department of Pathology, University of Louisville, Louisville, Kentucky, USA
vaclav.vetvicka@louisville.edu

Polysaccharides have a long history as immunomodulators. The first investigations were published almost 60 years ago. When pharmacological actions of glucan are concerned, it all started with zymosan, which is basically a crude version of glucan. In 1956 it has been found that zymosan increased resistance to bacteria, later that it promotes rejection of sarcoma. Subsequent studies have shown that soluble glucans from mushrooms trigger rejection of cancer, in 1983 Japanese approved clinical use of Lentinan and Schizophyllan in patients with gastric carcinoma.

With commercialization of glucan came also a push to sell glucan as a newest magic bullet able to cure just about everything on Earth. How much are these claims accurate?

EVALUATION OF STARCH CONTENT IN CANE SUGAR

MACIEJ WOJTCZAK* and ANETA ANTCZAK

Technical University of Lodz, Institute of Chemical Technology of Food, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, Poland
maciej.wojtczak@p.lodz.pl

As a result of the 2006 reform of sugar market regime, Europe moved from the position of a significant exporter of white sugar to the position of the second in the world, after Russia, importer of sugar. The increasing entrance of cane sugar to the European market requires proper reaction of both sugar producers and industrial users of sugar. It is thus quite justified to undertake in Europe analysis of cane sugar concerning its quality as well as functional properties. The quality of cane sugar is strongly differentiated and it depends on the kind of sugar and on the country of its origin. Correct evaluation of the

quality of cane sugar requires proper analytical methods.

One of the criteria specific in the process of evaluation the quality of cane sugar is the content of starch. This polysaccharide is a natural component of sugar cane¹. It is synthesized in the plant as a result of glucose condensation which takes place at night, that is, in the absence of light¹. From cane, starch gets into all products of cane processing, including raw as well as refined sugar^{2,3}. The presence of starch in raw sugar results in an increase of juice viscosity, which leads to lowering of the effectiveness of juice filtration and to poorer results of the processes of purification and decolorization⁴. Besides, the presence of starch is an obstacle in the process of crystallization¹⁻³. We can thus see that the presence of starch finally leads to lower effectiveness of the refinery.

The aim of the present paper was to determine the content of starch in cane sugar of different origins by the ICUMSA method GS1-17. This method measures starch in sugar as a blue starch-iodine complex. The material for the analysis consisted of: raw and refined cane sugar samples and various commercial cane sugars.

The obtained results show that the content of starch in cane sugars was from 30 to about 400 mg kg⁻¹, depending on the kind of cane sugar. Thus, the determination of the content of starch may be treated as a one of the indicators differentiating white cane sugar from beet sugar, which contains no starch. The content of starch in refined cane sugar should be an important criterion of the quality of sugar as raw material for various branches of food industry.

The study was supported by the researcher grant No. NN312 165934 form the Polish Ministry of Science and Higher Education.

REFERENCES

1. Poel P. W., Schiweck H., Schwartz T., in *Sugar Technology. Beet and cane sugar manufacture*, Verlag Dr Albert Bartens KG, 1998.
2. Eggleston G., Montes B., Monge A., Guidry D.: *Int. Sugar J.* 1310, 97 (2008).
3. Eggleston G., Montes B., Monge A., Guidry D.: *Int. Sugar J.* 1305, 579 (2007).
4. Rein P., in *Cane Sugar Engineering*, Verlag Dr Albert Bartens KG, 2007.

SYNTHESIS AND SWELLING BEHAVIOR OF CHITOSAN/POLY(ACRYLIC ACID) HYDROGEL MEMBRANES

KATARZYNA ZIELIŃSKA*, ALEXANDER CHOSTENKO, and STANISŁAW TRUSZKOWSKI

Chair of Nuclear and Radiation Chemistry, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, Gagarina Street 7, 87-100 Toruń, Poland
kziel@doktorant.umk.pl

One of the way to partial reduction of water deficit

on light, can be application of additives causing the enlargement of water retention. To help plants and trees grow in extremely dry areas, the hydrogels are applied. They adsorb water and minerals and store it, releasing it back to the plant when needed, e.g. during the dry season. Hydrogels, for example chitosan membranes are three-dimensional networks which swell in water and biological fluids. Chitosan is a high-molecular-weight polysaccharide composed mainly of β -(1,4) linked D-glucosamine and partially of β -(1,4) linked N-acetyl-D-glucosamine. It is generally prepared by the partial deacetylation of chitin – the most abundant natural polymer next to cellulose^{1–3}.

In this work, hydrogels based on chitosan membranes grafted acrylic acid were prepared by ⁶⁰Co γ -radiation. The aim of this work is to investigate the swelling characteristics of the chitosan/poly(acrylic acid) membranes under various pH condition.

Scientific work funded by the European Social Fund and the State Budget as part of The Integrated Regional Operational Programme, Measure 2.6 "Regional Innovation Strategies and transfer of knowledge" under a project of the Regional Council of the Kujawsko-Pomorskie Province "Scholarships for PhD Students 2008/2009 – IROP".

REFERENCES

1. Yang L., Shi L., Chen J., Pei Y., Zhu F., Xia Y.: *Macromol. Symp.* 225, 95 (2005).
2. Shim J., Nho Y.: *J. Appl. Polym. Sci.* 90, 3660 (2003).
3. Lee J. W., Kim S. Y., Kim S. S., Lee Y. M., Lee K. H., Kim S. J., Krishnaiah A.: *J. Appl. Polym. Sci.* 73, 113 (1999).

RICE STARCH AS A PORE-FORMING AGENT IN CERAMIC TECHNOLOGY

ZUZANA ŽIVCOVÁ, EVA GREGOROVÁ,
and WILLI PABST

Institute of Chemical Technology, Prague, Department of Glass and Ceramics, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
Zuzana.Zivcova@vscht.cz

During the last decade starch has become one of the favorite pore-forming agents for the preparation of porous ceramics (the starch granules burn out during firing, leaving voids). Rice starch is interesting because it is the smallest commercially available starch type, but in ceramic processing it exhibits characteristic differences (compared to other starch types) in rheology, swelling behavior and the resulting pore space, which are investigated in this study.

Support within the project „Porous ZrO₂ ceramics – preparation and characterization“ (internal grant VŠCHT) and the frame research program "Preparation and Research of Functional Materials and Material Technologies using Micro- and Nanoscopic Methods", (Grant MSM 6046137302, MŠMT) is gratefully acknowledged.

Autorský rejstřík

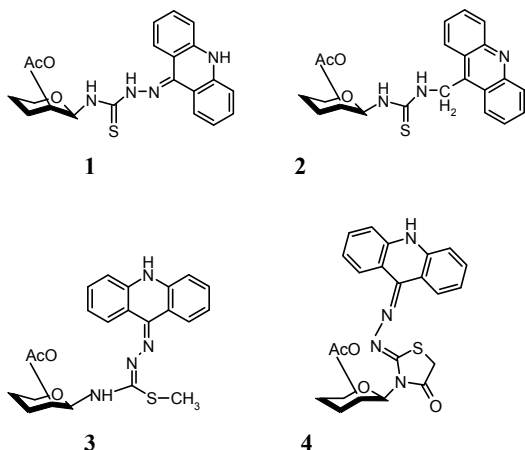
- Achrem-Achremowicz J. 765
Antczak A. 780
Augustin J. 773
- Bachanová M. 763
Balounová M. 778
Benešová K. 778
Bernaš E. 764
Blahovec J. 762, 766, 769
Brezová V. 755
Brléjová M. 755
Brus J. 777
Bubník Z. 774, 775
Buffa R. 755
Bucher P. 755
Buksa K. 755
Burgárová A. 760
- Capek P. 756
Cieslik E. 766
Cihelková L. 774
- Černý M. 760
Čerstvý R. 757
Čertík M. 755
Čopíková J. 759, 769, 777
Čurda L. 769
- Dandar A. 773
Diblíková L. 769
Dlouhý J. 757
Dostálová R. 756
Duchek P. 757
Dvořáček V. 758
- Ebringerová A. 763
Evranuz O. 759
- Faměra O. 758
Filipi M. 768
Firatlıgil-Durmus E. 759
Foglarova M. 759
Fortuna T. 765
- Galkowska D. 765
Gedeon O. 769
Gomba K. G. 759
Gregorová E. 760, 776, 781
Grillo O. 779
Griszkin A. 765
Gustaw W. 770
- Hauptvogel P. 760, 761
Havelka P. 768, 777
Havrlentová M. 760, 761, 776
Hejlova A. 762, 769
Hirsch J. 763
Hofmanová T. 763
Horáček J. 756, 772
Horváthová V. 762, 767
Hrabal R. 775
- Hromádkova Z. 763
Hrušková K. 774
Hrušková M. 763, 776
Huber A. 771
Hýbl M. 772
- Chostenko A. 780
- Jablonský I. 764
Jaworska G. 764, 765
Jurovatá J. 776
Juszczak L. 765
- Klčová L. 767
Koláček J. 775
Koppová I. 777
Kostelanská M. 776
Košťálová Z. 763
Kotek J. 774
Kouřimská L. 758
Kováčová R. 765, 775
Kozák J. 756
Krejčová J. 765
Krpálková M. 776
Kruliš Z. 774
Kubalová M. 763
Kvasnička F. 777
- Lahodová M. 766
Lenfeld J. 777
Libich M. 764
Lipavský J. 758
Lisiewska Z. 765
Liverani F. S. 756
Loeppert R. 771
Löppert R. 766
Lukáš J. 758
- Marounek M. 767
Martinek P. 755
Masár Š. 767
Matulová M. 756
Mayerová M. 758
Mikulíková D. 762, 767
Mikulíková R. 778
Milichovska S. 768
Milichovsky M. 768
- Navarini L. 756
Nebesny E. 772
Netopilík M. 777
Novák M. 769
Novanská H. 762
Novotný D. 758
- Ondáš V. 762
Ostrowska-Czubenko J. 769
- Pabst W. 760, 781
Papoušková L. 758
Pavelek M. 772
- Pekárek M. 777
Pieróg M. 769
Pietrzyk S. 765
Pocedičová K. 769
Potocka E. 770
Pour V. 774
Praznik W. 766, 771
Procházka V. 769
- Rapta P. 755
Riljáková B. 758
Rosicka-Kaczmarek J. 772
Růžek L. 774
Ryzner R. 764
Rzepka M. 773
- Skoczeń-Słupska R. 764
Skrivanová E. 767
Slepička P. 769
Słowik M. 765
Słupski J. 765
Smýkalová I. 772
Sobek J. 777
Solarz E. 770
Sopuch T. 768
Strachota A. 757
Surówka K. 773
Synytsya A. 759, 765, 769, 775, 777, 778
Synytsya Alla 769
- Šárka E. 774, 775
Šimůnek J. 777
Šliková S. 760, 761
Špírková M. 757
Šramková Z. 776
Štětina J. 765
Šturdík E. 776
Šudyová V. 760, 761
Švec I. 763, 776
- Taubner T. 777
Tiščenko G. 777
Tomczynska-Mleko M. 777
Tomšovský M. 759
Truszkowski S. 780
Tůma J. 767, 778
- Vaculová K. 778
Velebny V. 755, 759
Venora G. 779
Větvíčka V. 780
Volek Z. 767
- Walterová Z. 777
Wojtczak M. 780
- Zięba T. 765
Zielińska K. 780
- Živcová Z. 760, 781
Žofajová A. 767

LIBLICE 2008 - DODATKY

NOVÉ AKRIDÍNOVÉ GLYKOKONJUGÁTY
SLÁVKA HAMUĽAKOVÁ, EVA BALETOVÁ, JÁN
IMRICH, PAVOL KRISTIAN a LADISLAV DRAJNA

Univerzita P. J. Šafárika, Prírodovedecká fakulta, Ústav chemických vied, Moyzesova 11, 040 01 Košice
ladislav.drajna@gmail.com

Vo vývoji nových antitumorových a antivirálnych liečiv nemalú rolu hrajú glykokonjugáty, kde glykozidická zložka je naviazaná na aglykón so zaujímavými biologickými vlastnosťami. Vzhľadom na náš záujem o deriváty akridínu, pripravili sme nové glykokonjugáty so sacharidovou časťou pripojenou na akridínový skelet cez linker alebo cez tiazolidínový skelet. Za sacharidové prekursorzy sme zvolili glykozylizotioiokyanáty¹, ktoré sa získali konverziou peracetylovaných sacharidov s trimetylsilylizotioiokyanátom za prítomnosti SnCl₄. Príslušné tiosemikarbazidy **1** sa syntetizovali reakciou tetra-*O*-acetyl-β-glykozyl izotioiokyanátov s 9-hydrazinylakridínom a tiomočoviny **2** obdobne reakciou s 9-aminometylakridínom². Tiosemikarbazidy **1** a tiomočoviny **2** sa použitím mezitylnitriloxidu kvantitatívne previedli na príslušné semikarbazidy a močoviny. Adičné a adično-cyklizačné reakcie tiosemikarbazidov **1** s metyljodidom poskytli glykozylizotiosemikarbazidy³ **3** a s metylbromacetátom príslušné 1',3'-tiazolidin-4'-ony **4**. Pripravené zlúčeniny sa testovali na antitumorovú účinnosť na šiestich rakovinových bunkových líniah na Katedre farmakológie LF UPJŠ Košice.



Táto práca vznikla za podpory grantovej agentúry VEGA (1/0476/08) a štátneho programu NMR (2003SP200280203).

LITERATÚRA

1. Al-Masoudi N., Hassan N. A., Al-Soud Y. A., Schmidt P., Gaafar A., El-Din M., Weng M., Marino S., Schoch A., Amer A., Joachims J. C.: J. Chem. Soc., Perkin Trans.1 1998, 947.
2. Rzesturski W., Ledochowski Z.: Ann. Soc. Chim. Polonorum 37, 1631 (1963).

3. Balentová E.: Dizertačná práca, v časti: *Synthesis and Structural Elucidation of New Acridine Derivatives Possessing Five-membered Heterocyclic Rings*, Košice 2006.

NEW EXPEDIENT SYNTHESIS
OF (S)-PROPARGYLGLYCINE, A POTENT
ANTIBIOTIC COMPOUND

TOMÁŠ MAŠEK and ILYA LYAPKALO

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo n. 2., 166 10 Praha 6
masek@uochb.cas.cz

(s)-Propargylglycine (**1**) isolated from *Streptomyces*¹, is a non-proteinogenic amino acid with known antibacterial activity². A new effective synthesis of the target compound **1** has been developed, with the key step being elimination of H₂O from CH₂CH=O functionality to produce a terminal acetylene group. (t-Butylimino-tris(1-pyrrolidiny)-phosphorane (**2**, figure 1), a t-Bu-P1-base used in the key step of the synthesis of **1** was prepared by a new straightforward method obviating the formation of salt.

To achieve maximum enantiopurity, a synthetic route starting from dimethyl ester hydrochloride of the natural (s)-glutamic acid was proposed. After double Boc-protection of the amino group, a highly selective reduction of the side-chain methyl ester group to aldehyde was achieved. Resulting monoaldehyde was converted to terminal alkyne using CF₃(CF₂)₂SO₂F in combination with the t-BuP1-base, via the intermediacy of a nonaflate³. After deprotection of the amino group, a dipeptide from protected valine and methyl-(s)-propargylglycine was prepared to prove enantiopurity of the product.

The t-Bu-P1 base was prepared from pyrrolidine, PCl₃ and tert-butyl azide in two steps using the Staudinger reaction⁴. A triazene intermediate formed was isolated and its structure was determined by X-ray crystallography. The base was prepared by its thermolysis in neutral form and high purity. Tert-butyl azide is an easily prepared reagent and is safe to use.

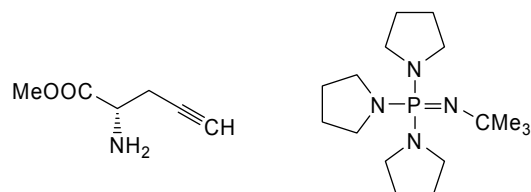


Figure 1. Structures of product **1** and auxiliary product **2**

Financial support by UOCHB AV ČR is gratefully acknowledged. We are indebted to Lanxess Deutschland GmbH for the generous donation of nonafluorobutane-1-sulfonyl fluoride.

REFERENCES

1. Scannell J. P. et al.: J. Antibiot. 24, 239 (1971).
2. Kam Sing Cheung et al.: J. Med. Chem. 26, 1733 (1983).
3. Lyapkalo I. M., Vogel M. A. K.: Angew. Chem. 118, 4124 (2006); Angew. Chem. Int. Ed. 45, 4019 (2006).
4. Goerlich J. R. et al.: Z Anorg. Allg. Chem. 620, 706 (1994).

**SYNTECKÝ FIBRONEKTIN MIMETICKÝ LIGAND
PRO INTEGRINY ZPROSTŘEDKOVANOU ADHEZI
BUNĚK NA BIOMATERIÁLY**

VLADIMÍR PROKS a FRANTIŠEK RYPÁČEK

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i. Heyrovského
nám. 2, Praha 6, 162 06
proks@imc.cas.cz

Vytvoření vhodné povrchové modifikace biomateriálu pro buněčnou adhezi je jedním z klíčových momentů nejen při přípravě biodegradovatelných materiálů pro tkáňové náhrady, ale i pro studie buněčných kultur *in vitro*. Syntetické materiály umožňují efektivní buněčnou adhezi prostřednictvím $\alpha 5\beta 1$ integrinových receptorů buněk pouze v případě, kdy z fibronektinu odvozené peptidové sekvence RGDS a PHSRN jsou umístěny v patřičné vzdálenosti vůči sobě¹ a zároveň adhezivní motivy musí být seskupeny v doménách umožňujících integrinové klastrování². V předkládaném příspěvku je diskutována příprava umělého dendritického ligandu založeném na lyzinovém jádře a hydrofilních polyamidických spojkách mezi jádrem a RGDS, PHSRN peptidovými motivy (schéma 1).

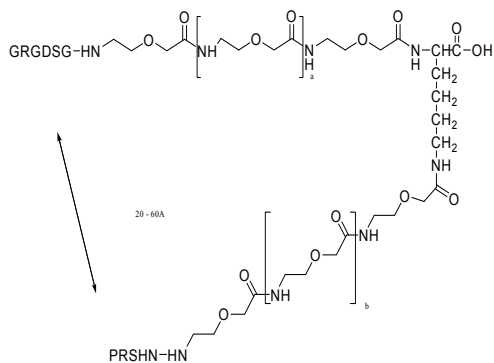


Schéma 1. Dendritický fibronektin mimetický ligand

Následná imobilizace dendritického ligandu na povrch biomateriálu má pak umožnit selektivní buněčnou adhezi pomocí $\alpha 5\beta 1$ integrinového receptoru.

Práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Akademie věd České republiky č. A4050202 a Centra buněčné terapie a tkáňových náhrad (MŠMT, grant č. 1M0021620803).

LITERATURA

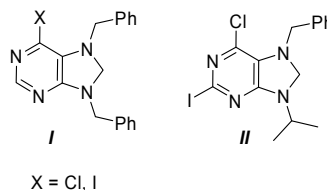
1. Petrie T. A., Capadona J. R., Reyes C. D., García A. J.: Biomaterials 27, 5459 (2006)
2. Calvanti-Adam E. A., Micoulet A., Blümmel J., Auerheimer J., Kessler H., Spart J.: Eur. J. Cell Biol. 85, 219 (2006).

**STUDIUM PŘÍPRAVY A REAKTIVITY
2- A 6-HALOGEN-7,8-DIHYDROPURINŮ
V PALLADIEM KATALYZOVANÝCH REAKCÍCH**

MARKÉTA ŠMÍDKOVÁ a DALIMIL DVOŘÁK

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-
technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
Dalimil.Dvorak@vscht.cz

Redukce 9-benzyl-2-halogenpurinu a 6-chlor-9-iso-propyl-2-jodpurinu pomocí diisobutylaluminiumhydridu poskytuje odpovídající 7,8-dihydropuriny. Jejich následnou benzylací v poloze 7 byly získány 7,9-dibenzyl-2-halogen-7,8-dihydro purin a 7-benzyl-6-chlor-9-isopropyl-2-jod-7,8-dihydro purin. Takto připravené 7,8-dihydropuriny **I**, **II** byly využity jako výchozí látky pro studium reaktivity v poloze 2 respektive 6 v některých palladiem katalyzovaných reakcích např. Heckova reakce, Suzukiho nebo Sonogashirův coupling. Byl sledován vliv použitého palladiového katalyzátoru, ligandu, kokatalyzátoru, rozpouštědla a reakční teploty.



Práce vznikla za podpory Výzkumného centra LC06070 MŠMT.

Where Chemistry Meets Life Science

14 national
chemical
societies of
EUChemSoc



are co-owners of
ChemBioChem



Austria



Belgium



Czech Republic



France



Germany



Greece



Hungary



Italy



Netherlands



Poland



Portugal



Spain



Sweden

Subscribe now!

For further information
and to subscribe please
send an E-mail to:

cs-journals@wiley.com
(North and South America)

service@wiley-vch.de
(Germany/Austria/Switzerland)

cs-journals@wiley.co.uk
(all other areas)

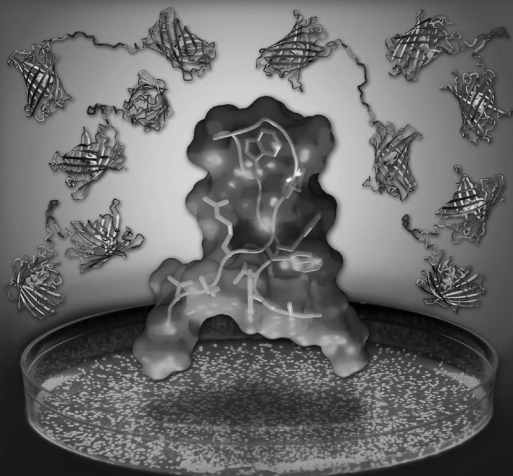
CBCHPX 8 (8) 833 - 960 (2007) - ISSN 1439-4227

D55712

A EUROPEAN JOURNAL

CHEM BIOCHEM

OF CHEMICAL BIOLOGY



**ISI Impact
Factor (2006):
4.100**



EUChemSoc



Minireview: Molecular Mechanisms of *agr* Quorum Sensing
in Virulent *Staphylococci*

Highlight: Light-Stimulated Patterning of Cells
Plus Original Contributions

Chemistry & Life Sciences

WILEY-VCH

an attractive mixture of:

- Short communications
- Full papers
- Reviews & Minireviews
- Highlights & Concepts
- News & Comments
- Book and Multimedia
Reviews

Chairmen of the Editorial Board:

Alan R. Fersht (UK)

Jean-Marie Lehn (France)

Editor:

Peter Göllitz

Managing Editor:

Lisa Abel

New in 2007: 18 issues per year



Visit **ChemBioChem** online
www.chembiochem.org



WILEY
InterScience[®]
DISCOVER SOMETHING GREAT



WILEY-VCH

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	695	EDITORIAL	695
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Minulost kyseliny dusičné: voda, nebo duch? V. Karpenko	696	The Past of Nitric Acid: Water or Spirit? V. Karpenko	696
Degradácia fosfolipidov: tvorba nového zo starého M. Šimočková a P. Griač	704	Phospholipid Degradation: Making New from the Old M. Šimočková and P. Griač	704
Spojenie extrakcie s využitím teploty zákalu micelárných roztokov s metódami atómovej spektrometrie na separáciu, prekoncepciu a špeciáciu kovov I. Hagarová	712	Coupling Cloud Point Extraction to Atomic Spectrometric Methods for Separation, Preconcentration and Speciation of Metals I. Hagarová	712
Využití chemicky modifikovaných hořkých látek v pivovarství M. Karabín, T. Brányik, R. Kruliš, M. Dvořáková a P. Dostálek	721	Application of Chemically Modified Bitter Compounds in Brewing M. Karabín, T. Brányik, R. Kruliš, M. Dvořáková, and P. Dostálek	721
Srovnání jakosti a zdravotní nezávadnosti biopotravin a konvenčních potravin T. Komprda	729	Comparison of Quality and Safety of Organic and Conventional Foods T. Komprda	729
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Nástroje pro diagnostiku spektrometru s indukčně vázaným plazmatem D. Švejcarová a M. Fišera	733	Tools for Diagnostics of Inductively Coupled Plasma Spectrometers D. Švejcarová and M. Fišera	733
porovnání způsobů přípravy oxidických vzorků tavením pro analýzu metodou rentgenové fluorescenční spektrometrie Š. Vinklerová	740	Comparison of Techniques of Melting in Sample Preparation for X-ray Fluorescence Analysis of Oxide Materials Š. Vinklerová	740
HPLC stanovenie sacharidov v procese modelovaného zrýchleného starnutia papiera K. Hroboňová, J. Lehotay, M. Jablonský a S. Katuščák	744	HPLC Determination of Saccharides in the Process of Accelerated Ageing of Paper K. Hroboňová, J. Lehotay, M. Jablonský, and S. Katuščák	744
POLYSACHARIDY 2009	753	POLYSACCHARIDES 2009	753
LIBLICE 2008 – Dodatky	783	LIBLICE 2008 – Supplement	783

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 103 (2009), čís./no. 9 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 133, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 119 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/ CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2009 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plné předplatné 2009 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBÓN & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2008 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: D. Hnyk • Dáno do tisku 25.8.2009.