

Na počátku 21. století

Století se pravidelně střídají a s nimi i nálady ve společnosti a přístup jednotlivců a spolků k sobě navzájem a ke společenské realitě „sui generis“. Česká chemická společnost prošla mnoha různými obdobími, ale dá se říci, že poslední přelom století ji zastihl ve velmi dobrém stavu a to po všech stránkách (lišky si obvykle chválí vlastní ocasey).

Členská základna je stabilní a dokonce i často platí příspěvky, její „vlajková loď“ – časopis Chemické listy dosáhl na své poměry astronomických bibliografických ukazatelů, společnost je aktivní členkou mnoha mezinárodních uskupení a bruselskými mecenáši štědrě financovaných projektů a co dokonce, v Praze se bude konat ve dnech 26. – 30. srpna 2012, pod patronací ČSCH čtvrtý celoevropský kongres chemiků. (Po prvním kongresu v Budapešti před dvěma lety, po druhém v Turinu letos a po třetím v Norimberku za dva roky.)



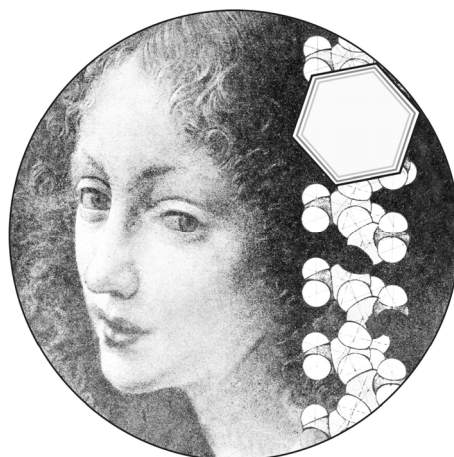
Co více by bylo potřeba pro dobro a zdar spolku? Už jen málo. Už jen říci těm, kteří se o to všechno zasloužili a dnes a denně zasluhují, kvalifikované „DĚKUJEME“. Česká společnost chemická proto usnesením svého nejvyššího orgánu, Hlavního výboru, zřídila tzv. „Medaili ČSCH“, která se zařadí mezi nejvyšší ocenění udělovaná Společností. Medaile je to svého druhu unikátní z několika aspektů, ať již uměleckých nebo technických, tak i společenských. Jejím autorem je jeden z nejlepších medailérů u nás, autor řady mincí, medailí, universitních insignií atd. atd. akademický sochař Vladimír Oppl. Ražbu provedl pan Petr Kazda ve firmě Triga-K, která vyrábí m.j. státní vy-

**4TH EU CHEMS
CHEMISTRY
CONGRESS**
www.euchems-prague2012.cz

IE **ČSCH** **ČSChS**
PRAGUE
26 - 30 AUGUST
2012

znamenání pro Hrad. A konečně, a to je to nejdůležitější, medaile smí být udělena Hlavním výborem pouze takovému člověku, který se najednou a) zasloužil o ČSCH a b) mimořádně vyznamenal na poli chemických a příbuzných věd.

Aby byla podtržena mimořádná úroveň této medaile, určil Hlavní výbor ČSCH, že její prvé dva kusy budou na jubilejním 60. sjezdu českých a slovenských chemických



asociací předány nositeli Nobelovy ceny za chemii prof. Jean-Marie Lehnovi, který se významně zasloužil o podporu kvalitních mladých chemiků u nás, o iniciaci série prestižních chemických časopisů, jejichž je ČSCH spoluvlastníkem, ale i o mnoho osobních kontaktů a spolupráci s českou chemií, včetně pořádání citovaného Sjezdu. Druhým oceněným je pak dlouholetý bývalý předseda Společnosti, prof. Vilím Šimánek, který mimo nesporné zásluhy o ČSCH, Asociaci českých chemických společností atd. atd. je ve světě znám jako čelný český představitel oboru lékařské chemie. „Quod bonum, felix, faustum, fortunatumque sit“.

Pavel Drašar

ŠPECIÁCIA ANTIMÓNU VO VODÁCH S VYUŽITÍM SPOJENIA SEPARAČNÝCH TECHNÍK S METÓDAMI ATÓMOVEJ SPEKTROMETRIE

INGRID HAGAROVÁ a JANA KUBOVÁ

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

Došlo 26.3.07, prijaté 21.6.07.

Kľúčové slová: antimón, atómová spektrometria, špeciácia, vody, technika generovania hydridov, extrakcia, chromatografia

Obsah

1. Úvod
2. Selektívna tvorba hydridov
3. Extrakčné techniky
 - 3.1. Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (LLE)
 - 3.2. Extrakcia v systéme tuhá fáza-kvapalina (SPE)
 - 3.3. Extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE)
4. Chromatografické techniky
 - 4.1. Iónovo-výmenná vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (IE-HPLC)
 - 4.2. Plynová chromatografia (GC)
5. Záver

1. Úvod

Antimón je toxický prvok, ktorý bol Americkou agentúrou pre ochranu životného prostredia (United States Environmental Protection Agency – USEPA) ako aj Radou Európskeho spoločenstva Európskej únie (Council of the European Communities) zaradený do zoznamu prioritných polutantov¹. Jeho koncentrácia v zemskej kôre sa odhaduje na 0,2–0,3 mg kg⁻¹ (cit.²). Môže sa vyskytovať v štyroch oxidačných stavoch –III, 0, +III a +V, pričom prevládajúce oxidačné stavy vo vzorkách životného prostredia sú +III a +V. Do životného prostredia sa dostáva jednak z prírodných zdrojov (vulkanická činnosť, zvetrávanie hornín), ale najmä z antropogénnych činností (spaľovanie fosílnych palív, ťažba uhlia a nerastných surovín, výroba olova, medi, skla, keramiky, farbív, gumy, ohňostrojov, plameňových retardérov, streliva, výbušnín, ohňovzdorných tkanín, batérií, motorových ložísk, polovodičov, počítačových čipov, atď.)². Uvedené priemyselné činnosti značne zvyšujú jeho koncentrácie v rôznych zložkách životného prostredia, čím sa dostáva v zvýšenej miere aj do potravinového

reťazca, čo môže mať nepriaznivý dopad na ľudské zdravie. Ako príklad možno uviesť pomer koncentrácií Sb/As v zemskej kôre, ktorý je približne 1/10. Avšak v dôsledku značného využívania antimónu a jeho zlúčenín v mnohých priemyselných odvetviach je tento pomer v znečistenom životnom prostredí obrátený³.

Je známe, že dlhotrvajúce vdychovanie zlúčenín antimónu spôsobuje podráždenie dýchacieho traktu, čo môže viesť až k vzniku pneumokoniózy. Stibín je vysoko toxický plyn, ktorý môže spôsobiť vážne poškodenie nervového systému, ale aj hemolýzu červených krviniek. Odpad obsahujúci antimón a jeho zlúčeniny môže vyvolať zápal kože, očnej rohovky, spojovky, hnisanie nosnej priehradky, ale aj žalúdočný katar².

Toxicita antimónu a jeho fyziologické správanie závisia od oxidačného stavu, od chemickej formy a prítomnosti potenciálnych ligandov, ako aj od rozpustnosti jednotlivých zlúčenín³. Elementárny antimón je toxickjší ako jeho zlúčeniny a všeobecne látky, v ktorých je prítomný ako Sb(III) sú približne 10× toxickjšie ako tie, v ktorých je prítomný ako Sb(V). Sb(III) vykazuje vysokú afinitu k erytrocytom a SH-skupinám, ktoré sú súčasťou buniek, zatiaľ čo erytrocyty sú pre Sb(V) takmer nepriepustné. Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny (International Agency for Research on Cancer – IARC) zaradila Sb₂O₃ do skupiny medzi karcinogény³. Existujú dôkazy, že po otrave antimónom nie je organizmus cicavcov detoxikovaný metyláciou (ako je to u As), ale stále nie je vysvetlený mechanizmus zodpovedný za genotoxicitu spôsobenú antimónom³.

Poznatky o rozdielnosti toxických účinkov a o kvalitatívne odlišných vplyvoch jednotlivých zlúčenín antimónu na živé organizmy viedli k snahám o analytické rozlíšenie (špeciáciu) jeho rôznych foriem (špecií) v rôznych biologických materiáloch a v rôznych zložkách životného prostredia.

Ešte na začiatku 90. rokov 20. storočia bolo možné antimón považovať za málo študovaný analyt. Za ostatných 10 rokov však záujem o antimón (jeho stanovenie a špeciáciu) značne narástol, čo možno pripísať faktu, že bol zaradený do zoznamu medzi prioritné polutanty.

Pre stanovenie antimónu možno použiť rôzne analytické metódy, z ktorých k najpoužívanejším patria metódy atómovej spektrometrie. K najčastejšie využívaným patria atómové absorpčné spektrometre (AAS), či už v spojení s plameňovou atomizáciou (F-AAS), s elektrotermickou atomizáciou (ET-AAS) alebo s využitím techniky generovania hydridov a následnou atomizáciou hydridov najčastejšie v kremennej kvete, ktorá môže byť vyhrievaná plameňom alebo elektricky (HG-AAS), alebo atómové emisné spektrometre (AES) najčastejšie s indukčne viazanou plazmou (ICP-AES). K menej využívaným patria atómové fluorescenčné spektrometre (AFS), avšak aj túto

detekčnú techniku možno spoľahlivo použiť na stanovenie antimónu najčastejšie v spojení s technikou generovania hydridov (HG-AFS).

Doposiaľ bola väčšina štúdií venovaná stanoveniu celkových koncentrácií antimónu v rôznych biologických materiáloch a v rôznych zložkách životného prostredia (vody, pôdy, sedimenty a pod.) a špeciácii antimónu (predovšetkým vo vodách). Prehľad literatúry venovaný stanoveniu a špeciácii antimónu vo vzorkách životného prostredia technikami metódy AAS do roku 1998 bol publikovaný v časopise *Chemické listy*.⁴

Predložená práca spracováva literatúru publikovanú v období rokov 1998–2006 a je zameraná predovšetkým na špeciáciu antimónu vo vodách s využitím rôznych spojení separačných techník s technikami atómovej spektrometrie (AAS, AES, AFS). Kapitoly venované selektívnemu stanoveniu jednotlivých špecií antimónu sú rozdelené nasledovne: *a)* využitie selektívnej tvorby hydridov v spojení s technikami atómovej spektrometrie; *b)* využitie extrakčných techník na separáciu, špeciáciu a nakoncentrovanie jednotlivých špecií antimónu v spojení s technikami atómovej spektrometrie; *c)* využitie chromatografických techník (predovšetkým iónovo-výmennej vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (IE-HPLC) a plynovej chromatografie (GC)) v spojení s technikami atómovej spektrometrie.

2. Selektívna tvorba hydridov

Derivatizácia vzorky s využitím techniky generovania hydridov a následná detekcia analytu v plynnej fáze rôznymi technikami atómovej spektrometrie patrí pravdepodobne k najčastejšie využívaným pre stanovenie antimónu na stopových úrovniach. K hlavným výhodám techniky generovania hydridov patrí separácia analytu od matrice vzorky, čo znižuje riziko interferencií⁵; možnosť prepojenia s rôznymi detekčnými technikami⁶; možnosť nakoncentrovania analytu (využitie kolekcie tlakovej⁷, kolekcie vymrazením⁸, zachytenie hydridu v grafitovom atomizátore^{9–13}, zachytenie hydridu v externe vyhrievanej kremennej kvete¹⁴); a v neposlednom rade možnosť stanovenia jednotlivých špecií využitím selektívnej tvorby hydridu pri kontrolovanom pH.

V prírodných vodách sa nachádza predovšetkým anorganický Sb(V) a Sb(III). Z organických foriem antimónu boli vo vodách stanovené $\text{CH}_3\text{SbO}(\text{OH})_2$ [dihydroxy(oxo)metylantimón] a $(\text{CH}_3)_2\text{SbO}(\text{OH})$ [hydroxy(oxo)dimethylantimón] (cit.¹⁵). Keďže koncentrácie metylovaných druhov antimónu vo vodách predstavujú menej ako 10 % z celkového množstva¹⁰ a organické formy antimónu sú menej toxické ako anorganické soli, väčšina špeciácií štúdií je zameraná na stanovenie anorganického Sb(III) a Sb(V). V tomto prípade sú postupy špeciácie založené na stanovení celkového antimónu po predchádzajúcej redukcii (najčastejšie s využitím roztokov obsahujúcich jodid draselný^{16–19} alebo L-cystein^{20–22}) a selektívnom stanovení Sb(III), pričom Sb(V) je vypočítaný z rozdielu stanove-

ných koncentrácií^{23–27}. Tento postup špeciácie patrí k často využívaným napriek tomu, že zistenie koncentrácie Sb(V) v reálnej vzorke vody len z rozdielu stanovených koncentrácií (Sb(tot)-Sb(III)) môže predstavovať hlavný zdroj chýb pri uvedenom postupe špeciácie. Ďalšie riziko, ktoré môže prispievať k nesprávnym výsledkom, je nedokonalá redukcia Sb(V) na Sb(III) pri stanovení celkovej koncentrácie antimónu prítomného vo vzorke. Okrem uvedených chýb nemožno zanedbať ani fakt, že stanovenie Sb(III) vo vodách je často sprevádzané interferenciami spôsobenými Sb(V), ktoré začínajú byť významné pri pomere Sb(V)/Sb(III) 4:1. Vo väčšine prírodných vôd je tento pomer 100 a viac¹⁵. Na potlačenie tohto typu interferencií sa využívajú rôzne maskovacie činidlá. Z testovaných činidiel boli uspokojivé výsledky dosiahnuté pri použití 8-hydroxychinolínu, ktorý nenechal oxidáčny stav antimónu prítomného vo vzorke a kvantitatívne eliminoval emisný signál v AFS prislúchajúci Sb(V) pri selektívnom stanovení Sb(III) (cit.²⁸).

Pre generovanie prchavých hydridov patrí k najpoužívanejším redukcia s NaBH_4 , pričom hydrid vzniká v zmesi okysleného roztoku analytu s alkalickým roztokom NaBH_4 . Tvorba stibínu (SbH_3) z Sb(V) nie je dokonalá^{15,29} a prebieha v dvoch krokoch. Prvým je redukcia Sb(V) na Sb(III) a až následne dochádza k vytvoreniu SbH_3 . Keďže redox reakcia, ktorá zahŕňa prenos elektrónu, je pomerne pomalá a závislá od pH, je možné uvedené poznatky využiť na rozlíšenie spomínaných foriem antimónu. Ako už bolo uvedené, selektívna tvorba hydridu z Sb(III) pri kontrolovanom pH patrí k často používaným metódam pre špeciáciu anorganického Sb. Medzi prvými, ktorí využili tieto poznatky na špeciáciu antimónu patrili Andreae a spol.¹⁵, ktorí stanovili celkový Sb v silno kyslom prostredí a Sb(III) v prostredí pri takmer neutrálnom pH. Okrem neutrálneho prostredia, možno selektívne stanoviť Sb(III) pri pH 1,5–2 v prostredí kyseliny fosforečnej³⁰, pri pH ≥ 2 v prostredí kyseliny citrónovej^{8,31}, pri pH ≥ 4 v prostredí kyseliny vínnej³¹, pri pH 5 v prostredí octanového tlmivého roztoku³² alebo pri pH 8 v prostredí boritanového tlmivého roztoku³³. Mohammad a spol.³⁴ poukázali na to, že špeciácia v prostredí kyseliny citrónovej a kyseliny octovej nezávisí od pH (je to len sekundárny efekt), ale od formovania komplexu s Sb(V). Zoznam komplexotvorných činidiel, ktoré je možné použiť pri selektívnej tvorbe hydridu rozšírili de la Calle-Guntiñas a spol.³⁵ o ďalšie α -hydroxykyseliny.

Spojenie HG-ICP-AES pri špeciácii Sb(III) a Sb(V) s využitím L-cysteínu ako redukčného činidla opísali vo svojej práci Feng a spol.³⁶. Na rozlíšenie uvedených špecií antimónu využili kinetiku predredukcie Sb(V) na Sb(III), pričom stanovovali zredukované množstvo Sb(V) po 2 a 8 minútach od začiatku reakcie.

Existujú dva základné spôsoby generovania hydridov, a to priamy prenos, alebo kolekcia⁵. Pri priamom prenose, pri ktorom je hydrid uvoľnený z kvapalnej fázy a prúdom nosného plynu je vedený do atomizátora, môže ísť o usporiadanie kontinuálne prietokové (CF-HG-AAS), prietokové injekčné (FI-HG-AAS), sekvenčné injekčné (SI-HG-

AAS), alebo možno použiť zredukované obmedzeného objemu vzorky v dávkovom generátore (batch-HG-AAS). Spojenie výhod prietokovej injekčnej analýzy (FIA), akými sú finančná nenáročnosť, flexibilita rozmanitých usporiadaní a možnosť využitia on-line predúpravy vzorky s reprodukovateľnosťou, všestrannosťou a robustnosťou sekvenčnej injekčnej analýzy (SIA) možno nájsť v multi-injekčnom prietokovom usporiadaní (multisyringe flow injection analysis – MSFIA), ktoré bolo vyvinuté relatívne nedávno³⁷. To, že uvedené usporiadanie patrí v súčasnej dobe k progresívne sa rozvíjajúcemu, zdokumentovali Miró a spol.³⁸. Uvedené spojenie spolu s využitím techniky generovania hydridov a AFS detekciou (MSFIA-HG-AFS) pri stanovení a špeciácii Sb vo vodách využili Semenova a spol.¹⁸.

Priama špeciácia bez použitia nakoncentrovania sledovaného analytu je však v mnohých prípadoch nepostačujúca pre stanovenie ultrastopových koncentrácií antimónu v prírodných vodách. V takýchto prípadoch, kedy je pre špeciáciu využitá technika generovania hydridov, možno zlepšiť detekčné limity použitého usporiadania využitím kolekcie (tlakovej⁷ alebo vymrzením⁸), pri ktorej je hydrid zachytený v kolektore, ktorý je súčasťou generátora. Následné prevedenie hydridu do atomizátora prebehne v jednom kroku až po skončení jeho uvoľňovania z roztoku. Okrem uvedených postupov možno zlepšiť detekčné limity aj s využitím *in situ* zachytenia hydridov v elektrotermickom atomizátore (hovoríme o spojení HG-ET-AAS). V tomto prípade sú elektrotermické atomizátory (najčastejšie grafitové kyvety) využité pre zber hydridu aj pre jeho atomizáciu. V špeciálnej analýze antimónu, využili toto spojenie Cabon a Madec¹⁰. Pre zber hydridov použili grafitovú kyvetu pokrytú irídiom, pričom stanovenie Sb(III) bolo vykonané v prostredí tlmivého roztoku (0,2 mol l⁻¹ TRIS-HCl) a stanovenie celkového anorganického Sb po predchádzajúcej redukcii Sb(V) v prostredí 2 mol l⁻¹ HCl. Uvedený postup použili pre špeciáciu Sb v morskej vode. Spojenie HG-ET-AAS využili vo svojich prácach aj Niedzielski a Siepak^{11,12} pri stanovení a špeciácii nielen Sb, ale aj As a Se v povrchových vodách. V tomto prípade použili pre termickú stabilizáciu sledovaných analytov ako modifikátor roztok paládia. Selektívnu tvorbu hydridu z Sb(III) a jeho následnú detekciu technikou ET-AAS v grafitových kyvetách pokrytých paládiom opisali Ding a Sturgeon¹³. Uvedený postup použili pri špeciácii anorganického antimónu v morských aj riečnych vodách.

3. Extrakčné techniky

Z extrakčných techník boli pre separáciu, nakoncentrovanie, ale aj špeciáciu antimónu v minulosti najčastejšie využívané extrakcie v systéme kvapalina-kvapalina (LLE). V súčasnosti sú široko využívané extrakcie v systéme tuhá fáza-kvapalina (SPE) a k novšie využívaným technikám možno zaradiť extrakciu s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE).

3.1. Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (LLE)

Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (LLE) patrila v minulosti k často využívaným technikám pri špeciácii antimónu, predovšetkým z dôvodu jednoduchosti a cenovej nenáročnosti. K nevýhodám tejto techniky však patrila časová náročnosť, veľké objemy vzoriek, ktoré bolo potrebné pri extrakcii použiť a používanie organických činidiel.

Špeciácia antimónu s využitím LLE je založená na vytvorení komplexu Sb(V) alebo Sb(III) s vhodným komplexačným činidlom a následnej extrakcii do určitého organického činidla s detekciou vyextrahovaného antimónu. Jedným z prvých detektorov, ktoré boli využívané na detekciu antimónu a jeho rôznych špecií bol fotometrický detektor, avšak detekčné limity v tomto prípade boli na úrovni mg l⁻¹, čo bolo nepostačujúce pre stanovenie a špeciáciu antimónu v reálnych vzorkách životného prostredia. Postupne sa pre detekciu začali používať rôzne techniky atómovej spektrometrie, čo viedlo k zníženiu detekčných limitov a umožnilo stanovovať stopové koncentrácie jednotlivých špecií antimónu v reálnych vzorkách.

Zoznam rôznych komplexačných činidiel používaných pre Sb(V) a Sb(III) uviedla Smichowska a spol.⁶ v prehľadnom článku venovanom analytickým metódam pre špeciáciu antimónu vo vodách, v ktorom bola spracovaná literatúra venovaná tejto problematike do roku 1997. Od roku 1998 boli ako komplexačné činidlá pre Sb(III) využité: malachitová zeleň³⁹, *N-n*-oktylanilín⁴⁰, pyridín-2-acetaldehyd salicyloylhydrazón⁴¹ (PASH), *N*-benzoyl-*N*-fenyhydroxylamín⁴², 2-etylhexyl mono-2-etylhexyl ester kyseliny fosforečnej⁴³ (PC-88A), bis(2,4,4-trimetylpentyl) kyselina monotiofosforečná⁴⁴ (Cyanex-302), bis(2,4,4-trimetylpentyl)oktyl oxid fosforečný⁴⁵ (Cyanex-925). Pre selektívne stanovenie Sb(V) bol v poslednom období využitý komplex vytvorený s rodamínom B (cit.⁴⁶) alebo hexachlóroantimoničnanový komplex s kvartérnymi amóniovými iónmi⁴⁷. Aj vo všetkých týchto prípadoch nasledovala extrakcia vytvoreného komplexu do vhodného organického činidla a následná detekcia vyextrahovaného analytu.

Aj napriek tomu, že postupy využívajúce LLE sú schopné selektívne vyextrahovať Sb(III) alebo Sb(V), dosiahnuté prekoncentračné faktory (aj v spojení s technikami atómovej spektrometrie) nepostačujú na stanovenie požadovaných ultrastopových koncentrácií týchto špecií antimónu v neznečistených prírodných vodách. Tento nedostatok spolu s nevýhodami uvedenými na začiatku tejto kapitoly vedie k postupnému nahrádzaniu LLE inými druhmi extrakcie, ktoré sú opísané v nasledujúcich kapitolách.

3.2. Extrakcia v systéme tuhá fáza-kvapalina (SPE)

Extrakcia v systéme tuhá fáza-kvapalina (SPE) má nasledovné výhody v porovnaní s LLE: minimalizáciu

použitých činidiel; minimalizáciu času potrebného na extrakciu; s využitím vhodnej náplne (prípadne zmenou podmienok na tej istej náplni) možnosť nakoncentrovať rôzne špecie sledovaného analytu; cenovú nenáročnosť; dostupnosť a v neposlednom rade možnosť on-line spojenia s detekčnými technikami. Sorbent použitý v SPE môže byť umiestnený v kolóne, určitej trubičke alebo v disku. Mechanizmus retencie závisí od použitého sorbentu a môže ísť o jednoduchú adsorpciu, chelatáciu alebo o výmenu iónov. Výber použitých sorbentov a elučných činidiel je rôznorodý, pričom hlavným kritériom je výber vysoko selektívnych sorbentov a súčasne výber vysoko selektívnych elučných činidiel. Enzým fruktózu-6-fosfát kinázu imobilizovanú na skle s kontrolovanou veľkosťou pórov využili na separáciu a prekoncentráciu Sb(III) de la Calle-Guntiñas a spol.⁴⁸. Zachytený analyt následne eluovali roztokom 3 % (v/v) kyseliny mliečnej. Ako detekčnú techniku použili ET-AAS. Smichowska a spol.⁴⁹ využili selektívnu retenciu Sb(III) a Sb(V) na alumine pri kontrolovanom pH. Vplyv pH na retenciu obidvoch špecií študovali v piatich médiách: vo vode, kyseline citrónovej, kyseline vínnej, kyseline fosforečnej a kyseline chlorovodíkovej. Sb(III) a Sb(V) sa im podarilo kvantitatívne odseparovať v prostredí kyseliny fosforečnej, pričom pri pH 9,5 bol selektívne zadržaný Sb(III) a retencia Sb(V) na kolóne bola v tomto prípade zanedbateľná (menej ako 1 %). Pri pH 7,5 boli na kolóne zadržané obidve sledované špecie. Po následnej elúcii 4 mol l⁻¹ HCl bol analyt stanovovaný technikou ET-AAS. Selektívnu sorpciu Sb(III) a Sb(V) na Polyorgs 31 (obsahujúcom najmä amidoxím a aminové funkčné skupiny) využili Gabroš a spol.⁵⁰. Celkový anorganický Sb bol kvantitatívne zadržaný pri pH 2 a selektívne iba Sb(III) pri pH 10. Po zadržaní analytu na kolóne bola vytvorená suspenzia, ktorá bola priamo nadávkovaná do grafitového atomizátora. V ďalšej práci Gabroš a spol.⁵¹ využili tvorbu chelátu Sb(III) s amónium-pyrolidinditiokarbamátom (APDTC), ktorý následne selektívne zachytili na kolóne obsahujúcej C-16 naviazaný na silikagéli. Celkový anorganický Sb stanovili po redukcii s L-cysteínom. Nasorbovaný analyt eluovali etanolom priamo do grafitovej kyvety. Uvedený postup použili pre špeciáciu antimónu v pitnej vode, snehu, ale aj vo vzorkách moču. V ďalšej práci Gabroš a spol.⁵² využili selektívnu sorpciu Sb(III) na mikrokolóne obsahujúcej sorbent s naviazanými dietyléntriámínovými skupinami (DETA). Nasorbovaný Sb(III) eluovali HNO₃ priamo do F-AAS. Celkový antimón stanovili priamo technikou ET-AAS. Sb(V) vypočítali z rozdielu stanovených koncentrácií. Selektívnu retenciu chelátu Sb(III) s APDTC na kolóne obsahujúcej porézny styréndivinylbenzénový kopolymér (Chromosorb 102) využili vo svojej práci Saracoglu a spol.⁵³. Zachytený antimón bol v tomto prípade eluovaný acetónom. Celkový antimón stanovili po redukcii Sb(V) na Sb(III) s roztokom obsahujúcim KI v kyslom prostredí. V tomto prípade bol Sb(III) eluovaný 0,25 mol l⁻¹ HNO₃. Antimón prítomný v eluáte bol stanovený F-AAS. Okrem uvedených postupov použili pre stanovenie celkového Sb aj techniku ET-AAS. Opísané postupy použili pri špeciácii

antimónu v „naspájkovanej“ pitnej vode a odpadovej vode. Selektívnu sorpciu Sb(III) na mikrokolóne obsahujúcej 1,5-bis(di-2-pyridyl)metyléntiokarbohydrazid (DPTH) imobilizovaný na silikagéli využili Bosch-Ojeda a spol.⁵⁴. Sorbovaný antimón bol priamo eluovaný HNO₃ do grafitovej kyvety. Postup použili pre špeciáciu antimónu v prírodných vodách. Erdem a Eroglu⁵⁵ použili pre špeciáciu a prekoncentráciu anorganického antimónu mikrokolónu obsahujúcu –SH funkčné skupiny (Duolite GT-73). Použitá náplň bola selektívna pre Sb(III) takmer pri všetkých hodnotách pH, zatiaľ čo Sb(V) nebol vôbec zadržaný. Celkový antimón stanovili po redukcii Sb(V) na Sb(III) s L-cysteínom. Postup použili pre špeciáciu a prekoncentráciu antimónu v pitných fľaškových vodách. Detekčnou technikou v tomto prípade bola segmentovaná prietoková injekčná (SFI) HG-AAS.

Na záver tejto kapitoly treba zdôrazniť, že hlavnou výhodou SPE je možnosť on-line prepojenia s technikami atómovej spektrometrie. Vyriešeniu technických problémov pri takomto on-line spojení s využitím miniatúrnych separačných kolón sa v súčasnosti venuje značná pozornosť. SPE patrí k progresívne sa rozvíjajúcej predúpravnej technike aj kvôli cenovej nenáročnosti v porovnaní s inými separačnými technikami.

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

V posledných rokoch sa venuje pozornosť extrakcii, pri ktorej sa využívajú micelárne roztoky, ktoré vzniknú pridaním jedného alebo určitej zmesi neutrálnych tenzidov (neiónových alebo amfotérnych) do analyzovaného vodného roztoku (pričom analyt v analyzovanom roztoku je solubilizovaný použitým neiónovým tenzidom). Následne sa tento micelárny roztok zahrieva nad určitú teplotu (ktorá je charakteristická pre každý tenzid) a roztok sa stáva zakaleným v dôsledku preskupenia micelotvorných zložiek a vzniku ďalšej fázy. Po vzniku dvoch fáz a po určitej dobe, ktorá sa môže skrátiť centrifugáciou, sa získajú dve vodné fázy, jedna obohatená tenzidom (v ktorej sa nachádza skoncentrovaný analyt) a druhá obsahujúca koncentráciu tenzidu nižšiu ako je kritická koncentrácia vzniku micel. Hovoríme o extrakcii s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (cloud point extraction – CPE). Takýto postup extrakcie možno využiť na izoláciu, nakoncentrovanie, ale aj špeciáciu širokej škály analytov^{56–59}.

CPE využil pri špeciácii anorganického antimónu v morských a odpadových vodách Fan⁶⁰. Pre vytvorenie komplexu s Sb(III) použil *N*-benzoyl-*N*-fenyhydroxylamin (BPHA), ktorý sa po prekročení teploty potrebnej pre CPE dostal do tenzidom obohatenej fázy, zatiaľ čo Sb(V) zostal vo vodnej fáze. Koncentrácia Sb(III) v tenzidom obohatenej fáze bola následne stanovená F-AAS. Celkový Sb bol stanovený rovnakým postupom po predchádzajúcej redukcii Sb(V) na Sb(III) s L-cysteínom a Sb(V) bol vypočítaný z rozdielu stanovení. Vytvorenie komplexu Sb(III) s APDTC a následnú CPE pre selektívne stanovenie Sb(III) v rôznych typoch vôd, ale aj vo vzorkách moču použi-

li Li a spol.⁶¹. Pre stanovenie celkového Sb použili rovnako postup s predredukcíou Sb(V) na Sb(III) s roztokom obsahujúcim L-cysteín. Ako detekčnú techniku v tomto prípade použili ICP-AES, pričom využili prietokovo-injekčné usporiadanie spomínaného spojenia (FI-CPE-ICP-AES).

Aj napriek tomu, že CPE možno zaradiť k relatívne novým separačným technikám, bola už využitá na separáciu, prekoncentráciu, ale aj špeciáciu mnohých kovov⁵⁷. V prípade antimónu však boli doposiaľ publikované iba uvedené práce. Aj táto technika ponúka také výhody, ako sú cenová nenáročnosť, vysoká kapacita nakoncentrovať širokú škálu analytov z rôznych vzoriek životného prostredia, vysoká výťažnosť sledovaných analytov a dosiahnutie vysokých prekoncentračných faktorov, vyžaduje však vyriešenie technických problémov spojených s on-line prepojením s detekčnými technikami pre potreby špeciácie analýzy.

4. Chromatografické techniky

V minulosti boli chromatografické techniky využívané predovšetkým na odseparovanie jednotlivých zlúčenín antimónu od iných analytov. Identifikovať a kvantifikovať tieto zlúčeniny nebolo možné predovšetkým z dôvodu nedostupnosti vhodných štandardov^{62–64} (predovšetkým organických zlúčenín antimónu). Z metylovaných zlúčenín Sb(V) boli pri špeciálnych štúdiách použité $(\text{CH}_3)_3\text{SbCl}_2$, $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}(\text{OH})_2$ a $(\text{CH}_3)_3\text{SbO}$. Snaha syntetizovať rozpustné mono- a dimetylované zlúčeniny antimónu bola neúspešná jednak z dôvodu ich polymerizácie pri rozpúšťaní, alebo ich nebolo možné pripraviť ako monoméry, alebo neboli stabilné za normálnych podmienok⁶⁵. Ako bude uvedené v nasledujúcich kapitolách, z chromatografických techník, ktoré je možné pri špeciácii antimónu vo vodách úspešne využiť, patria k najpoužívanejším iónovo-výmenná vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (IE-HPLC) a plynová chromatografia (GC).

4.1. Iónovo-výmenná vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (IE-HPLC)

Z mnohých techník kvapalinovej chromatografie, patrí v špeciácii analýze antimónu k najvyužívanejším iónovo-výmenná chromatografia (IEC). V IEC je stacionárnou fázou vymieňač iónov, ktorým býva makromolekulárna matrica s naviazanými vhodnými funkčnými skupinami kyslej alebo zásaditej povahy, ktoré následne slúžia buď na výmenu kationov alebo na výmenu aniónov. Pri špeciácii antimónu vo vodách sú využívané predovšetkým anióno-výmenné kolóny. Jednou z najčastejšie používaných je anióno-výmenná kolóna PRP-X100 s polystyrén-divinylbenzénovou matricou a naviazanými kvartérnymi amóniovými skupinami. Medzi prvých, ktorí použili uvedenú kolónu na simultánnu separáciu anorganických foriem antimónu Sb(III) a Sb(V), patrili Smichowska a spol.⁶⁶. Ako mobilnú fázu použili kyselinu ftalovú. Na detekciu spomínaných anorganických foriem antimónu

použili HG-AAS. Dosiahnuté detekčné limity v uvedenom spojení HPLC-HG-AAS (tabuľka I) neumožňovali stanovenie spomínaných foriem antimónu v prírodných vodách, boli však vyhovujúce na stanovenie uvedených anorganických špecií antimónu v kontaminovaných vodách. Výrazné zlepšenie detekčných limitov bolo dosiahnuté v spojení uvedenej HPLC separácie s HG-ICP-MS detekciou (tabuľka I). Dosiahnuté detekčné limity umožnili monitorovať spomínané anorganické druhy antimónu aj na ultrastopových úrovniach v neznečistených prírodných vodách. Rovnakú kolónu využil aj Ulrich⁶⁴ na špeciáciu Sb(III), Sb(V), ale aj $(\text{CH}_3)_3\text{SbO}$. Ako elučné činidlá testoval: kyselinu ftalovú, 4-hydroxybenzoovú, benzoovú, citrónovú, salicylovú, askorbovú a vínnu. Najlepšie výsledky dosiahol pri použití kyseliny ftalovej a kyseliny 4-hydroxybenzoovej. Ako detekčnú techniku použil ICP-AES. Dve rôzne dlhé PRP-X100 kolóny v spojení s HG-AAS detekciou pre špeciáciu anorganického antimónu porovnali Satiroglu a spol.⁶⁷. Ako elučné činidlo použili 50 mmol l⁻¹ roztok citrátu pri pH 4,0. Retenčné časy boli: 2,0 min pre Sb(V) a 10,0 min pre Sb(III) v 250 mm dlhej kolóne a 1,4 min pre Sb(V) a 3,6 min pre Sb(III) v 100 mm dlhej kolóne. Uvedené spojenie využili pri špeciácii antimónu v odpadových bankských vodách. PRP X-100 kolónu na separáciu Sb(III), Sb(V), ale aj $(\text{CH}_3)_3\text{SbBr}_2$, avšak s použitím gradientovej elúcie medzi roztokmi hydroxidu draselného (20 mmol l⁻¹, pH 11) a vínanu amónneho (200 mmol l⁻¹, pH 5) a následnou HG-AFS detekciou využili Sayago a spol.⁶⁸. Retenčné časy boli: 0,98 min pre $(\text{CH}_3)_3\text{SbBr}_2$, 1,71 min pre Sb(V) a 5,03 min pre Sb(III). Dosiahnuté detekčné limity (tabuľka I) umožňovali monitorovať povrchové aj pitné vody. Miravet a spol.⁶⁹ využili rovnakú kolónu, rovnako v spojení s HG-AFS detekciou na separáciu Sb(III), Sb(V) a $(\text{CH}_3)_3\text{SbCl}_2$. Testovali rôzne mobilné fázy, pričom najlepšiu separačnú účinnosť zaznamenali rovnako ako predchádzajúci autori pri použití gradientovej elúcie medzi roztokom vínanu amónneho (250 mmol l⁻¹, pH 5,5) a hydroxidu draselného (20 mmol l⁻¹, pH 12). Opísaný postup využili pri špeciácii antimónu v riečnej vode. Optimalizáciu separačného postupu Sb(III), Sb(V) a $(\text{CH}_3)_3\text{SbCl}_2$ s rovnakým spojením (HPLC-HG-AFS) s využitím rovnakej kolóny opísali de Gregori a spol.⁷⁰. Aj v tomto prípade využili gradientovú elúciu, avšak s roztokmi obsahujúcimi 20 mmol l⁻¹ EDTA + 2 mmol l⁻¹ hydrogénftalát draselný (pH 4,5) a 50 mmol l⁻¹ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (pH 8,3). Retenčné časy boli: 1,22 min pre Sb(V), 2,31 min pre Sb(III) a 3,45 min pre $(\text{CH}_3)_3\text{SbCl}_2$. Uvedený postup použili pri špeciácii antimónu v morskej vode. Miniaturizovanú anióno-výmennú kolónu Supelcosil LC-SAX1 obsahujúcu silikagél s naviazanými propyltrimetylamóniovými ligandami spojenú s HG-AAS detekciou využili Zhang a spol.⁷¹ na špeciáciu Sb(III) a Sb(V) v „naspájkovaných“ vodách. Ako elučné činidlo použili 50 mmol l⁻¹ roztok vínanu pri pH 5,5. Retenčný čas pre Sb(V) bol 0,5 min a pre Sb(III) 2,8 min. Rovnakú kolónu, avšak v spojení s HG-AFS detekciou použili aj Sayago

Tabuľka I

Porovnanie dosahovaných detekčných limitov pri stanovení a špeciácii antimónu vo vodách s využitím rôznych spojení separačnej techniky s metódami atómovej spektrometrie

Použitá metóda	Detekčný limit [$\mu\text{g l}^{-1}$]			Lit.
	Sb(tot)	Sb(III)	Sb(V)	
CF-HG-AAS	0,04			27
FI-HG-AAS	0,05			20
HG-ET-AAS	10,0	5,00		10
HG-ICP-AES		1,20	4,50	36
SPE-Slurry-ET-AAS		0,03	0,03	50
FI-SPE-F-AAS		0,90		52
FI-SPE-ET-AAS		0,007		51
FI-SPE-ET-AAS		0,30		54
SPE-SFI-HG-AAS		0,06		55
CPE-F-AAS	2,08	1,82		60
FI-CPE-ETV-ICP-AES		0,09		61
HPLC-HG-AAS		50,0	6,00	66
HPLC-ICP-MS		7,50	0,90	66
HPLC-HG-ICP-MS		0,40	0,08	66
HPLC-ICP-AES		3,00	0,50	64
HPLC-HG-AAS		2,00	1,00	71
HPLC-HG-AFS		1,90	0,80	72
HPLC-HG-AAS		0,80	1,00	67
HPLC-HG-AFS		0,26	0,09	68
HPLC-HG-AFS		0,04	0,06	69
HPLC-HG-AFS		0,07	0,13	70

Pozn.: skratky - vid'. text

a spol.⁷² na špeciáciu Sb(III) a Sb(V). Ako elučné činidlo použili 60 mmol l^{-1} roztok vínanu amónneho pri pH 6,9. Retenčný čas pre Sb(V) bol porovnateľný s dosiahnutým retenčným časom v predchádzajúcej práci (0,45 min), avšak retenčný čas pre Sb(III) bol o niečo horší (3,5 min). Dosiahnuté detekčné limity v tomto spojení (HPLC-HG-AFS) boli taktiež porovnateľné s dosiahnutými detekčnými limitmi v spojení HPLC-HG-AAS (tabuľka I).

Doposiaľ opísané postupy špeciácie umožňovali stanoviť Sb(III) a následne stanoviť celkový anorganický antimón väčšinou po redukcii Sb(V) s vhodným redukčným činidlom. Koncentrácia Sb(V) tak bola počítaná z rozdielu uvedených stanovení. Ako už bolo uvedené v kapitole 2, tento postup špeciácie môže predstavovať hlavný zdroj chýb v špeciálnej analýze antimónu, preto treba v tejto časti zdôrazniť, že spojenie HPLC s atómovými spektrometrickými detektormi (aj napriek vyššej cenovej náročnosti), umožňuje simultánnu separáciu a stanovenie nielen Sb(III), Sb(V), ale aj tri-metylovaného Sb(V) v jednom kroku, čím sa významne eliminuje spomínaný zdroj chýb.

4.2. Plynová chromatografia (GC)

Kovy a organokovové zlúčeniny môžu byť stanovené využitím spojenia plynovej chromatografie (GC) s citlivými detektormi po predchádzajúcej derivatizácii, pri ktorej dochádza k transformácii polárnych neprchavých zlúčenín na ich nepolárne prchavé deriváty, ktoré je možné využiť pri analýze GC. V minulosti boli k tomuto účelu využívané Grignardove činidlá po vytvorení komplexu stanovovaného kovu alebo organokovovej zlúčeniny s tropolónom alebo s dietylditiokarbamátom sodným. V poslednom období sa ako derivatizačné činidlo začal využívať NaBH_4 (cit.⁷³).

Postup pre selektívne stanovenie Sb(III) v prítomnosti Sb(V) s využitím spojenia HG-GC-AAS opísali de la Calle-Guntiñas a Adams⁷³. Prvým krokom v tomto prípade bolo vytvorenie komplexu Sb(III) s APDTC v prostredí octanového tlmivého roztoku (pH 4,5), ktorý bol extrahovaný do hexánu. Následne bol vyextrahovaný Sb(III) prevedený na prchavý trifenylstibín Grignardovou reakciou s fenylnagnéziom bromidom a použitý na GC separáciu.

Tento postup využili pri stanovení Sb(III) v „naspájkovanej“ pitnej vode. Rovnaké spojenie HG-GC-AAS využili Dodd a spol.⁷⁴ na stanovenie $\text{CH}_3\text{Sb}(\text{O})(\text{OH})_2$ a $(\text{CH}_3)_2\text{Sb}(\text{O})\text{OH}$ v morských aj sladkých vodách. S využitím rovnakého spojenia, Koch a spol.⁷⁵ stanovili v povrchových vodách, ale aj v extraktoch rôznych vzoriek životného prostredia hlavne Sb(III) a Sb(V) a iba v malom počte vzoriek boli stanovené aj metylované druhy antimónu. Využitie spojenia HG-GC-ICP-MS napomohlo k identifikácii a kvantifikácii troch metylovaných zlúčenín antimónu (CH_3SbH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{SbH}$ a $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$) v geomálnych vodách⁷⁶.

On-line spojenie GC a ET-AAS na stanovenie prchavých metylovaných zlúčenín antimónu, ktoré vznikali za aeróbnych podmienok pri kultivovaní húb *Scopulariopsis brevicaulis* vo vodných roztokoch obsahujúcich anorganické soli antimónu opísali vo svojej práci Craig a spol.⁷⁷. Prchavé zlúčeniny antimónu zachytené v Tenax-TA (porózny polymérny reťazec zložený s 2,6-difenylen oxidu) boli termálne desorbované a následne oddelené na chromatografickej kolóne umiestnenej v kvapalnom dusíku. Po odstránení kvapalného dusíka bola kolóna elektrotermicky zahriata a prchavé zlúčeniny antimónu boli eluované v závislosti od ich narastajúcich teplôt varu a stanovené ET-AAS. Štruktúrne informácie o prchavých zlúčeninách antimónu získali pri využití spojenia GC-MS. Ako bolo zdokumentované^{78,79}, jedine $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$ bol produkovaný už spomenutými kultúrami húb, v princípe však, SbH_3 , CH_3SbH_2 aj $(\text{CH}_3)_2\text{SbH}$ môžu byť rovnako dobre stanovené s využitím uvedeného spojenia. Tie isté kultúry húb *S. brevicaulis* využili vo svojich prácach Andrewes a spol.^{80–82} pri štúdiu vzniku metylovaných zlúčenín antimónu z roztoku, ktorý obsahoval soli Sb(III). Spojenie HG-GC využili spolu s AAS ako aj s ICP-MS detekciou. Okrem uvedenej štúdie využili tieto spojenia aj pri sledovaní demetylácie $(\text{CH}_3)_3\text{SbCl}_2$, ktorá podľa autorov závisí v hlavnej miere od pH a doprevádzajúcej matrice.

Nevýhody a určité problémy pri využití GC a derivatizácie s NaBH_4 na špeciáciu prchavých zlúčenín Sb(III) súvisia s tým, že identifikácia a kvantifikácia prchavých hydridov je založená na porovnaní retenčných časov a plôch píkov s píkmí metylovaných štandardov antimónu, ktoré vzniknú reakciou CH_3SbCl_2 alebo CH_3SbO s NaBH_4 (cit.⁷⁹). V tomto prípade sú však pozorované rôzne molekulové preskupenia, ktoré vznikajú v dôsledku demetylácie trimetylovaných zlúčenín antimónu počas analýzy. Takáto demetylácia vedie k vzniku SbH_3 , CH_3SbH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{SbH}$ a $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$. Následne spoľahlivá identifikácia za určitých experimentálnych podmienok s využitím AAS detekcie môže predstavovať problém, ktorý je v literatúre často diskutovaný, avšak doteraz nie je jednoznačne vyriešený^{82,83}. Z toho dôvodu sa často využíva ako detektor MS, prípadne ICP-MS, ktoré poskytnú molekulové informácie o sledovaných prchavých zlúčeninách antimónu. Takéto riešenia však vedú k značnému predraženiu analýz, čo sa stáva hlavným kritériom, ktoré diskriminuje využitie už spomenutých spojení v bežných prevádzkových laboratóriách.

5. Záver

V špeciálnej analýze ostáva výzvou riešenie nasledovných problémov: 1) zachovanie integrity stanovovanej špecie počas celého analytického procesu, 2) stanovenie extrémne nízkych koncentrácií jednotlivých špecií a 3) špeciácia v komplexných reálnych maticiach. Aj napriek enormnému záujmu venovanému tejto oblasti analytickej chémie, ostávajú problémy spojené s odberom vzorky, jej uskladnením a predúpravou pred samotnou analýzou v mnohých prípadoch nevyriešené, alebo im nie je venovaná dostatočná pozornosť⁸⁴, čo môže viesť k hlavným a závažným chybám, ktoré už nemožno ďalším analytickým postupom odstrániť a ktoré sa prejavujú chybnou interpretáciou výsledkov⁸⁵.

Špeciálna analýza antimónu predstavuje komplikovanú analytickú úlohu, pretože už aj pri bežne stanovovaných anorganických špeciách antimónu vo vodách môže dochádzať k rýchlej oxidácii Sb(III) na Sb(V) za niekoľko hodín po odbere⁸⁶. Preto je potrebné zabezpečiť a overiť, či je Sb(V) naozaj hlavná špecie prítomná v analyzovaných vzorkách, alebo je to len dôsledok rýchlej oxidácie a nedôslednej stabilizácie vzoriek prídavkami vhodných činidiel, ktoré nesmú ovplyvňovať pôvodné zloženie vzorky.

K vyriešeniu problému spoľahlivého stanovenia extrémne nízkych koncentrácií stanovovaných špecií napomáha spojenie vysoko selektívnych separačných techník s vysoko citlivými detekčnými technikami. Je však potrebné spomenúť nedostatok, resp. absenciu certifikovaných referenčných materiálov pre jednotlivé špecie (v prípade antimónu ide predovšetkým o nedostatok vhodných organických zlúčenín), ktoré sú potrebné pre identifikáciu neznámych píkov pri využití HPLC alebo GC separácie, a tiež k validovaniu nových analytických postupov a metód.

Napriek súčasným poznatkom o negatívnych účinkoch antimónu a jeho zlúčenín na živé organizmy, doposiaľ sú uzákonené maximálne hraničné koncentrácie iba pre celkový antimón v pitných vodách (Americkou agentúrou pre ochranu životného prostredia⁸⁷ je to $6 \mu\text{g l}^{-1}$ a Radou Európskeho spoločenstva Európskej únie⁸⁸ je to $5 \mu\text{g l}^{-1}$). Stále nové štúdie dokazujúce rozdielnu mieru toxických účinkov jednotlivých zlúčenín antimónu však budú viesť k snahám uzákoniť limitné koncentrácie pre rozdielne formy tohoto analytu. Aj v takomto prípade pre stanovenie jednotlivých špecií antimónu bude nevyhnutné používanie validovaných postupov. Aj napriek tomu, že v tejto oblasti analytickej chémie boli získané mnohé nové poznatky a významné výsledky, ešte stále ostávajú niektoré problémy nevyriešené a mnohé otázky nezodpovedané.

Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA č. 1/4464/07 a VEGA č. 1/3561/06 a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. LPP-0038-06 a LPP-0188-06.

LITERATÚRA

1. Filella M., Belzile N., Chen Y. W.: *Earth Sci. Rev.* 57, 125 (2002).
2. Flower B. A., Goering P. L.: *Antimony*, v Merian E. (ed.): *Metals and Their Compounds in the Environment*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991.
3. Krachler M., Emons H., Zheng J.: *TRAC-Trends Anal. Chem.* 20, 79 (2001).
4. Farkašová I., Zavadská M., Žemberyová M.: *Chem. Listy* 93, 173 (1999).
5. Dědina J., Tsalev D. L.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. J. Wiley, Chichester 1995.
6. Smichowski P., Madrid Y., Cámara C.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 360, 623 (1998).
7. Zhang B. G., Wang Y., Wang X. S., Chen X. L., Feng J. X.: *Talanta* 42, 1095 (1995).
8. Apte S. C., Howard A. G.: *J. Anal. At. Spectrom.* 1, 221 (1986).
9. Dědina J.: *Prog. Anal. Spectrosc.* 11, 251 (1988).
10. Cabon J. Y., Madec C. L.: *Anal. Chim. Acta* 504, 209 (2004).
11. Niedzielski P., Siepak M.: *Chem. Ecol.* 21, 241 (2005).
12. Niedzielski P., Siepak M.: *Anal. Lett.* 36, 971 (2003).
13. Ding W. W., Sturgeon R. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 225 (1996).
14. Kratzer J., Dědina J.: *Spectrochim. Acta, B* 60, 859 (2005).
15. Andrae M. O., Asmode J. F., Foster P., Van't dack L.: *Anal. Chem.* 53, 1766 (1981).
16. Schramel P., Xu L. Q.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 340, 41 (1991).
17. Fuentes E., Pinochet H., De Gregori I., Potin-Gautier M.: *Spectrochim. Acta, B* 58, 1279 (2003).
18. Semenova N. V., Lealb L. O., Fortezab R., Cerdà V.: *Anal. Chim. Acta* 530, 113 (2005).
19. Risnes A., Lund W.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 943 (1996).
20. Welz B., Sucmanová M.: *Analyst* 118, 1417 (1993).
21. Welz B., Sucmanova M.: *Analyst* 118, 1425 (1993).
22. Chen H. W., Brindle I. D., Zheng S. G.: *Analyst* 117, 1603 (1992).
23. Niedzielski P., Siepak J., Kowalczyk Z.: *Pol. J. Environ. Stud.* 8, 183 (1999).
24. Niedzielski P., Siepak J.: *Chem. Environ. Res.* 10, 117 (2001).
25. Niedzielski P., Siepak M., Siepak J., Przybyłek J.: *Pol. J. Environ. Stud.* 11, 219 (2002).
26. Niedzielski P., Siepak M., Grabowski K.: *Pol. J. Environ. Stud.* 12, 213 (2003).
27. Niedzielski P.: *Environ. Monit. Assess.* 118, 231 (2006).
28. Deng T. L., Chen Y. W., Belzile N.: *Anal. Chim. Acta* 432, 293 (2001).
29. Sturgeon R. E., Willie S. N., Berman S. S.: *Anal. Chem.* 57, 2311 (1985).
30. de la Calle-Guntiñas, Madrid Y., Cámara C.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 343, 597 (1992).
31. Yamamoto M., Uraka K., Murashige K., Yamamoto Y.: *Spectrochim. Acta, B* 36, 61 (1981).
32. Campbell A. T., Howard A. G.: *Anal. Proc.* 26, 32 (1989).
33. Yamamoto M., Uraka K., Murashige K., Yamamoto Y.: *Anal. Lett.* 14, 21 (1981).
34. Mohammad B., Ure A. M., Reglinski R., Littlejohn D.: *Chem. Speciation Bioavailability* 3, 117 (1990).
35. de la Calle-Guntiñas M. B., Torralba R., Madrid Y., Palacios M. A., Bonilla M., Cámara C.: *Spectrochim. Acta, B* 47, 1165 (1992).
36. Feng Y. L., Narasaki H., Chen H. Y., Tian L. C.: *Anal. Chim. Acta* 386, 297 (1999).
37. Cerdà V., Estela J. M., Forteza R., Cladera A., Becerra E., Altimira P., Sitjar P.: *Talanta* 50, 695 (1999).
38. Miró M., Estela J. M., Cerdà V.: *TRAC-Trends Anal. Chem.* 21, 199 (2002).
39. Shanbhag B. S., Turel Z. R.: *J. Radioanal. Nuclear Chem.* 254, 365 (2002).
40. Sargar B. M., Rajmane M. M., Anuse M. A.: *J. Serbian Chem. Soc.* 69, 283 (2004).
41. Patil S. S., Sawant A. D.: *Indian J. Chem., A* 37, 1038 (1998).
42. Garboś S., Bulska E., Hulanicki A., Fijalek Z., Soltys K.: *Spectrochim. Acta, B* 55, 795 (2000).
43. Bandekar S. V., Dhadke P. M.: *Indian J. Chem., A* 39, 548 (2000).
44. Sarkar S. G., Dhadke P. M.: *Sep. Purif. Technol.* 15, 131 (1999).
45. Iyer J. N., Dhadke P. M.: *Indian J. Chem. Technol.* 10, 665 (2003).
46. Trivelin L. A., Rohwedder J. J. R., Rath S.: *Talanta* 68, 1536 (2006).
47. Yamamoto K., Shimakawa T.: *Anal. Sci.* 16, 641 (2000).
48. de la Calle-Guntiñas M. B., Madrid Y., Cámara C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 745 (1993).
49. Smichowski P., de la Calle M. B., Madrid Y., Cobo M. G., Cámara C.: *Spectrochim. Acta, B* 49, 1049 (1994).
50. Gabroś S., Bulska E., Hulanicki A., Shcherbinina N. I., Sedykh E. M.: *Anal. Chim. Acta* 342, 167 (1997).
51. Garboś S., Rzepecka M., Bulska E., Hulanicki A.: *Spectrochim. Acta, B* 54, 873 (1999).
52. Garboś S., Bulska E., Hulanicki A.: *At. Spectrosc.* 21, 128 (2000).
53. Saracoglu S., Soylak M., Dogan M., Elci L.: *Anal. Sci.* 19, 259 (2003).
54. Bosch-Ojeda C., Rojas F. S., Pavon J. M. C., Martín L. T.: *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 513 (2005).
55. Erdem A., Eroglu A. E.: *Talanta* 68, 86 (2005).
56. Halko R., Hutta M.: *Chem. Listy* 94, 990 (2000).
57. Silva M. F., Cerutti E. S., Martinez L. D.: *Microchim. Acta* 155, 349 (2006).
58. Bezerra M. D., Arruda M. A. Z., Ferreira S. L. C.: *Appl. Spectrosc. Rev.* 40, 26 (2005).
59. Stalikas C. D.: *TRAC-Trends Anal. Chem.* 21, 343

- (2002).
60. Fan Z. F.: *Microchim. Acta* 152, 29 (2005).
 61. Li Y. J., Hu B., Jiang Z. C.: *Anal. Chim. Acta* 576, 207 (2006).
 62. Zheng J., Ohata M., Furuta N.: *Analyst* 125, 1025 (2000).
 63. Zheng J., Ohata M., Furuta N.: *Anal. Sci.* 16, 75 (2000).
 64. Ulrich N.: *Anal. Chim. Acta* 359, 245 (1998).
 65. Krachler M., Emons H., Zheng J.: *Trends Anal. Chem.* 20, 79 (2001).
 66. Smichowski P., Madrid Y., de la Calle-Gutiñas M. B., Cámara C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 10, 815 (1995).
 67. Satiroglu N., Bektas S., Genc O., Hazer H.: *Turkish J. Chem.* 24, 371 (2000).
 68. Sayago A., Beltran R., Recamales M. A. F., Gomez-Ariza J. L.: *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 1400 (2002).
 69. Miravet R., Lopez-Sanchez J. F., Rubio R.: *J. Chromatogr., A* 1052, 121 (2004).
 70. De Gregori I., Quiroz W., Pinochet H.: *J. Chromatogr., A* 1091, 94 (2005).
 71. Zhang X. R., Cornelis R., Mees L.: *J. Anal. At. Spectrom.* 13, 205 (1998).
 72. Sayago A., Beltran R., Gomez-Ariza J. L.: *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 423 (2000).
 73. de la Calle-Gutiñas M. B., Adams F. C.: *J. Chromatogr., A* 764, 169 (1997).
 74. Dodd M., Grundy S. L., Reimer K. J., Cullen W. R.: *Appl. Organomet. Chem.* 6, 207 (1992).
 75. Koch I., Wang L. X., Feldmann J., Andrewes P., Reimer K. J., Cullen W. R.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 77, 111 (2000).
 76. Hirner A. V., Feldmann J., Krupp E., Grümping R., Goguel R., Cullen W. R.: *Org. Geochem.* 29, 1765 (1998).
 77. Craig P. J., Jenkins R. O., Dewick R., Miller D. P.: *Sci. Tot. Environ.* 229, 83 (1999).
 78. Jenkins R. O., Craig P. J., Miller D. P., Stoop L. C. A. M., Ostah N., Morris T. A.: *Appl. Organomet. Chem.* 12, 449 (1998).
 79. Jenkins R. O., Craig P. J., Goessler W., Miller D. P., Ostah N., Irgolic K. J.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 882 (1998).
 80. Andrewes P., Cullen W. R., Feldman J., Koch I., Polishchuk E.: *Appl. Organomet. Chem.* 13, 681 (1999).
 81. Andrewes P., Cullen W. R., Feldman J., Koch I., Polishchuk E., Reimer K. J.: *Appl. Organomet. Chem.* 12, 827 (1998).
 82. Koch I., Feldman J., Lintschinger J., Serves S. V., Cullen W. R., Reimer K. J.: *Appl. Organomet. Chem.* 12, 129 (1998).
 83. Dodd M., Pergantis S. A., Cullen W. R., Li H., Eigendorfer G. K., Reimer K. J.: *Analyst* 121, 223 (1996).
 84. Francesconi K. A., Kuehnelt D.: *Analyst* 129, 373 (2004).
 85. Burguera M., Burguera J. L.: *Talanta* 44, 1581 (1997).
 86. Krachler M., Emons H.: *Anal. Chim. Acta* 429, 125 (2001).
 87. United States Environmental Protection Agency: *National Primary Drinking Water Standards*. USEPA Office of Water, Washington, DC, USA, Doc. 810-F-94-001, 1999.
 88. Council of the European Union: *Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the Quality of Water Intended for Human Consumption*. Official Journal L 330, 05/12/1998, pp. 32–54, 1998.

I. Hagarová and J. Kubová (*Geological Institute, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Speciation of Antimony in Waters Using Separation Coupled with Atomic Spectrometry**

The interest in the determination of different Sb species in natural waters is due to the fact that their toxicological and physiological behavior strongly depends on their chemical forms and oxidation states. The purpose of this article is to review and evaluate methods for Sb speciation in waters based on selective hydride generation of Sb (III) and on coupling of different separation techniques (liquid-liquid extraction, solid phase extraction, cloud point extraction, ion-exchange HPLC and GC) with atomic spectrometric methods (AAS, atomic emission spectrometry and atomic fluorescence spectrometry). This review covers the literature published over the period 1998–2006.

HISTORIE OBJEVU FERROCENU

PETR ŠTĚPNIČKA*

Univerzita Karlova v Praze, Fakulta přírodovědecká, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
stepnic@natur.cuni.cz

Došlo 22.10.07, přijato 7.2.08.

Klíčová slova: ferrocen; cyklopentadienylové komplexy; historie

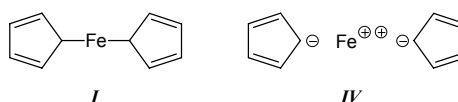
Od objevu ferrocenu v roce 2007 uplynulo půlkulatých pětadesát let. Za tu dobu ferrocen resp. jeho deriváty zdomácněly v mnoha oblastech chemie a staly se známými široké chemické veřejnosti. Za připomenutí stojí však i raná historie ferrocenu. Je totiž poučným příkladem badatelského entuziasmu, invence a soutěživosti, připravenosti vypořádat se s novými a nečekanými jevy, ale také přehlídkou promarněných příležitostí¹.

Ferrocen byl objeven náhodou a navíc nezávisle dvěma badatelskými týmy. Prvenství lze připisat Samuelu A. Millerovi, Johnovi A. Tebbothovi a Johnovi F. Tremainovi z firmy British Oxygen Company Ltd., kteří se zabývali vývojem katalyzátorů pro výrobu amoniaku a pokoušeli se na nich připravovat organické aminy přímou reakcí dusíku s uhlovodíky. Při jednom svém experimentu vedli směs par cyklopentadienu a dusíku přes vyhříváný heterogenní katalyzátor obsahující železo a případně také molybden. Katalyzátor připravili srážením roztoku dusičnanu železitého a hlinitého (případně molybdenanu amonného) roztokem hydroxidu draselného. Vzniklou sraženinu oddělili, vysušili, kalcinovali a nakonec deponované oxidy redukovali na kovy vodíkem při 450 °C. Místo žádaných aminů však s takto připraveným katalyzátorem získali oranžovou krystalickou látku se složením C₁₀H₁₀Fe.

Při dalším studiu uvedení autoři zjistili, že vzniklá látka taje bez rozkladu při 172,5–173 °C, ochotně sublimuje a těžká s parami rozpouštědel; že se rozpouští v organických rozpouštědlech, ale nikoli ve vodě. S roztokem bromu dávala nově připravená sloučenina zelenou sraženinu, ve styku s kyselinou sírovou uhelnatěla a odbarvovala roztok manganistanu draselného.

Miller, Tebboth a Tremaine si zcela určitě uvědomili zásadní novost svého objevu. Byl však pro ně jen badatelskou epizodou bez dalšího pokračování, jelikož se významně odchyloval od jejich výzkumných cílů. Pro novou látku navrhli jednoduchou lineární strukturu I, ve které se dva

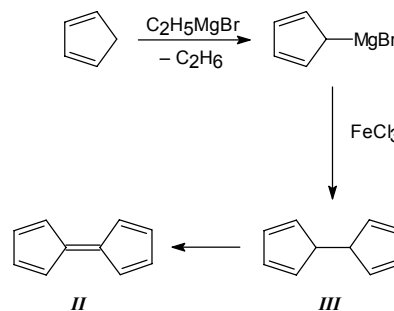
jednovazné cyklopentadienylové zbytky váží na atom železa. Svá pozorování shrnuli poměrně krátkým článkem v *J. Chem. Soc.* nazvaném lakonicky „Dicyclopentadienyliiron“. Redakce jejich rukopis obdržela 11. července 1951; tiskem článek vyšel až 24. března roku 1952 (cit.²). Později uvedení autoři tvrdili, že novou sloučeninu připravili již kolem roku 1948 (a firemní zprávy to údajně dokládají).



Obr. 1. Původně navržené struktury ferrocenu

Nezávisle objevili a přibližně ve stejné době publikovali přípravu stejné látky také Peter L. Pauson a Thomas J. Kealy. Pauson vystudoval chemii na univerzitě v Glasgow a doktorát získal ve Sheffieldu pod vedením R. D. Hawortha za práci na tropolonových derivátech, které v té době přitahovaly pozornost jako potenciální nebenzenové aromatické látky. Po ukončení svého studia našel zaměstnání na inzerát jako asistent na Duquesne University v USA. Jeho zájem o nebenzenové aromatické látky jej zavedl až ke snaze připravit fulvalen II. Fulvalen chtěl získat postupem používaným k přípravě biarylů z Grignardových sloučenin, přesněji spojovací reakcí cyklopentadienylmagnesiumbromidu (C₅H₅MgBr) v přítomnosti halogenidů přechodných kovů. Projekt přidělil studentu magisterského studia Kealymu.

Jako kovovou komponentu pro reakci zvolili Pauson a Kealy chlorid železitý, jenž se jim jevil výhodnějším, neboť je dostupný v bezvodé formě a rozpouští se



Obr. 2. Zamýšlená příprava fulvalenu z cyklopentadienu

* Autor je nositelem Ceny Alfreda Badera za organickou chemii za rok 2006.

v diethyletheru. Doufali také, že oxidační vlastnosti Fe^{III} by mohly vést k přímé dehydrogenaci přechodně vzniklého dihydrofulvalenu *III* a tak umožnit přípravu fulvalenu *II* v jednom kroku (obr. 2). V červnu 1951 tedy připravili $\text{C}_5\text{H}_5\text{MgBr}$ reakcí ethylmagnesiumbromidu ($\text{C}_2\text{H}_5\text{MgBr}$) s cyklopentadienem a následně přidali FeCl_3 . Namísto fulvalenu však po obvyklém (vodném) zpracování reakční směsi získali oranžovou krystalickou látku, kterou zevrubně charakterizovali.

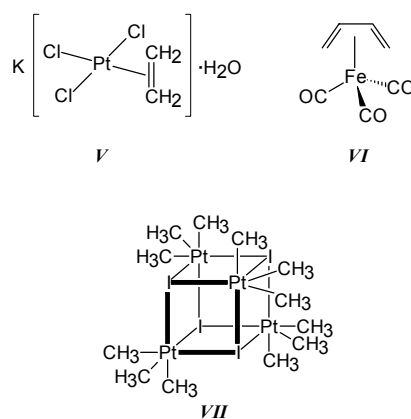
Na základě elementární analýzy a kryoskopických měření sloučeninu správně formulovali vzorcem $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$. I oni si všimli, že nová látka snadno sublimuje, taje bez rozkladu při 173–174 °C a ochotně se rozpouští v organických rozpouštědlech. Zarazila je i její neobvyklá stabilita: látka odolávala působení vody, 10% vodného hydroxidu sodného a koncentrovaného roztoku HCl . Změny pozorovali až při působení zředěné kyseliny dusičné a koncentrované kyseliny sírové.

Pauson jasně postřehl unikátnost svého objevu a získané výsledky shrnul krátkým sdělením do časopisu *Nature* nazvaném „A New Type of Organo-Iron Compound“. Ve svém příspěvku pro novou látku navrhli dvě alternativní struktury (*I* a *IV* v obr. 1) a její neočekávaně vysokou stálost („remarkable stability ... in sharp contrast to the failures of earlier workers to prepare similar compounds“) přisoudili rezonanční stabilizaci forem *I* a *IV*.

Díky odlišnému charakteru a rychlosti redakční práce spatřil Kealyho a Pausonův článek v *Nature* světlo světa dříve než článek Millera a spol. zmiňovaný výše (přijato redakcí 7. srpna 1951, otištěno 15. prosince 1951)³. Pauson obratem předal krystalický vzorek ferrocenu také krystalografovi Johnu M. Robertsonovi, průkopníkovi rentgenostrukturních metod působícímu na glasgowské univerzitě. Ten se mu však včas nevěnoval.

Obě původní sdělení působila na mnohé jako blesk z čistého nebe. Chemie organoprvkových sloučenin se v té době teprve rozvíjela a zvolna se vynořovala z období nahodilých objevů. Měla sice za sebou objev organoarsenitých sloučenin (Louis-Claude Cadet de Gassicourt zhruba v roce 1757, následně zpracováno Robertem W. Bunsem)⁴ a zvládla již i přípravu sloučenin organozinečnatých (Edward Frankland v roce 1848)⁵ a organohořečnatých (Victor Grignard kolem roku 1900)⁶, které otevřely cestu k syntéze celé řady dalších sloučenin. Známé byly i některé „organické deriváty“ přechodných kovů. Dánský lékárník William C. Zeisse popsal po něm později nazvanou sůl, $\text{K}[\text{PtCl}_3(\eta^2\text{-C}_2\text{H}_4)]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (*V*) již kolem roku 1825 (sic!); její struktura však zůstávala tajemstvím⁷. V roce 1930 Hans Reihlen publikoval přípravu prvního karbonylového komplexu s π -koordinovaným dienem, $[\text{Fe}(\text{CO})_3(\eta^4\text{-C}_4\text{H}_6)]$ (*VI*) (cit.⁸), zatímco Němec Franz Hein v té době houževnatě leč stále marně zápolil s charakterizací organochromitých produktů vznikajících při reakcích chloridu chromitého s fenylmagnesiumbromidem⁹.

Dlouho objeven byl také platičitý heterokuban *VII*, který je dnes považován za první definovanou sloučeninu se σ -vazbou kov-uhlík (Pozn. komplex *VII* byl

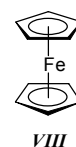


Obr. 3. Struktury některých organokovů známých v době objevu ferrocenu

v době objevu ferrocenu stále formulován jako monomer $(\text{CH}_3)_3\text{PtI}$ (cit.¹⁰). Navíc je třeba si uvědomit, že rentgenostrukturní analýza byla v plenkách a mnohé dnes hojně používané spektrální metody, včetně NMR, teprve čekaly na svá objevení nebo alespoň zavedení do běžné praxe.

Původní články popisující organoželeznatou sloučeninu $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$ neunikly pozornosti Roberta Burnse Woodwarda a Geoffrey Wilkinsona působících na Harvardské univerzitě. Woodward (1917–1979) byl v té době profesorem a uznávaným organickým chemikem. Doktorát získal na MIT již ve dvaceti letech a v době kolem objevu ferrocenu začal publikovat své zásadní práce, které později vedly k udělení Nobelovy ceny¹¹. O málo mladší Wilkinson (1921–1997) byl na Harvardu nováčkem. Chemii vystudoval na Imperial College v Londýně, odkud odešel do USA na University of California v Berkley a dále na MIT. V září 1951 opustil MIT, aby se stal odborným asistentem na Harvardské univerzitě Massachusetts (USA), kde měl zavést radiochemii do studijních programů. V té době se však ve svých zájmech přesunoval k anorganické a koordinační chemii. V době objevu „ $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$ “ se Wilkinson připravoval na přednášku z anorganické chemie a s tím související praktika a zařizoval svou laboratoř^{1b}.

Woodward články o objevu ferrocenu^{2,3} znal a upozornil na ně i Wilkinsona, který se s nimi pravděpodobně seznámil nezávisle. Oba zarázela naprosto nezvyklá stabilita nové sloučeniny, se kterou původně navržené struktury zásadně nekorespondovaly. Woodward pouhou intuící navrhl pro novou látku správnou sendvičovou strukturu *VIII* (obr. 4) a dokonce odhadl její aromatické vlastnosti.



Obr. 4. Správná struktura ferrocenu

S Wilkinsonem, který došel ke stejné struktuře nezávisle, se po dohodě společně pustili do práce na potvrzení svých hypotéz. Myron Rosenblum^{1e}, Woodwardův doktorand, který původně pracoval na syntéze fulvalenu, způsobem popsaným v literatuře³ připravil krystalický ferrocen. Následně se do týmu přidal i Mark C. Whiting^{1f}. Ten u Woodwarda pracoval jen krátce; ferrocen však pojmenoval¹².

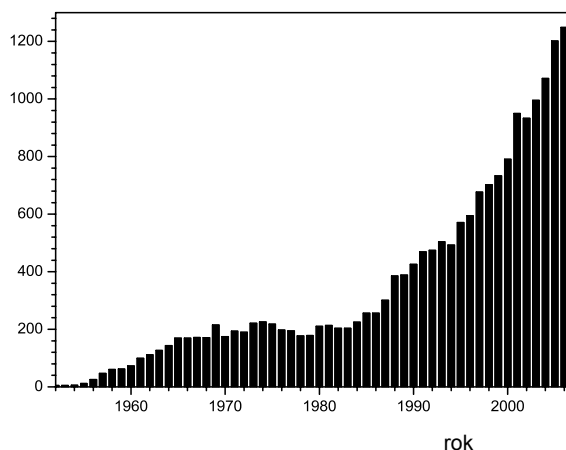
Woodward s Rosenblumem změřili spektra v UV-VIS a infračervené oblasti a stanovili dipólový moment ($0,05 \pm 0,1$ D). Wilkinson přispěl stanovením magnetické susceptibilitu a studiem redoxních vlastností. Z produktů oxidačních reakcí izoloval tetrachlorogalitan kationtu $[C_{10}H_{10}Fe]^+$ a stanovil magnetickou susceptibilitu připravené soli. Těmito výsledky pak ve svém společném článku, který vyšel v *Journal of the American Chemical Society* již 20. dubna 1952, podložili alternativní formulaci strukturou VIII (obr. 4, cit.¹³).

Woodward se svými spolupracovníky k ferrocenu přistupovali spíše „po organicku“. Zjistili, že jej nelze katalyticky hydrogenovat, ale že velmi ochotně reaguje za podmínek Friedelovy-Craftsovy reakce, čímž potvrdili jeho aromatický charakter¹². Po krátké době však Woodward pole ferrocenové chemie vyklidil a věnoval se syntetické a teoretické organické chemii.

Na rozdíl od Woodwarda se Wilkinson ferrocenu a látkám příbuzným věnoval intenzivně dál. Jistě v této oblasti cítil úžasné badatelské možnosti a také jedinečnou příležitost k založení nezávislé kariéry. Brzy rozšířil řadu cyklopentadienylových komplexů nejen o další metaloceny¹⁴, ale také o smíšené komplexy. Přispěli k tomu jistě svou prací i F. A. Cotton^{1g} a P. Pauson^{1c}, kteří harvardský tým posílili záhy po objevu ferrocenu.

Jak je pro časně ferrocenové období typické, správnou strukturu pro ferrocen navrhl téměř současně i jiný tým. Vedl jej Ernst Otto Fischer, který vystudoval chemii na Technische Hochschule v Mnichově a v době objevu ferrocenu tamtéž dokončoval svůj doktorát na Ústavu anorganické chemie pod vedením profesora Waltera Hiebera. Na sloučeninu „ $C_{10}H_{10}Fe$ “ narazil poprvé v *Nature*³ a ihned jej zaujala. S pozhnáním svého školitele objednal dicyklopentadien od firmy BASF a spolu se studentem Reinhardem Jirou ferrocen podle vzoru Kealyho a Pausona připravili^{1a,d}.

Při dalším studiu Fischer mimo jiné zjistil, že nová sloučenina nereaguje s oxidem uhelnatým (ani při tlaku při cca 150 atm) a *o*-fenanthrolinem a je tedy nejen stálá, ale také koordinačně vysycená. Určil rovněž, že neutrální $C_{10}H_{10}Fe$ je sice diamagnetický, ale může být snadno zoxidován na modrozelený paramagnetický kation, který izoloval jako krystalický reineckát, $[Fe^{III}(\eta^5-C_5H_5)_2][Cr^{III}(SCN)_4(NH_3)_2]$. Pro novou látku navrhl sendvičovou strukturu VII („Doppelkegel“), ve které je po 6π elektronech z rovnoběžných cyklopentadienylových aniontů donováno iontu železnatému, čímž doplňují jeho konfiguraci na stabilních 18 valenčních elektronů. Spolu s Wolfgangem Pfabem, který také pracoval na svém doktorátu, navrženou strukturu potvrdili jednoduchou krystalografickou studií. Své výsledky a závěry



Obr. 5. Vývoj počtu publikací týkajících se ferrocenu (podle Chemical Abstracts)

Fischer a Pfab publikovali v *Zeitschrift fuer Naturforschung*¹⁵. Další nezávislá stanovení struktury ferrocenu v krystalu pomocí difrakčních rentgenových metod na kvalitativně různé úrovni poměrně rychle následovala¹⁶.

Ani pro Fischera neskončila práce na cyklopentadienylových komplexech návrhem správné struktury ferrocenu. Následovaly kobaltociniové soli, nikelocen, kobaltocen, magnesocen aj., indenylová analoga metalocenových sloučenin a smíšené komplexy typu $[(\eta^5-C_5H_5)M(CO)_n]$ a i jiné sloučeniny^{1a,d}. S Walterem Hafnerem koncept rozšířili také na klasické 6π -elektronové aromatické systémy¹⁷ a připravili $[Cr(\eta^6-C_6H_6)_2]$ (cit.¹⁸), čímž přispěli k rozluštění celoživotního Heinova mysteria „fenylochromitých“ sloučenin⁹.

Chemie ferrocenu a sloučenin s cyklopentadienylovými ligandy se dále rozvíjela rychlým tempem. Objev ferrocenu poskytl nové a netušené možnosti chemii koordinačních sloučenin v podobě π -ligandů. Jistě tím přispěl i k etablování organoprvkové chemie jako svébytné chemické disciplíny. Udělení Nobelovy ceny¹⁹ Wilkinsonovi a Fischerovi v roce 1973 za přínos k rozvoji chemie cyklopentadienylových komplexů proto bylo nepochybně adekvátním uznáním. Woodward, spoluobjevitel správné struktury ferrocenu, oceněn nebyl, což těžce nesl²⁰.

Po období pionýrského objevování neznáma se celkem přirozeně přidružily i snahy o praktické využití ferrocenu a jeho derivátů. Zájem o ferrocenové sloučeniny neustal dodnes, což jasně dokládá stále rostoucí počet prací věnovaných přípravě a aplikacím ferrocenových sloučenin (obr. 5). Sotva lze dnes nalézt chemický a chemii příbuzný obor, do kterého by chemie ferrocenu nevstoupila. Snad neúspěšnějšími oblastmi ferrocenové chemie jsou příprava ferrocenových ligandů cílená na jejich využití v kovem zprostředkovaných organických reakcích, příprava nových materiálů a biomedicínské aplikace²¹.

LITERATURA

- Osobní vzpomínky aktivních účastníků byly mnohokrát publikovány. (a) Fischer E. O.: *Angew. Chem.* 67, 475 (1955). (b) Wilkinson G.: *J. Organomet. Chem.* 100, 273 (1975). (c) Pauson P. L.: *J. Organomet. Chem.* 637–639, 3 (2001). (d) Fischer E. O., Jira R.: *J. Organomet. Chem.* 637–639, 7 (2001). (e) Rosenblum M.: *J. Organomet. Chem.* 637–639, 13 (2001). (f) Whiting M. C.: *J. Organomet. Chem.* 637–639, 16 (2001). (g) Cotton F. A.: *J. Organomet. Chem.* 637–639, 18 (2001).
- Miller S. A., Tebboth J. A., Tremaine J. F.: *J. Chem. Soc.* 1952, 632.
- Kealy T. J., Pauson P. L.: *Nature* 168, 1039 (1951).
- Seyferth D.: *Organometallics* 20, 1488 (2001).
- Seyferth D.: *Organometallics* 20, 2940 (2001).
- (a) Grignard V.: *Compt. Rend.* 130, 1322 (1990). (b) Francois Auguste Victor Grignard získal za svůj objev v roce 1912 Nobelovu cenu (spolu s Paulem Sabatierem).
- Seyferth D.: *Organometallics* 20, 2 (2001).
- Seyferth D.: *Organometallics* 22, 2 (2003).
- (a) Seyferth D.: *Organometallics* 21, 1520 (2002). (b) Seyferth D.: *Organometallics* 21, 2800 (2002).
- (a) Pope W. J., Peachey S. J.: *Proc. Roy. Soc.* 23, 86 (1907). (b) Pope W. J., Peachey S. J.: *J. Chem. Soc.* 95, 571 (1909).
- V roce 1965 “for his outstanding achievements in the art of organic synthesis”.
- Woodward R. B., Rosenblum M., Whiting M. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 3458 (1952).
- Wilkinson G., Rosenblum M., Whiting M. C., Woodward R. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2125 (1952).
- Články popisující přípravu ruthenocenu $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2]$ a kobaltociniových solí $[\text{Co}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2]\text{X}$ následovaly ještě v téže roce: (a) Wilkinson G.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 6146 (1952). (b) Wilkinson G.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 6148 (1952).
- Fischer E. O., Pfab W.: *Z. Naturforsch.* 7b, 377 (1952).
- (a) Eiland P. F., Pepinsky R.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 4971 (1952). (b) Dunitz J. D., Orgel L. E.: *Nature* 171, 121 (1953).
- Cyklopentadienidový anion $(\text{C}_5\text{H}_5)^-$ je aromatický a vyhovuje Hückelovu pravidlu (je rovinný a má šest konjugovaných π elektronů). Soli $(\text{C}_5\text{H}_5)^-$ s kationty alkalických kovů prvně připravil Johannes Thiele v roce 1900: (a) Thiele J.: *Ber. Deutsch. Chem. Gess.* 33, 666 (1900). (b) Thiele J.: *Ber. Deutsch. Chem. Gess.* 34, 68 (1901). O přípravě dalších organoalkalických sloučenin lze nalézt více v historickém ohlednutí D. Seyfertha: (c) Seyferth D.: *Organometallics* 25, 2 (2006).
- Fischer E. O., Hafner W.: *Z. Naturforsch.* 10b, 665 (1955).
- Cena udělena za „their pioneering work, performed independently, on the chemistry of the organometallic, so-called sandwich compounds“.
- (a) Zydowski T. M.: *Chem. Intelligencer* 2000, 29. (b) Laszlo P., Hoffmann R.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 123 (2000).
- (a) Togni A., Hayashi T. (Eds.): *Ferrocenes. Homogeneous Catalysis. Organic Synthesis. Materials Science.* VCH, Weinheim 1995. (b) Štěpnička P. (ed.): *Ferrocenes – Ligands, Materials and Biomolecules.* Wiley, Chichester 2008.

P. Štěpnička (*Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **History of Ferrocene Discovery**

The discovery of ferrocene about 50 years ago stirred up a vigorous interest in the chemistry of organometallic compounds and brought new stimuli into coordination chemistry. Although the discovery of this archetypal metallocene has been later overshadowed by the exceedingly rich developments in ferrocene chemistry, it remains one of the most fascinating stories of chemical research. This article attempts to provide a brief summary of the early days of ferrocene chemistry, covering the narrow period from the preparation of ferrocene to the determination of its structure and early studies into its reactivity.

ONKOGENNÍ KINASA Bcr-Abl A JEJÍ REZISTENCE K POUŽÍVANÝM INHIBITORŮM

VLADIMÍR KRYŠTOF

Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta
Univerzity Palackého v Olomouci & Ústav experimentální
botaniky AV ČR v.v.i., Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
vladimir.krystof@upol.cz

Došlo 13.2.08, přijato 15.4.08.

Klíčová slova: imatinib, inhibitor, chronická myeloidní
leukemie, kinasa, rakovina

Obsah

1. Úvod
2. Klasická chemoterapie
3. Onkogeny a moderní chemoterapie
4. Oranžová pilulka proti leukemii
 - 4.1. Chronická myeloidní leukemie
 - 4.2. Vývoj imatinibu a mechanismus jeho účinku
 - 4.3. Klinická rezistence vůči imatinibu
5. Druhá generace inhibitorů
6. Závěr

1. Úvod

Vývoj nových terapeutických postupů pro léčbu rakoviny je dnes znatelně urychlován studiem molekulární podstaty vzniku nádorů. Brzy po objevu nové vlastnosti nebo funkce určitého proteinu charakteristické pro nádorovou buňku následuje navržení možného využití v terapii. Moderní terapeutické postupy velmi často zasahují specifické signální či metabolické dráhy nádorových buněk a ovlivňují tím růst nádoru a jeho expanzi. Postihují přitom právě rozdíly mezi normální a nádorovou (transformovanou) buňkou, a tím snižují eventuální vedlejší účinky léčby.

2. Klasická chemoterapie

Až do začátku 80. let byl vývoj protinádorově aktivních látek směřován téměř výhradně k nukleovým kyselinám a buněčnému dělení. Ve své době to byly nejlépe prostudované a tedy i postžitelné cíle v nádorové buňce. Bohužel nejen v nádorové. Navzdory jednoznačné terapeutické účinnosti dodnes používaných antimetabolitů, alkylačních činidel a mikrotubulárních jedů, představuje klasická chemoterapie obrovskou zátěž pro celý organismus.

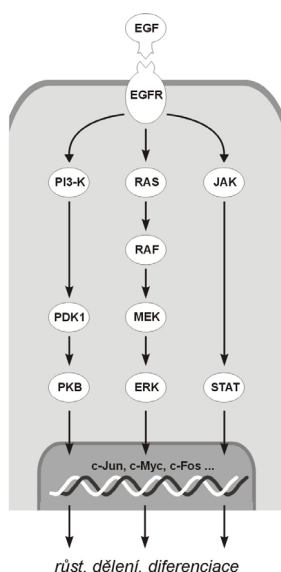
Vysoká toxicita a nízká selektivita způsobují nepříjemné vedlejší účinky. Po počáteční stabilizaci nebo i regresí nádoru často dochází ke vzniku chemorezistence. Naproti tomu molekulární onkologie pomohla v posledních dvaceti letech identifikovat velkou skupinu potenciálních cílů nových protinádorově aktivních látek zejména mezi onkogeny a stimulovala vývoj specifických preparátů, z nichž některé jsou již uvedeny do klinické praxe.

3. Onkogeny a moderní chemoterapie

Mezi onkogeny patří mnoho genů, jejichž produkty jsou za normálních podmínek zapojeny do přenosu růstových signálů z extracelulárního prostředí k jaderné DNA, kde dochází k aktivaci genů nezbytných pro růst a dělení buněk^{1,2}. Růstové signály jsou přenášeny z receptorů s proteinkinaseovou aktivitou fosforylačními kaskádami až do jádra, kde dochází k aktivaci specifických transkripčních faktorů (obr. 1). Jejich funkčnost opět často závisí na posttranslačních modifikacích včetně fosforylací. Transformující mutace, které z neškodných protoonkogenů vytvářejí onkogeny, mimikují v buňce na některé z mnoha úrovní přenosu signálu permanentní stimulaci k dělení². Výsledkem je nekontrolované množení transformované buněčné populace a růst nádoru.

Proteinkinasy představují dnes jednu z nejatraktivnějších enzymových skupin jako cílů moderní protinádorové chemoterapie, což dokládají výzkumná zaměření většiny farmaceutických firem produkujících nová léčiva. Vývoj specifických inhibitorů proteinkinase, které by se daly využít terapeuticky, byl však ještě začátkem 90. let považován za poněkud riskantní podnik. Za největší překážku vývoje a použití inhibitorů zaměřených proti aktivnímu místu byla pokládána vysoká koncentrace ATP v buňkách, s níž by případné inhibitory musely soutěžit. Tento argument však neobstál, když bylo prokázáno výrazné potlačení aktivity určitých kinase specifickými inhibitory i v buňkách. Značný problém představovala též podobnost aktivního místa enzymů využívajících ATP, který není pouhým zdrojem fosfátu, ale účastní se i celé řady biochemických reakcí jako všudypřítomný energetický zásobník. Vazebná místa enzymů využívajících ATP, a proteinkinase obzvláště, totiž vykazují vysoký stupeň podobnosti, což znesnadňuje vývoj inhibitorů specifických pro daný enzym.

Přes uvedené překážky již známe stovky více či méně specifických inhibitorů mnoha proteinkinase, které souvisejí s lidskými nemocemi³. Jejich design a optimalizaci podstatně usnadnily dostupné trojrozměrné struktury řady proteinkinase, získané rentgenostrukturní analýzou, často s ATP nebo inhibitorem lokalizovaným v aktivním místě enzymu. Další vývoj inhibitorů cílených proti určité pro-



Obr. 1. Schéma mitogenní signalizace iniciované vazbou růstového faktoru na příslušný membránově vázaný receptor. Prostřednictvím kaskád přenašečů signálu na bázi proteinkinasy dochází k aktivaci transkripčních faktorů a následně transkripci genů nutných k proliferaci. V podstatě každý z uvedených proteinů může být v buňce (mutací) hyperaktivován a přispívat tak k její transformaci v buňku nádorovou. EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase-1; PKB, protein kinase B; RAS, rat sarcoma virus oncogene homolog; RAF, murine leukemia viral oncogene homolog; MEK, mitogen activated kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; JAK, Janus kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription; c-Jun, avian sarcoma virus oncogene homolog; c-Myc, myelocytomatosis oncogene; c-Fos, murine osteosarcoma viral oncogene homolog

teinkinase v současnosti rovněž usnadňuje znalost lidského genomu. Na základě sekvenčních podobností bylo možné charakterizovat a klasifikovat lidský „kinom“, kompletní rodinu genů kódujících proteinkinasy⁴. Těch je v našem genomu obsaženo 518, přičemž více než dvě třetiny z nich vykazují anomálie ve spojení s některými lidskými nemocemi včetně rakoviny⁵. Přesto se jako léčiva uplatňují inhibitory pouze několika málo z nich, neboť síť jejich vzájemných interakcí je skutečně komplikovaná a zdaleka ne úplně popsaná.

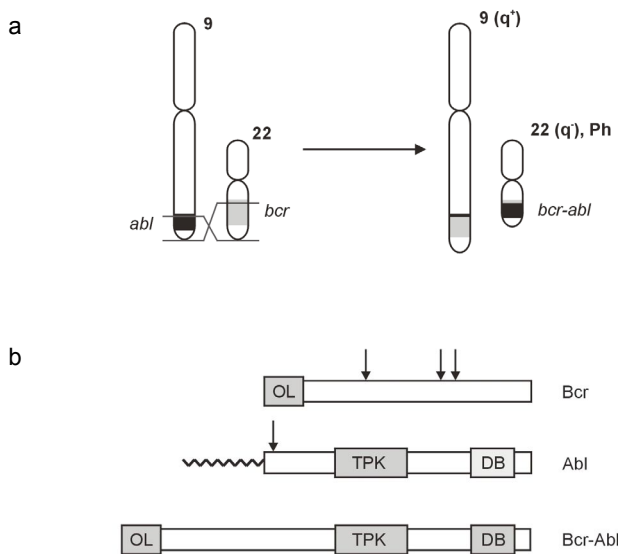
Aktivita proteinkinasy může být prakticky modulovatelná několika různými způsoby, zahrnujícími přímou inhibici enzymové aktivity, narušování interakcí s vazebnými proteiny, případně přímé potlačení exprese dané proteinkinasy. Jednoznačně nejčastěji volenou strategií jsou nízkomolekulární kompetitivní inhibitory, o čemž svědčí stovky odborných publikací věnovaných jejich vývoji, případně již popisujících výsledky klinického testování. Výrazně tak převažují nad nekompetitivními inhibitory, monoklonálními protilátkami anebo protisměrnými oligonukleotidy či inhibiční RNA.

4. Oranžová pilulka proti leukemii

Vůbec prvním registrovaným léčivem na bázi inhibitoru proteinkinasy se stal imatinib, s obchodním označením GlivecTM (cit.⁶). Od roku 2001 je v USA používán při terapii chronické myeloidní leukemie (CML), která se vyznačuje přítomností vysoce aktivní tyrosinové kinasy Bcr-Abl. Imatinib blokuje její katalytickou aktivitu kompeticí s ATP.

4.1. Chronická myeloidní leukemie

Onkogen *BCR-ABL*, charakteristický pro chronickou myeloidní leukemii a některé formy akutní lymfoblastické leukemie, vzniká reciprokou translokací mezi chromosomy 9 a 22. Jedná se v podstatě o vzájemnou výměnu ramének dvou chromosomů, která ve svém důsledku fúzuje gen *Bcr* s genem *Abl* v oblasti odpovídající *N*-terminální části *Abl* tyrosinové kinasy (obr. 2). Tento onkogen je lokalizován na zkráceném chromosomu 22q⁻, označovaném také jako chromosom Philadelphia, a transkripční onkogen *BCR-ABL* vzniká konstitutivně aktivovaná kinasa^{7,8}. Fúzní protein Bcr-Abl má sice zachovanou svou katalytickou funkci, ale chybí mu ona *N*-terminální doména důležitá pro regulaci; místo ní obsahuje část proteinu Bcr. Gen *Bcr* je normálně transkribován docela silně, čímž podstatně zvyšuje koncentraci celého onkoproteinu Bcr-Abl. Navíc pod-



Obr. 2. Mechanismus vzniku onkogeny *BCR-ABL* chromosomální translokací (a) a struktura proteinů Bcr, Abl a fúzního onkoproteinu Bcr-Abl (b) s některými důležitými doménami (OL, oligomerizační doména; TPK, doména tyrosinové proteinkinasy; DB, DNA vazebná doména). Šipky znázorňují přibližnou polohu známých míst zlomů v obou genech, přičemž pozice zlomu genu *BCR* určuje velikost výsledného onkoproteinu Bcr-Abl (190-230 kDa). Myristoylace C-konce proteinu Abl, důležitá pro jeho regulaci, fúzi zaniká

poruje oligomerizaci Bcr-Abl a tím i aktivaci autofosforylací; podjednotky v oligomeru si navzájem fosforylují své aktivační domény a tím o několik řádů vzrůstá jejich katalytická aktivita. Hyperaktivovaná Bcr-Abl pak bez jakékoliv kontroly přebírá funkci normální Abl a překotně fosforyluje její substráty, proteiny zapojené do signálních drah pro růst a přežívání (např. kinasy Raf, PKB, PI3-K, transkripční faktory c-Myc, Stat atd.). Takto transformované buňky ztrácejí schopnost vzájemné adheze, jsou vyplavovány z kostní dřeně, zvyšují svůj proliferační potenciál a navíc snižují citlivost na apoptotické podněty (např. při konvenční chemoterapii)⁶.

4.2. Vývoj imatinibu a mechanismus jeho účinku

Vzhledem k funkci Bcr-Abl při vzniku a vývoji CML představuje katalytická doména této kinasy jedinečný terapeutický cíl. Screening sloučenin schopných blokovat její aktivitu vedl k identifikaci řady inhibitorů jako potenciálních kandidátů pro farmakologické využití. Výchozím bodem ve vývoji imatinibu se stal 2-fenylaminopyrimidin, poměrně slabý inhibitor proteinkinasy C se snadno modifikovatelnou molekulou. Důkladné studium vlivu modifikací této molekuly na její inhibiční schopnosti pak vedlo k syntéze molekuly výrazně účinnější a selektivnější k Bcr-Abl: připojení pyridylu zvýšilo buněčnou aktivitu, amidická skupina zesílila interakci s tyrosinovými kinasami a následně vnesení methylu pak omezilo nežádoucí vliv na proteinkinasu C. Připojení dalšího postranního řetězce na bázi *N*-methylpiperazinu nakonec zlepšilo rozpustnost a zároveň orální dostupnost finální podoby imatinibu⁹.

Rentgenostrukturní analýza společného krystalu Abl kinasy s imatinibem posléze potvrdila, že vazebným místem pro inhibitor je právě aktivní místo poutající ATP (cit.¹⁰). Toto vazebné místo se nachází ve štěrbině mezi *C*-terminální a *N*-terminální doménou Abl, podobně jako je tomu u řady dalších proteinkinas. Imatinib navíc s vyšší afinitou interaguje s neaktivní formou kinasy a svou vazbou ji v této formě stabilizuje¹⁰. Jak však může stabilizovat neaktivní konformaci Abl, která je přitom konstitutivně aktivována fúzí s Bcr proteinem? Pravděpodobně vysvětlení spočívá v dynamice procesu aktivující fosforylace – buněčné fosfatasy totiž permanentně defosforylují a inaktivují Bcr-Abl, která se ale účinně brání opakovanou autofosforylací. Jakmile je však aktivační smyčka defosforylována, imatinib může vstoupit do vazebného místa a stabilizovat tuto konformaci. Konformace neaktivní Bcr-Abl je v kinomu poněkud neobvyklá, což opět přispívá ke specifitě inhibitoru¹¹.

Důležitou vlastností imatinibu je jeho selektivita; inhibitor až na výjimky neovlivňuje aktivitu žádných dalších proteinkinas^{6,12}. Na buněčné úrovni se projevuje anti-proliferační potenciál výhradně na buněčných liniích s aktivním onkogenem *BCR-ABL*, a na jiné buňky vliv prakticky nemá⁶. Signální dráhy ovládané onkogenní kinasou Bcr-Abl v těchto buňkách zůstávají po působení imati-

nibu zablokovány, a tudíž např. nefosforylovaný aktivátor transkripce Stat5, který patří mezi substráty Bcr-Abl, zůstává neaktivní, není schopen vyvolat expresi antiapoptotického genu *Bcl-X_L* a buňky umírají. Původní Abl kinasa, od níž je onkogenní Bcr-Abl odvozena, sice má svou fyziologickou funkci, ale její inhibice v normálních buňkách nepředstavuje pro organismus výraznější problém, neboť ji mohou zastoupit jiné enzymy. A tím nemůže způsobovat nežádoucí vedlejší účinky v normálních buňkách.

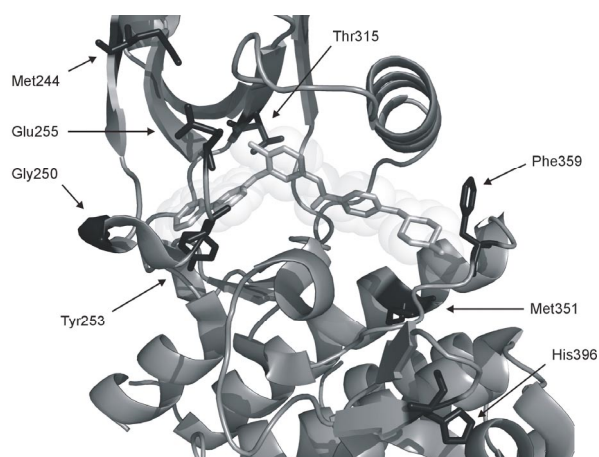
Pozdější důkladné biochemické experimenty však přece jen prokázaly schopnost imatinibu interagovat s některými ze strukturně příbuzných kinas, a to např. s receptorem pro růstový faktor uvolňovaný trombocyty (PDGFR) a Kit¹³. Buď jedna nebo druhá z těchto kinas bývá mutací hyperaktivována v některých gastrointestinálních nádorech, a tak je dnes imatinib používán také při terapii nádorů, jež se uvedenou mutací vyznačují, a konvenční chemoterapii bývají obtížně léčitelné^{14,15}.

4.3. Klinická rezistence vůči imatinibu

Již během první fáze klinických zkoušek bylo zjištěno, že část pacientů na terapii imatinibem zprvu dobře odpovídá, ale nedostaví se u nich kompletní vyléčení. Po několika měsících CML recidivuje a dokonce přestává odpovídat na imatinib. Dochází u nich ke vzniku rezistentní populace myeloidních buněk. Překvapením však byla povaha snížené citlivosti *BCR-ABL* pozitivních buněk na imatinib. Kromě běžných mechanismů rezistence transformovaných buněk na chemoterapeutika (např. zesílený transport inhibitoru ven z buněk pomocí P-glykoproteinů či jeho inaktivace vazbou na proteiny) je často u pacientů s rezistencí pozorována amplifikace onkogenu *BCR-ABL* (cit.^{16,17}). Buňky s touto amplifikací syntetizují větší množství Bcr-Abl, na což už terapeuticky používané dávky imatinibu nestačí.

Nejčastější a poměrně překvapivou informací však byla identifikace bodových mutací Bcr-Abl, které brání vstupu imatinibu do vazebného místa, a přitom zachovávají afinitu k ATP a enzymovou aktivitu. Vůbec první popsaná mutace spočívá v záměně threoninu 315, který interaguje vodíkovým můstkem s aminoskupinou inhibitoru, za objemnější a nepolární isoleucin, jenž můstek s inhibitorem netvoří a navíc mu v aktivním místě překáží¹⁷. Thr315 leží hluboko v aktivním místě, až na okraji oblasti interagující s ATP, takže jeho vazbu vůbec neovlivňuje. Dnes známe již přes 50 dalších aminokyselinových záměn v rezistentních formách Bcr-Abl, z nichž většina se kupodivu nachází mimo aktivní místo. Tyto obvykle zesilují schopnost autofosforylační aktivity anebo přímo stabilizují aktivní konformaci Bcr-Abl, která vazbu imatinibu vylučuje¹⁸. Mnoho popsaných bodových mutací je ovšem poměrně vzácných, a tak 60–70 % všech případů připadá na rezidua Gly250, Tyr253, Glu255, Thr315, Met351 a Phe359 (obr. 3).

Nakolik se ale sám imatinib podílí na vzniku bodových mutací, není zatím zřejmé, přestože byl popsán vliv Bcr-Abl na zvýšení genetické nestability (podpora produk-



Obr. 3. Detail struktury aktivního místa kinasy Abl v komplexu s imatinibem. Zvýrazněny jsou některé aminokyseliny, jejichž mutace způsobují k imatinibu rezistenci

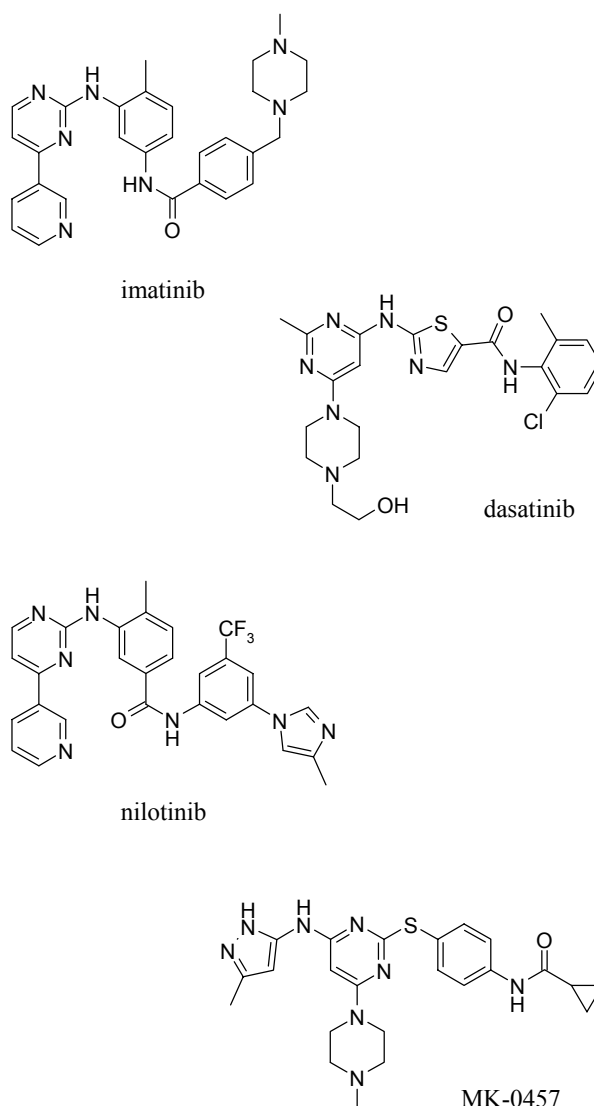
ce reaktivních forem kyslíku, inaktivace mechanismů opravujících poškození DNA), která vede k četnějším mutacím v celém genomu nádorové buňky¹⁹. Buněčné populace s některými bodovými mutacemi Bcr-Abl byly totiž nalezeny i u neléčených pacientů, u nichž většinou propukají agresivnější formy CML. Působením imatinibu v organismu pak zřejmě dochází k selekci a expanzi buněčného klonu s některou z uvedených forem rezistence (anebo jejich kombinací) a ke zhoršení prognózy pacienta²⁰.

5. Druhá generace inhibitorů

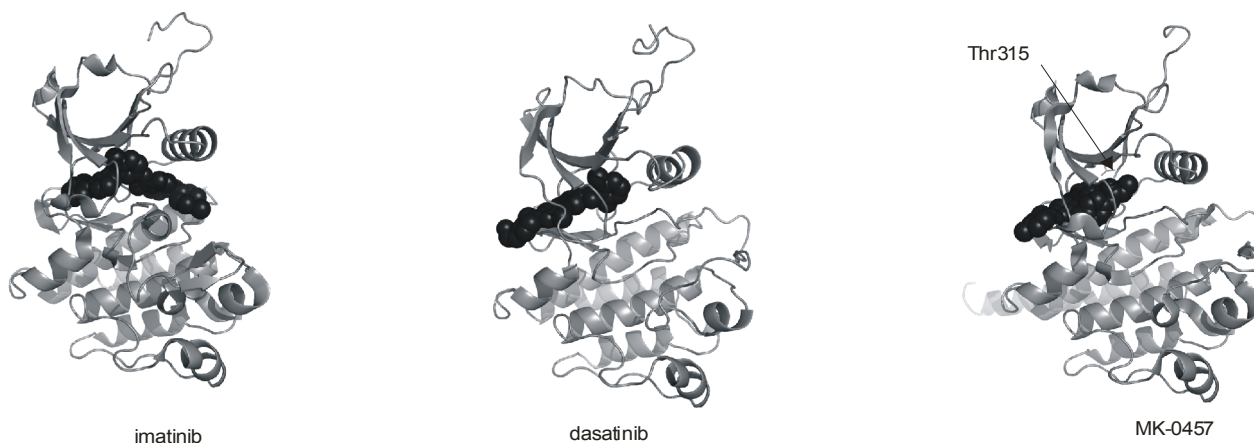
Poměrně podrobná znalost struktury a funkce onkogenní Bcr-Abl podnítila vývoj alternativních inhibitorů, které by byly schopny blokovat také mutantní formy necitlivé k imatinibu. Úsilí biochemiků, strukturálních biologů a medicínálních chemiků vyvrcholilo poměrně brzy úspěšným vývojem několika typů druhé generace specifických farmak (obr. 4), která jsou několikanásobně účinnější než původní imatinib a interagují s řadou mutantních forem Bcr-Abl (cit.¹⁸). U pacientů s agresivnější formou CML, kteří neodpovídají na léčbu imatinibem, se tak dnes nasazuje dasatinib, jenž byl v USA i v Evropě schválen v roce 2006. Protože se jedná o cca 300× účinnější inhibitor než imatinib, a je schopen také účinně deaktivovat některé mutantní formy Bcr-Abl, používá se pro léčbu CML u pacientů s rezistencí k imatinibu. Dasatinib interaguje také s dalšími kinasami (např. Kit, PDGFR a celé skupině Src kinas), což je pravděpodobně dáno tím, že se na rozdíl od imatinibu váže do aktivní formy Bcr-Abl, která se mnohem více podobá ostatním kinasám. Jeho nižší selektivita je pro terapeutický efekt dokonce výhodná, neboť kromě přímé inhibice Bcr-Abl dasatinib také blokuje aktivitu Src kinas, které bývají v leukemických buňkách aktivovány fosforylací Bcr-Abl. Ovšem ani tento inhibitor není scho-

pen interakce s nejčastějším mutantem Bcr-Abl nesoucí Thr315Ile (cit.¹²).

Preklinické a klinické zkoušení dalších inhibitorů proto stále probíhá^{18,21}. Za zmínku stojí např. nilotinib, který je sice jen 30× efektivnější než imatinib, vyznačuje se však podstatně vyšší selektivitou, a proto i mnohem mírnějšími vedlejšími účinky^{12,18}. Zřejmě nejzajímavějším preparátem se v současnosti jeví látka MK-0457 (dříve označovaná jako VX-680), která byla původně vyvinuta jako inhibitor zcela jiné proteinkiny – aurory A¹⁸. Teprve během pozdějších biochemických testů byla objevena schopnost MK-0457 inaktivovat také Bcr-Abl, a to překvapivě i v klinicky nejvýznamnější mutantní podobě



Obr. 4. Strukturální vzorce inhibitorů onkogenní kinasy Bcr-Abl. Imatinib, dasatinib a nilotinib jsou již jako léčiva používány, MK-0457 se zatím podrobuje klinickým zkouškám



Obr. 5. Struktury komplexů kinasové domény Abl s farmakologicky významnými inhibitory. Zvýrazněn je Thr315, který s MK-0457 vůbec neinteraguje a jeho mutace nijak inhibitor neomezuje

s Thr315Ile (cit.²²). Tento účinek je způsoben tím, že se MK-0457 v aktivním místě domény Abl vyhýbá právě interakci s reziduem 315 (obr. 5, cit.^{23,24}). Přestože patří tato látka evidentně k těm méně selektivním, anebo možná právě proto, je schopna účinně likvidovat leukemické buňky s indukovanou rezistencí k imatinibu a dasatinibu jak v kulturách *in vitro*, tak ve zvířecích modelech.

6. Závěr

Zavedení imatinibu jako léčiva je považováno za milník nejen v terapii CML, ale v protinádorové chemoterapii vůbec. Jeho komerční úspěšnost totiž vyvolala obrovskou vlnu zájmu o farmakologické inhibitory dalších proteinkinas. Svou podstatou je ovšem CML mezi ostatními nádorovými onemocněními poněkud výjimečná, neboť za její vznik a rozvoj zodpovídá pouze jeden onkogen, který se navíc v žádných dalších buňkách organismu nevyskytuje. Představuje proto ideální cíl pro chemoterapeutickou intervenci. Relativně snadné vyšetření přítomnosti chromosomu Philadelphia v leukemických buňkách navíc jednoznačně předurčuje pacienta ke specifické terapii imatinibem.

Které ze stovek dalších proteinkinas či jiných onkoproteinů a jak bude třeba inaktivovat v určitém nádoru pro úspěšnou terapii, je v současnosti předmětem intenzivního výzkumu. Kromě imatinibu a dasatinibu bylo začátkem roku 2008 v klinické praxi již sedm dalších léčiv na bázi inhibitorů proteinkinas a odhaduje se, že v pokročilých fázích klinického zkoušení jsou dnes desítky dalších, což snad poskytuje jistou míru optimismu do budoucnosti. Nicméně zavedení diagnostických metod, které umožní identifikovat aktivní onkogeny vhodné jako terapeutické cíle individuálně u každého pacienta, představuje úkol stejně důležitý (a naprosto nezbytný) jako dostupnost specifického léku.

Autor je podporován výzkumným záměrem MSM 6198959216.

LITERATURA

1. Shaul Y. D., Seger R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1213 (2007).
2. McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Wong E. W., Chang F., Lehmann B., Terrian D. M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli A. M., Franklin R. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1263 (2007).
3. Fabbro D., Ruetz S., Buchdunger E., Cowan-Jacob S.W., Fendrich G., Liebetanz J., Mestan J., O'Reilly T., Traxler P., Chaudhuri B., Fretz H., Zimmermann J., Meyer T., Caravatti G., Furet P., Manley P. W.: *Pharmacol. Ther.* 93, 79 (2002).
4. Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S.: *Science* 298, 1912 (2002).
5. Greenman C., Stephens P., Smith R., Dalgliesh G. L., Hunter C., Bignell G., Davies H., Teague J., Butler A., Stevens C., Edkins S., O'Meara S., Vastrik I., Schmidt E. E., Avis T., Barthorpe S., Bhamra G., Buck G., Choudhury B., Clements J., Cole J., Dicks E., Forbes S., Gray K., Halliday K., Harrison R., Hills K., Hinton J., Jenkinson A., Jones D., Menzies A., Mironenko T., Perry J., Raine K., Richardson D., Shepherd R., Small A., Tofts C., Varian J., Webb T., West S., Widaa S., Yates A., Cahill D. P., Louis D. N., Goldstraw P., Nicholson A. G., Basseur F., Looijenga J., Weber B. L., Chiew Y. E., DeFazio A., Greaves M. F., Green A. R., Campbell P., Birney E., Easton D. F., Chenevix-Trench G., Tan M. H., Khoo S. K., Teh B. T., Yuen S. T., Leung S. Y., Wooster R., Futreal P. A., Stratton M. R.: *Nature* 446, 153 (2007).
6. Capdeville R., Buchdunger E., Zimmermann J., Mat-

- ter A.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 493 (2002).
7. Rowley J. D.: *Nature* 243, 290 (1973).
 8. Kelliher M. A., McLaughlin J., Witte O. N., Rosenberg N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6649 (1990).
 9. Zimmermann J., Buchdunger E., Mett H., Meyer T., Lydon N. B.: *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* 7, 187 (1997).
 10. Nagar B., Bornmann W. G., Pellicena P., Schindler T., Veach D. R., Miller W. T., Clarkson B., Kuriyan J.: *Cancer Res.* 62, 4236 (2002).
 11. Noble M. E., Endicott J. A., Johnson L. N.: *Science* 303, 1800 (2004).
 12. O'Hare T., Walters D. K., Stoffregen E. P., Jia T., Manley P. W., Mestan J., Cowan-Jacob S. W., Lee F. Y., Heinrich M. C., Deininger M. W., Druker B. J.: *Cancer Res.* 65, 4500 (2005).
 13. Fabian M. A., Biggs W. H. 3rd, Treiber D. K., Atteridge C. E., Azimioara M. D., Benedetti M. G., Carter T. A., Ciceri P., Edeen P. T., Floyd M., Ford J. M., Galvin M., Gerlach J. L., Grotzfeld R. M., Herrgard S., Insko D. E., Insko M. A., Lai A. G., Lélías J. M., Mehta S. A., Milanov Z. V., Velasco A. M., Wodicka L. M., Patel H. K., Zarrinkar P. P., Lockhart D. J.: *Nat. Biotechnol.* 23, 329 (2005).
 14. Heinrich M. C., Corless C. L., Demetri G. D., Blanke C. D., von Mehren M., Joensuu H., McGreevey L. S., Chen C. J., Van den Abbeele A. D., Druker B. J., Kiese B., Eisenberg B., Roberts P. J., Singer S., Fletcher C. D., Silberman S., Dimitrijevic S., Fletcher J. A.: *J. Clin. Oncol.* 21, 4342 (2003).
 15. Baselga J., Arribas J.: *Nat. Med.* 10, 786 (2004).
 16. le Coutre P., Tassi E., Varella-Garcia M., Barni R., Mologni L., Cabrita G., Marchesi E., Supino R., Gambacorti-Passerini C.: *Blood* 95, 1758 (2000).
 17. Gorre M. E., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao P. N., Sawyers C. L.: *Science* 293, 876 (2001).
 18. Weisberg E., Manley P. W., Cowan-Jacob S. W., Hochhaus A., Griffin J. D.: *Nat. Rev. Cancer* 7, 345 (2007).
 19. Penserger E. T., Skorski T.: *Oncogene* 26, 11 (2007).
 20. Hofmann W. K., Komor M., Wassmann B., Jones L. C., Gschaidmeier H., Hoelzer D., Koeffler H. P., Ottmann O. G.: *Blood* 102, 659 (2003).
 21. Zhou T., Parillon L., Li F., Wang Y., Keats J., Lamore S., Xu Q., Shakespeare W., Dalgarno D., Zhu X.: *Chem. Biol. Drug Des.* 70, 171 (2007).
 22. Carter T. A., Wodicka L. M., Shah N. P., Velasco A. M., Fabian M. A., Treiber D. K., Milanov Z. V., Atteridge C. E., Biggs W. H. 3rd, Edeen P. T., Floyd M., Ford J. M., Grotzfeld R. M., Herrgard S., Insko D. E., Mehta S. A., Patel H. K., Pao W., Sawyers C. L., Varmus H., Zarrinkar P. P., Lockhart D. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11011 (2005).
 23. Young M. A., Shah N. P., Chao L. H., Seeliger M., Milanov Z. V., Biggs W. H. 3rd, Treiber D. K., Patel H. K., Zarrinkar P. P., Lockhart D. J., Sawyers C. L., Kuriyan J.: *Cancer Res.* 66, 1007 (2006).
 24. Cheetham G. M., Charlton P. A., Golec J. M., Pollard J. R.: *Cancer Lett.* 251, 323 (2007).

V. Kryštof (*Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Academy of Science of the Czech Republic, Olomouc, Czech Republic*): **Oncogenic Kinase Bcr-Abl and Its Resistance to Pharmacological Inhibitors**

The advances in understanding of neoplastic transformation considerably help the design of molecular-targeted therapies. Protein kinases are critical components of cellular signalling pathways and, due to their frequent deregulation in cancer cells, they have become one of the most important targets in drug development. The efficiency of imatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia is a strong evidence that kinase inhibitors can be effective drugs, although some patients develop resistance to them. The structure-based design, however, allows synthesis of second-generation drugs, which are able to overcome this resistance. The review focuses on oncogenic Bcr-Abl as an example of a rational target for kinase inhibitors, their development and biochemical properties.

PŘÍSPĚVEK KE STUDIU VZNIKU A TRANSFORMACE NĚKTERÝCH PĚTI A ŠESTIČLENNÝCH HETEROCYKlickÝCH SLOUČENIN OBSAHUJÍCÍCH DUSÍK A SÍRU

JIŘÍ HANUSEK*

*Katedra organické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice
Jiri.Hanusek@upce.cz*

Došlo 28.1.08, přepracováno 6.3.08, přijato 28.4.08.

Klíčová slova: heterocyklické sloučeniny, kinetika, mechanismus, optimalizace syntézy

Obsah

1. Úvod
2. Studované cyklizační reakce
 - 2.1. Deriváty chinazolinu
 - 2.2. Deriváty thiazolu a benzothiazolu
 - 2.3. Deriváty imidazolu
3. Studium reaktivity 3-amino-1,2,4-dithiazol-5-thionu s P(III) sloučeninami
4. Závěr

1. Úvod

Již více než sto let tvoří heterocyklické sloučeniny jednu z nejrozsáhlejších oblastí organické chemie. Toto tvrzení lze dokumentovat statistikou Chemical Abstracts Service (CAS®), která v současnosti (leden 2008) registruje¹ přibližně 33,5 milionů anorganických a organických sloučenin, z nichž je odhadem okolo 50 % heterocyklických². Důvodem obrovského zájmu o heterocyklické sloučeniny je zejména fakt, že tyto látky nacházejí uplatnění v mnoha oblastech lidské činnosti³. Jen namátkou lze jmenovat jejich využití ve farmakologii^{4–11}, agrochemii^{12,13}, optice a elektronice^{14–19}, materiálových vědách^{20,21} a mnoha dalších oborech. Heterocyklické sloučeniny také hrají důležitou roli v průběhu biochemických dějů^{22,23}, protože jsou nezbytnou součástí buněk všech živých organismů. Poměrně výsadní postavení zaujímají mezi heterocyklickými sloučeninami ty, které obsahují dusík a síru. V kontrastu s obrovským množstvím takovýchto sloučenin existuje jen omezený počet způsobů jejich přípravy, což je

dáno zejména dostupností výchozích dusíkatých a siřných látek.

Syntézu heterocyklických sloučenin lze v zásadě provádět dvěma metodickými postupy. První metodika spočívá v konstrukci heterocyklického skeletu buď intramolekulárními^{24–28} nebo cykloadičními^{29–31} reakcemi, kdežto druhá spočívá v syntetických obměnách již existujícího heterocyklu^{32–36}. Pro poznání detailního průběhu těchto reakcí má rovněž velký význam studium reakčních mechanismů za použití kinetických metod³⁷. Reakční mechanismy bývají často navrhovány jen na základě znalosti struktury výchozích látek, produktů a analogie s podobnými reakcemi. Tento přístup může vést k mylným závěrům, protože i malá změna ve struktuře výchozí látky často vede k velké změně její reaktivity. S tím je často spojena i změna reakčního mechanismu. Teprve kinetické studie spolu s kvantově-chemickými výpočty dovolují přiblížit se struktuře tranzitních stavů a s větší pravděpodobností formulovat návrh reakčního mechanismu. Dalšími z výstupů studia kinetiky vzniku a transformace heterocyklických sloučenin je kromě objasnění mechanismu také optimalizace podmínek syntézy těchto látek³⁷ a použitelnost získaných poznatků k cílené přípravě proléčiv^{38–40} („prodrugs“) resp. ke kontrolovanému uvolňování léčiv v organismu⁴¹ („drug control release“). Výzkum cyklizačních reakcí poskytujících heterocyklické sloučeniny je významný i z toho důvodu, že tyto reakce se svým průběhem blíží enzymatickým procesům v biologických systémech⁴².

2. Studované cyklizační reakce

V rámci svého systematického výzkumu na Katedře organické chemie jsem se v letech 1997–2007 zabýval studiem vzniku, stability a reaktivity několika typů pěti a šestičleenných heterocyklických sloučenin, jejichž společným znakem byla přítomnost atomu dusíku nebo síry. Jednalo se především o deriváty chinazolinu, 1,3-thiazolu, imidazolu a 1,2,4-dithiazolu. V následujících kapitolách bude na vzniku těchto modelových sloučenin ukázáno, jak i relativně malé strukturální změny provedené v molekulách výchozích látek vedou k velkým rozdílům v reaktivitě nebo i v reakčním mechanismu.

2.1. Deriváty chinazolinu

Rozsáhlé téma^{43–48} studia syntézy a reaktivity derivátů 2-(subst. fenyl)chinazolin-4-onu a 2-(subst. fenyl)

* Autorovi byla udělena Českou společností chemickou Cena Alfreda Badera za organickou chemii za rok 2007.

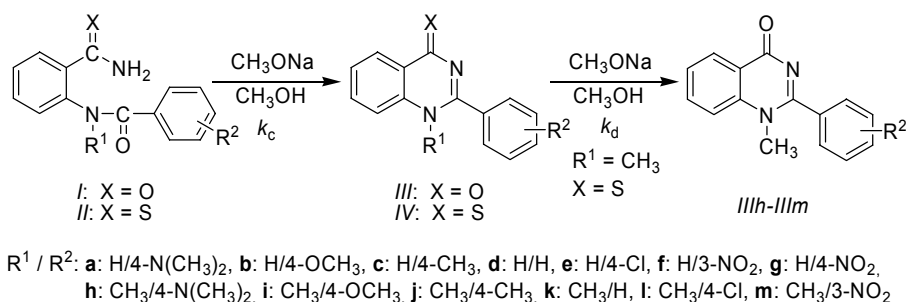


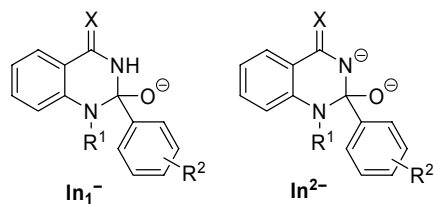
Schéma 1. Příprava a desulfurace substituovaných 2-fenylchinazolin-4-onů a 4-thionů

chinazolin-4-thionu bylo motivováno významnou biologickou aktivitou podobných derivátů obsahujících chinazolinový skelet. V současné době^{12,49} je registrováno více než 25 přípravků na bázi chinazolin-4-onu a jeho derivátů. Pro optimalizaci syntézy⁴³ výše zmíněných látek byl proveden detailní výzkum vlivu substituce⁴⁴ na cyklizační reakci výchozích 2-benzoylamino benzamidů *Ia-m* a 2-benzoylaminothiobenzamidů *Ila-m*, které v prostředí methanolátu sodného v methanolu poskytují požadované 2-(subst. fenyl)chinazolin-4-ony *IIIa-m* resp. 2-(subst. fenyl)chinazolin-4-thiony *Iva-m* (Schéma 1).

Při cyklizační reakci *Ia-m* vede substituce vodíku methylovou skupinou (R^1) k postupné změně rychlost určujícího kroku, kdy při nízkých koncentracích methanolátu je reakce druhého řádu k methanolátu a rychlost určujícím krokem je vznik dianiontu tetraedrálního intermediátu **In²⁻**. Se zvyšující se koncentrací methanolátu se však rychlost určujícím krokem stává vznik intermediátu **In₁⁻** a řád reakce vůči methanolátu postupně klesá na jedničku. Tento pokles nejdříve nastává u derivátů 2-benzoylamino benzamidů s elektronakceptorními substituenty *Il-m*.

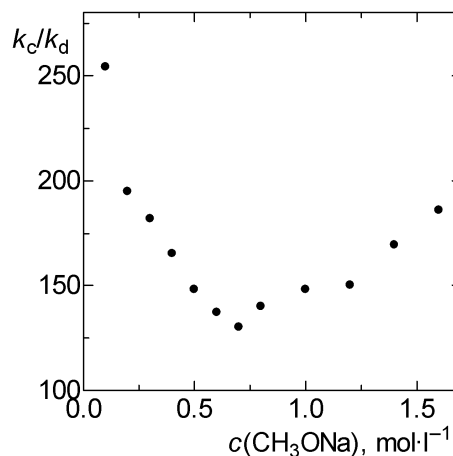
U derivátů *Ila-m* dochází náhradou kyslíku sírou v benzamidické skupině k výraznému zvýšení kyselosti protonu thioamidické skupiny, a proto je bez ohledu na substituci v jádře v celém rozsahu koncentrací methanolátu rychlost určujícím krokem vznik **In₁⁻** a řád reakce vůči methanolátu postupně klesá z jedné na nulu.

Pro praktickou syntézu je důležité, že cyklizaci 2-benzoylaminothiobenzamidů *Ila-g* lze provádět již ve zředěných roztocích methanolátu sodného (cca 0,2 mol l⁻¹); další zvyšování koncentrace nemá na rychlost reakce vliv. U 2-[(*N*-methyl-*N*-benzoyl)amino]thiobenzamidů *IIIh-m* se pozorovaná rychlostní konstanta cyklizační reakce



s koncentrací katalyzujícího methanolátu stále zvyšuje a nedosahuje svého maxima ani v silně koncentrovaných roztocích (okolo 1,6 mol l⁻¹), kde již bazicita prostředí není přímo úměrná koncentraci. Za těchto podmínek však již dochází k následně desulfurační reakci (Schéma 1) vzniklého 1-methyl-2-(subst. fenyl)chinazolin-4-thionu (*IVh-m*) na 1-methyl-2-(subst. fenyl)chinazolin-4-on (*IIIh-m*). Z poměru pozorovaných rychlostních konstant cyklizačního (k_c) a desulfuračního (k_d) kroku lze stanovit optimální podmínky pro přípravu 1-methyl-2-(subst. fenyl)chinazolin-4-thionů. Největší podíl těchto rychlostních konstant je dosažen při nízkých koncentracích methanolátu sodného (obr. 1).

Náhrada vodíku ($R^1 = H$) methylovou skupinou ($R^1 = CH_3$) vede k podstatnému urychlení cyklizační reakce. Toto urychlení je především způsobeno sterickým působením methylové skupiny, která umožňuje vhodnou orientaci reagujícího nukleofilního centra (amidické resp. thioamidické skupiny) vůči karbonylové skupině vedle dusíku

Obr. 1. Závislost poměru pozorované rychlostní konstanty cyklizace (k_c, s^{-1}) *IIIh-m* → *IVh-m* a desulfurace (k_d, s^{-1}) *IVh-m* → *IIIh-m* na koncentraci methanolátu sodného ($c, \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

nesoucího R¹. Dalším důvodem pro urychlení cyklizace derivátů s R¹ = CH₃ je zablokování nežádoucí deprotonace dusíku, které vede k nereaktivní konjugované bázi substrátu. Změnou polohy⁴⁵ methylové skupiny z dusíku vedle benzenového jádra (R¹ = CH₃) na dusík thioamidické skupiny (–CSNHCH₃) naopak dochází k velkému zpomalení rychlosti cyklizace, která tak probíhá měřitelnou rychlostí až při 100 °C. V tomto případě je pokles rychlosti cyklizace dán sterickým stíněním nukleofilního dusíku a snížením acidity thioamidické skupiny. Isolobální záměna kyslíku za síru (X) rovněž vede k urychlení cyklizace. Důvodem je tentokrát zvýšení acidity thioamidické skupiny v porovnání se skupinou amidickou.

Z kinetické studie desulfurační reakce⁴⁶ v roztocích methanolátu sodného (Schéma 1) je zřejmé, že probíhá ve dvou stupních. Pozorovaná rychlostní konstanta prvního stupně nejprve roste s koncentrací methanolátu, avšak po dosažení svého maxima (při koncentraci asi 1 mol l⁻¹) dochází k poklesu. Toto chování opět ukazuje na změnu v rychlost určujícím kroku prvního stupně. Zatímco při nízkých koncentracích určuje rychlost reakce záporně nabitého aduktu *IVh-m* a methanolátu s další molekulou methanolu, při vyšších koncentracích se rychlost určujícím stává odštěpování SH⁻ z tohoto aduktu. Druhý stupeň je na koncentraci methanolátu nezávislý, avšak silně se urychluje přítomností vody resp. hydroxidu. Pro praktickou syntézu je tedy zřejmé, že pro cyklizační stupeň není vhodné použití vodně-methanolického prostředí, kterého se jinak v praxi často používá.

Kromě zjištění, že cyklizace 2-benzoylaminothiobenzamidů (*IIa-m*) probíhá v bazickém prostředí atomem dusíku, je zajímavé, že v silně kyselém prostředí je nejnukleofilnějším atomem síra thioamidické skupiny a konečným produktem cyklizace jsou deriváty benzothiazinu⁴³.

Připravené látky byly rovněž testovány⁴⁷ na antialgální, antimykotickou a antituberkulotickou aktivitu. Ukázalo se však, že jejich aktivita je ve všech případech velmi nízká ve srovnání s komerčními standardy.

Zatímco u předchozích citovaných prací byl sledován vliv substituce atakovaného centra při cyklizační reakci, u analogických subst. fenyl-(2-thiokarbamoylfenyl)karbamátů (*Va-h*), které cyklizaci poskytují 4-thio-3,4-di-

hydrochinazolin-2-ony (*Vla-b*) byl studován⁴⁸ vliv odstupující skupiny tj. odpovídajícího substituovaného fenolátu (Schéma 2). Tato reakce může být modelovým systémem dnes široce studovaných systémů kontrolovaného uvolňování léčiv^{38–41}.

Produkt *Vla* může vznikat třemi rozdílnými mechanismy, jejichž uplatnění závisí zejména na nukleofilítě atakujícího nukleofilního centra (thioamidické skupiny) a na nukleofugalitě odstupující skupiny⁵⁰. Je známo, že pokud je při reakcích karbamátů s externími nukleofily odstupující skupinou substituovaný fenolát, uplatňuje se reakční cesta vedoucí přes isokyanát jako meziproduct (mechanismus *E1cB*). V případě, že odstupující skupinou je alkoholát, vzniká nestabilní tetraedrální intermediát, který se rychle rozpadá na konečný produkt (mechanismus *B_{Ac}2*). Třetí variantou⁵¹ je uplatnění spráženého („concerted“) mechanismu, kdy současně vzniká vazba C–N a zaniká vazba C–O. U reakcí karbamátů s interními nukleofily (intramolekulární reakce) je situace složitější. Mechanismus cyklizace zde nezávisí jen na odstupující skupině, ale také na nukleofilítě interního nukleofilu. V případě relativně snadno ionizovatelných skupin^{52,53} jako je skupina –COOH a –OH byl prokázán mechanismus *B_{Ac}2* i v případě, že odstupující skupinou byl fenolátový anion. Naopak mechanismus *E1cB* se uplatňuje⁵⁴ v případě slabě kyselých amidických skupiny. Thioamidická skupina CSNH₂ leží svou aciditou na pomezí mezi fenoly a amidy a tvoří tak mezičlánek při uplatnění obou možných limitních mechanismů. Ze srovnání hodnot rychlostních konstant derivátů *Va* a *Vg* a hodnoty ρ konstanty série *Va-f* s ρ konstantou methanolýzy necyklizujících subst. fenyl-(4-thiokarbamoyl)karbamátů vyplývá, že cyklizace *Va-g* probíhá mechanismem *B_{Ac}2* s rychlost určujícím odštěpením fenolátového iontu. Zajímavým zjištěním⁴⁸ je i skutečnost, že cyklizace 4-methoxyfenyl-*N*-(2-thiokarbamoylfenyl)-*N*-(methyl)karbamátu (*Vg*) probíhá kineticky ve dvou stupních s rychlostními konstantami lišícími se přibližně o jeden řád. Nejedná se však o následnou reakci typu Substrát → Intermediát → Produkt, protože se v UV-Vis spektrálním záznamu tvoří ostrý isobestický bod⁵⁵. Z ¹H NMR spektra a z UV-Vis spektrálního záznamu cyklizace bylo zjištěno, že se jedná o paralelní reakci dvou rotamerů látky *Vg* vzniklých vlivem brzděné rotace. Oba stabilní rotamery cyklizují vzhledem k různé vzdálenosti reakčního a nukleofilního centra různou rychlostí avšak za vzniku jednotného produktu *Vib*.

2.2. Deriváty thiazolu a benzothiazolu

Prvním řešeným tématem⁵⁶ z oblasti přípravy derivátů 2-amino-1,3-benzothiazolu byla regioselektivní cyklizační reakce 2-halogen-5-nitrofenylthioamočovín *VIIa-d*. Fenylthioamočoviny jsou jedním z vhodných výchozích substrátů pro přípravu derivátů 2-amino-1,3-benzothiazolu. K uzavření cyklu dochází nejčastěji působením oxidačního činidla^{57–59}, které oxiduje hydridový anion odstupující z *ortho* polohy benzenového jádra na dobře odstupující proton. Tato reakce však není regioselektivní a v případě 3-

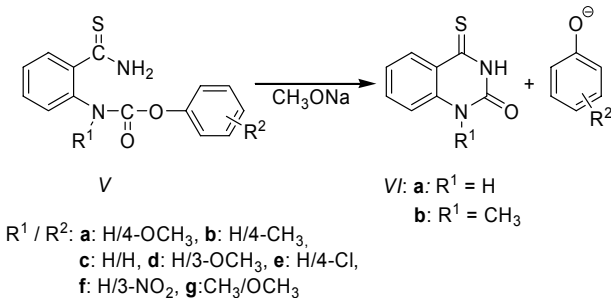


Schéma 2. Cyklizační reakce substituovaných fenyl-(2-thiokarbamoylfenyl)karbamátů

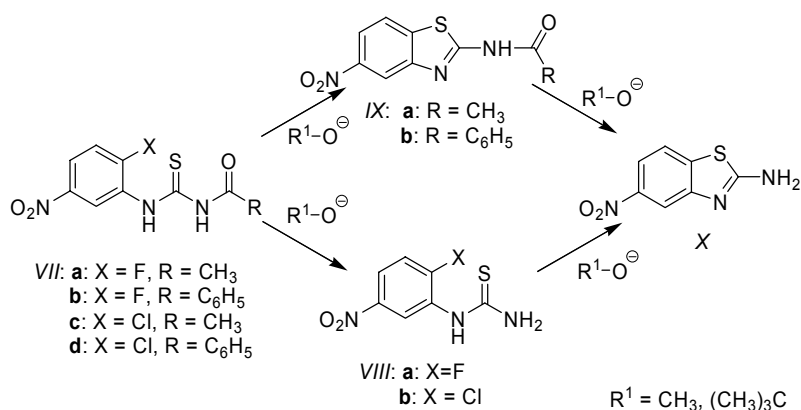


Schéma 3. Cyklizace a solvolýza 1-acyl-3-(2-halogen-5-nitrofenyl)thiomočoviny

substituovaných fenylthiomočoviny dostáváme směs 5- a 7-substituovaného-2-amino-1,3-benzothiazolu⁶⁰. Deriváty 2-amino-1,3-benzothiazolu nacházejí uplatnění v oblasti medicíny (např. nootropní látka⁶¹ Riluzol), v agrochemii jako doplňkové herbicidy, jejichž účinek je založen na inhibici fotosyntézy⁶² (Benzthiazuron a Methabenzthiazuron) a v barvářském^{59,63,64} průmyslu (Disperse Red 177, Disperse Red 58, Disperse Blue 15).

Detailní kinetické studium námi navržené⁵⁶ regioselektivní cyklizace 2-halogen-5-nitrofenylthiomočoviny *VIIa-d* ukázalo, že tato na první pohled jednoduchá reakce je ve skutečnosti ovlivněna celou řadou faktorů (Schéma 3).

Volbou acylskupiny výchozí thiomočoviny, odstupujícího halogenu v poloze 2- resp. alkoholátu použitého k reakci lze ovlivnit nejen výtěžek, ale i vznikající produkt. Zatímco látka *VIIa* poskytuje v prostředí methanolátu sodného nestálou močovinu *VIIIa*, která cyklizuje na 2-amino-5-nitrobenzothiazol (*X*), analogická benzoylmočovina *VIIb* za stejných podmínek podléhá jak solvolýze na *VIIIa* a následné cyklizaci na *X*, tak i paralelní cyklizaci na *IXb*. Poměr konečných produktů *IXb/X* se silně mění s koncentrací methanolátu sodného. Při nízkých koncentracích methanolátu je poměr obou produktů zhruba 1:1, kdežto v koncentrovaných roztocích dominuje produkt paralelní cyklizace *IXb*. Přeměna *IXb* na *X* probíhá ve srovnání s cyklizací *VIIb* na *IXb* za laboratorní teploty o několik řádů pomaleji. Cyklizaci *VIIa* na *IXa* resp. i *VIIb* na *IXb* dosáhneme záměnou methanolátu sodného za stericky náročný *tert*-butylalkoholát draselný. Záměnou odstupujícího fluoru za hůře odstupující chlor naopak zcela potlačíme cyklizační reakci jak *VIIc* tak i *VIIId* a produktem je v obou případech thiomočovina *VIIIb*, která při laboratorní teplotě prakticky necyklizuje. Její cyklizaci na látku *X* lze docílit až několikahodinovým zahříváním k varu v roztoku alkoholátu v alkoholu.

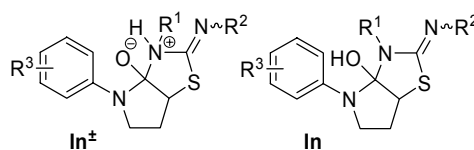
Neméně zajímavé je z teoretického i praktického hlediska ovlivnění všech probíhajících reakcí přítomností 18-crown-6 etheru, kterým můžeme dále „ladit“ podmínky

přípravy jednotlivých derivátů. Solvolytický krok se totiž v přítomnosti 18-crown-6 etheru poněkud zpomaluje, kdežto krok cyklizační se naopak výrazně urychluje. Značné urychlení cyklizace je dáno zvýšením nukleofility síry, způsobené účinnou komplexací sodného kationtu, který jinak vytváří s aniontem výchozí thiomočoviny iontový pár. Publikovaná práce⁵⁶ tedy přispívá nejen k teoretickému poznání probíhajících reakcí z hlediska jejich mechanismu, ale může velmi dobře posloužit i k návrhu optimálních podmínek pro přípravu různě substituovaných derivátů 1,3-benzothiazolu.

Dalším řešeným tématem^{65–67} bylo studium transformační reakce *S*-[1-subst. fenylpyrrolidin-2-on-3-yl] isothiuronium-bromidů (*XIa-h*, *XIIIa-h*, *XVa,h*) na 2-imino-5-(2-subst. fenylaminoethyl)thiazolidin-4-ony (*XIIa-h*, *XIVa-h*, *XVIa,h*), jejichž struktura je velmi blízká antidiabetikům ze skupiny tzv. glitazonů⁶⁸ (Schéma 4).

Uvedená obecně kyselá a obecně bazicky katalyzovaná transformace probíhá již za velmi mírných podmínek, které jsou blízké podmínkám v živých systémech, což činí tuto transformaci potenciálně využitelnou v oboru prolečiv.

Při studiu transformační reakce^{66,67} byl zkoumán vliv počtu methylových skupin na aminoskupinách isothiuroniového skeletu a substituce na benzenovém jádře. Při transformační reakci jedna aminoskupina funguje jako interní nukleofil a druhá se stane substituentem nově vzniklého thiazolidinu. Cyklizační krok transformační reakce se kineticky uplatňuje před rychlost určujícím krokem, proto jej nelze kvantitativně posoudit. Rychlost určujícím krokem je totiž až následný, kyselou i bazickou složkou pufru katalyzovaný, rozpad vzniklých bicyklických intermediátů **In[±]** resp. **In**.



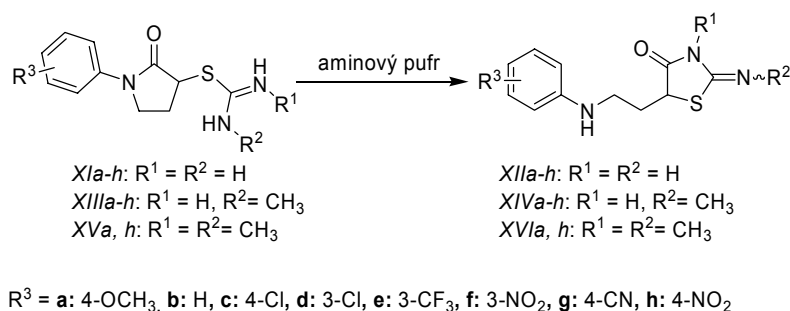


Schéma 4. Transformace *S*-[1-subst. fenylpyrrolidin-2-on-3-yl]isothiuronium-bromidů na 2-imino-5-(2-subst. fenylaminoethyl)thiazolidin-4-ony

Stereoelektronický vliv methylsubstituce se nejvýrazněji projevil při srovnání na atomech dusíku nesubstituovaného derivátů *XIa* s jeho *N,N*-dimethylanalogem *XVa*. Zatímco u sloučenin *XIa-h* se katalyticky uplatňuje pouze bazická složka pufru a to při rozpadu intermediátu \mathbf{In}^\pm , u *XVa,h* představuje dominantní reakční cestu transformační reakce obecně kyselé katalyzovaný rozpad \mathbf{In} . Isothiuroniové soli *XIIIa-h* nesoucí pouze jednu methylskupinu tvoří plynulý přechod v typu uplatňující se acidobazické katalýzy s tím, že bazická složka pufru se uplatňuje významněji.

Rychlosti transformace všech isothiuroniových solí jsou bez ohledu na počet methylskupin na dusících srovnatelné. Zvyšování počtu methylskupin by mělo vést ke zpomalování rychlosti cyklizačního kroku transformace vlivem sterického stínění nukleofilního atomu dusíku. Protože je však cyklizační krok před rychlost určujícím krokem celé transformace – vliv methylskupin se téměř neprojeví.

Ve druhé části práce⁶⁷ byl studován vliv substituce (R^3) na aromatické části molekuly transformujících se isothiuroniových solí *XIa-h* a *XIIIa-h*. Bylo zjištěno, že elektronakceptorní skupiny jako jsou 4- NO_2 a 4-CN silně urychlují transformační reakci, přičemž však nesplňují lineární Hammettovu korelaci získanou pro ostatní substituenty. Toto chování je způsobeno potlačením zkřížené konjugace v cyklizačním kroku transformační reakce a tím

i zvýšením aktuální koncentrace rozpadajícího se obojetného bicyckického intermediátu \mathbf{In}^\pm .

2.3. Deriváty imidazolu

Chemie derivátů imidazolu patří k dlouhodobě řešeným tématům na Katedře organické chemie a to opět v souvislosti s jejich biologickou aktivitou^{69,70}. Při studiu^{71,72} bazicky katalyzované reakce 2-(*N*-methyl-*N*-benzoyl)amino-2,3-butanamidů (*XVIIa-g*) a 2-benzoylamino-2-methyl-thiopropynamidů (*XVIIIh-l*) ve vodných roztocích pufrů a hydroxidu sodného bylo zjištěno, že tyto látky nepodléhají hydrolyze, ale cyklizují (Schéma 5) na odpovídající substituované imidazolin-5-ony (*XVIIIa-g*) resp. 5-thiony (*XVIIIh-l*). U vzniklých imidazolin-5-onů a 5-thionů byla dále studována jejich stabilita v bazickém prostředí.

Při studiu mechanismu cyklizační reakce *XVIIa-e* bylo zjištěno uplatnění specifické bazické katalýzy a závislosti pozorované rychlostní konstanty na koncentraci hydroxidu sodného lineárně stoupají. Z hodnoty reakční konstanty $\rho = 1,4$ lze pro mechanismus cyklizační reakce usuzovat, že rychlost určujícím krokem je atak amidického aniontu, vzniklého v rychlé předřazené rovnováze, na karbonylovou skupinu.

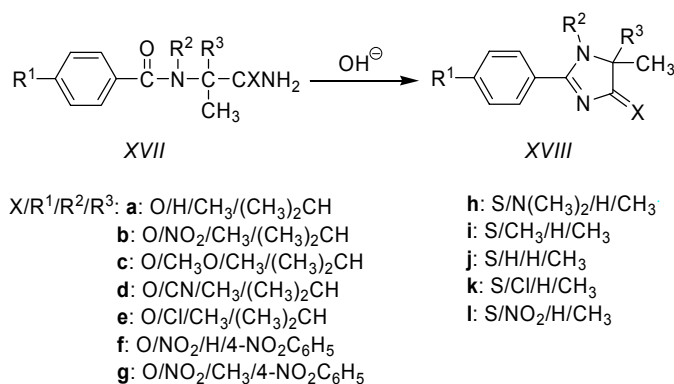


Schéma 5. Příprava imidazolin-5-onů a 5-thionů

XXIIa-d s kyanatanem a thiokyanatanem draselným v prostředí ledové kyseliny octové.

Bylo zjištěno, že v případě reakce *XXIIa-d* s thiokyanatanem draselným dochází v rychlost určujícím stupni k adici nukleofilního thiokyanatanového aniontu na iminovou vazbu. Po následné intramolekulární cyklizaci a opakování této sekvence vzniká finální perhydroimidazo [4,5-*d*]imidazolidin-2,5-dithion *XXIVa-d*. Méně nukleofilní kyanatanový aniont již vyžaduje přítomnost kyselý katalýzy – v rychlost určujícím stupni dochází k jeho adici na molekulu protonovaného iminu *XXIIa-d*. Díky nižší nukleofilitě kyanatanového aniontu se pak v dalším průběhu reakce přednostně aduje kyselina octová a vzniká tak 4-acetoxy-5-(4-subst. fenylamino)-3-(4-subst. fenyl)imidazolidin-2-on *XXIIIa-d*.

3. Studium reaktivity

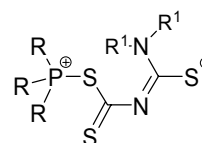
3-amino-1,2,4-dithiazol-5-thionu s P(III) sloučeninami

Motivací tohoto výzkumu bylo objasnit mechanismus přenosu atomu síry z 1,2,4-dithiazolového kruhu na atom fosforu, protože tato reakce má praktický význam při syntéze modifikovaných oligonukletidů⁸⁸. Kromě studia detailního mechanismu bylo nutné identifikovat i vedlejší produkty této reakce, protože v tomto směru byly v literatuře⁸⁸ nalezeny pouze rozporuplné informace. Pro sulfuraci P(III) sloučenin bylo v minulosti navrženo velké množství^{89–95} činidel, z nichž se jako nevhodnější jeví deriváty^{88,96,97} 1,2,4-dithiazolu. Komerčně⁹⁸ je využíván 3-amino-1,2,4-dithiazol-5-thion (xanthan hydrid).

Proto byla studována sulfurace trialkyl- a triarylfosfinů a fosfitů 3-amino-1,2,4-dithiazol-5-thionem (*XXVa*) a jeho *N,N*-dimethylderivátem (*XXVb*). Bylo zjištěno, že během reakce vzniká⁹⁹ vysoce reaktivní thiokarbamoyliso-thiokyanát a nikoliv v literatuře navrhovaný kyanamid a sírouhlík (Schéma 8). Vznik reaktivního thiokarbamoyliso-thiokyanátu může při syntéze polyfunkčních sloučenin, jakými jsou i oligonukleotidy, způsobovat komplikace. Samotný thiokarbamoyliso-thiokyanát je natolik reaktivní, že jej nebylo možné izolovat. Jeho přítomnost byla proká-

zána přidavkem nukleofilního činidla (4-nitroanilinu), se kterým vznikal stabilní produkt adice: 1-(4-nitrofenyl) dithiobiuret. Při sulfuraci *XXVb* byl po reakci izolován i produkt¹⁰⁰ [4+2] cykloadiční reakce samotného *N,N*-dimethylthiokarbamoyliso-thiokyanátu: 2-dimethylamino-5-dimethylthiokarbamoyl-1,3,5-thiadiazin-4,6-dithion.

Detailním studiem kinetiky a mechanismu¹⁰¹ bylo zjištěno, že přenos atomu síry na fosfor je velmi rychlý (bimolekulární rychlostní konstanty této reakce se pohybují v rozmezí $2 \cdot 10^2 - 6 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a reakce probíhá přes reaktivní intermediát vznikající atakem atomu fosforu na síru S-1.



Hammettova korelace logaritmu bimolekulární rychlostní konstanty sulfurace *XXVa* proti σ konstantám substituentů na benzenovém jádře P(III) sloučenin poskytla pro substituované triarylfosfity hodnotu $\rho = -0,86$ a pro triarylfosfity $\rho = -1,10$. Interpretace těchto Hammettových reakčních konstant ρ ve smyslu distribuce náboje v tranzitním stavu vyžaduje vhodnou srovnávací reakční sérii. V literatuře bylo nalezeno pouze několik reakcí, při nichž fosfor vystupuje jako nukleofil nebo báze. Jednalo se o reakci aryldiethyl-fosfinů s ethyljodidem¹⁰² ($\rho = -1,0$) a elementární sírou¹⁰³ ($\rho = -2,5$) a o reakci triarylfosfinů i triaryl-fosfitů¹⁰⁴ s difenyl trisulfidem ($\rho = -1,1$). Námí zjištěné nízké hodnoty ρ pro sulfuraci *XXVa* tedy indikují v tranzitním stavu relativně malý vznik parciálního kladného náboje na atomu fosforu. Tomuto zjištění mohou odpovídat dvě mezní situace. Buď je rychlost určujícím krokem vznik obojetného intermediátu, přičemž v tranzitním stavu je vazba P–S ještě velmi slabá, anebo je rychlost určujícím krokem jeho rozpad a výsledná ρ konstanta odpovídá součtu ρ konstant obou kroků. Rozhodnutí bylo učiněno na základě měření aktivační entropie a ze závislosti rychlosti reakce na změně rozpouštědla.

Změřené vysoké negativní hodnoty aktivačních entropií ($\Delta S^\ddagger \approx -100 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) spolu se skutečností, že rychlost reakce jen málo závisí na rozpouštědle ukazují, že rychlost určujícím krokem je vznik uvedeného intermediátu.

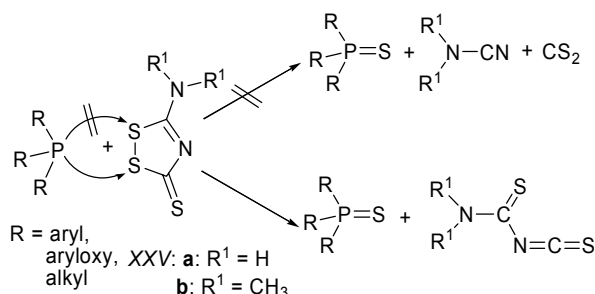


Schéma 8. Sulfurace P(III) sloučenin 3-amino-1,2,4-dithiazol-5-thionem

4. Závěr

Účelem studia reakčních mechanismů vzniku a transformace heterocyklických sloučenin je poznání detailního průběhu těchto reakcí, na jehož základě je možné optimalizovat podmínky přípravy a to jak z hlediska struktury výchozích látek, tak reakčního času. Na modelových derivátech chinazolinu, thiazolu imidazolu a 1,2,4-dithiazolu je demonstrováno, jak změny struktury, podmínek a katalyzátoru často vedou k velké změně reaktivity resp. i ke zcela odlišným reakčním produktům.

Autor děkuje všem svým spolupracovníkům, kteří se podíleli na vzniku citovaných prací, jejichž je spoluautorem, a dále děkuje Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za finanční podporu (Projekt MSM 002 162 7501).

LITERATURA

1. <http://www.cas.org/cgi-bin/regreport.pl>, staženo 14.1. 2008.
2. García-Valverde M., Torroba T.: *Molecules* 10, 318 (2005).
3. Pozharskii A. F., Soldatenkov A. T., Katritzky A. R.: *Heterocycles in Life and Society*. Wiley, New York 1997.
4. Balaban A. T., Oniciu D. C., Katritzky A. R.: *Chem. Rev.* 104, 2777 (2004).
5. Lee M. (ed.): *Heterocyclic Antitumor Antibiotics, Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol. 2*. Springer, Berlin 2006.
6. Eguchi S. (ed.): *Bioactive Heterocycles I, Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol. 6*. Springer, Berlin 2006.
7. Eguchi S. (ed.): *Bioactive Heterocycles II, Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol. 8*. Springer, Berlin 2007.
8. Khan M. T. H. (ed.): *Bioactive Heterocycles III, Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol. 9*. Springer, Berlin 2007.
9. Khan M. T. H. (ed.): *Bioactive Heterocycles IV, Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol. 10*. Springer, Berlin 2007.
10. Khan M. T. H. (ed.): *Bioactive Heterocycles V, Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol. 11*. Springer, Berlin 2007.
11. Polshettiwar V., Varma R. S.: *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 10, 723 (2007).
12. Tomlin C. D. S.: *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council, Farnham 2003.
13. Roberts T. R., Hutson D. H. (ed.): *Metabolic Pathways of Agrochemicals I,2*. RSC, Cambridge 1998.
14. Kuhn H., Robillard J.: *Nonlinear Optical Materials*. CRC Press Inc., Boca Raton 1991.
15. Pan H. Gao X., Zhang Y., Prasad P. N., Reinhardt B., Kannan R.: *Chem. Mater.* 7, 816 (1995).
16. Rao V. P., Jen A. K.-Y., Chandrasekhar J., Namboothiri I. N. N., Rathna A.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12443 (1996).
17. Albert I. D. L., Marks T. J., Ratner M. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6575 (1997).
18. Batista R. M. F., Costa S. P. G., Belsley M., Raposo M. M.: *Tetrahedron* 63, 9842 (2007).
19. Fusco S., Centore R., Riccio P., Quatela A., Stracci G., Archetti G., Kuball H.-G.: *Polymer* 49, 186 (2008).
20. Sienkowska M. J., Farrar J. M., Zhang F., Kusuma S., Heiney P. A., Kaszynski P.: *J. Mater. Chem.* 17, 1399 (2007).
21. Badgujar D. M., Talawar M. B., Asthana S. N., Mahulikar P. P.: *J. Hazard. Mat.* 151, 289 (2008).
22. Brown E. G.: *Ring Nitrogen and Key Biomolecules: The Biochemistry of N-Heterocycles*. Kluwer Academic Press, Dordrecht 1998.
23. Merino P.: *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* 1, 389 (2002).
24. Heron B. M.: *Heterocycles* 41, 2357 (1995).
25. Ikeda M., Yakura T.: *Heterocycles* 51, 1957 (1999).
26. Ho T.-L.: *Tandem Organic Reactions*. Wiley, New York 1992.
27. Paquette L. A., Stirling C. J. M.: *Tetrahedron* 48, 7383 (1992).
28. Majo V. J., Perumal P. T.: *J. Am. Chem. Soc.* 63, 7136 (1998).
29. Boger D., Weinreb S.: *Hetero Diels-Alder Methodology in Organic Synthesis*. Academic Press, Amsterdam 1987.
30. Boger D. L.: *Chem. Rev.* 86, 781 (1986).
31. Deiters A., Martin S. F.: *Chem. Rev.* 104, 2199 (2004).
32. van der Plas H. C.: *Advances in Heterocyclic Chemistry, Vol. 74*. Academic Press, San Diego 1999.
33. van der Plas H. C.: *J. Heterocycl. Chem.* 37, 427 (2000).
34. van der Plas H. C.: *Advances in Heterocyclic Chemistry, Vol. 84*. Academic Press, San Diego 2003.
35. Hajos G., Riedl Z., Kollenz.: *Eur. J. Org. Chem.* 2001, 3405.
36. Buscemi S., Vivona N.: *Heterocycles* 38, 2423 (1994).
37. Connors K. A.: *Chemical Kinetics: The Study of Reaction Rates in Solution*. VCH Publishers, New York 1990.
38. Shan D., Nicolau M. G., Borchardt R. T., Wang B.: *J. Pharm. Sci.* 86, 765 (1997).
39. Vinšová J., Imramovský A.: *Chem. Listy* 99, 21 (2005).
40. Gomes P., Vale N., Moreira R.: *Molecules* 12, 2484 (2007).
41. Rosoff M. (ed.): *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*. VCH Publishers, Weinheim 1989.
42. Page M. I.: *The Chemistry of Enzyme Action*. Elsevier, Amsterdam 1984.
43. Hanusek J., Hejtmánková L., Kubicová L., Sedlák

- M.: *Molecules* 6, 323 (2001).
44. Hanusek J., Sedlák M., Šimůnek P., Štěrba V.: *Eur. J. Org. Chem.* 2002, 1855.
 45. Hanusek J., Rosa P., Drabina P., Sedlák M.: *J. Heterocycl. Chem.* 43, 1281 (2006).
 46. Hanusek J., Sedlák M., Keder R., Štěrba V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 2212 (2004).
 47. Hanusek J., Šustr M., Kubanová P., Buchta V., Sedlák M.: *Folia Pharm. Univ. Carolinae XXIX/XXX*, 55 (2003).
 48. Hanusek J., Sedlák M., Jansa P., Štěrba V.: *J. Phys. Org. Chem.* 19, 61 (2006).
 49. Negver M., Scharnow H.-G.: *Organic-Chemical Drugs and Their Synonyms 1-5*. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
 50. Adams P., Baron F. A.: *Chem. Rev.* 65, 567 (1965).
 51. Štěrba V., Hrabík O., Kaválek J., Mindl J., Williams A.: *Org. Biomol. Chem.* 1, 415 (2003).
 52. Frost L. N., Hegarty A. F.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1973, 82.
 53. Hutchins J. E. C., Fife T. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 2282 (1973).
 54. Hegarty A. F., Frost L. N., Coy J. H.: *J. Org. Chem.* 39, 1089 (1973).
 55. Hanusek J., Svoboda J.: *Chem. Listy* 98, 851 (2004).
 56. Sedlák M., Hanusek J., Holčápek M., Štěrba V.: *J. Phys. Org. Chem.* 14, 187 (2001).
 57. Sprague K. M., Land A. H., v knize: *Heterocyclic Compounds* (Elderfield R. C., ed.), díl 5. Wiley, New York 1957.
 58. Jackson F. H., Peters A. T.: *J. Chem. Soc.* 1969, 268.
 59. Jirman J., Čermák J.: *Dyes Pigments* 10, 239 (1989).
 60. Sarkis G. Y., Faisal E. D.: *J. Heterocycl. Chem.* 22, 725 (1985).
 61. Gueremy C., Maillard F., Musch B. (Rhone-Poulenc Sante): EP 305276; *Chem. Abstr.* 111, 239500k (1989).
 62. Eshel Y. D., Sompolinsky D.: *Weed Res.* 10, 196 (1970).
 63. Allen R. L. M., Clark C. O., Davies R. R., Lapworth M., Miles L. W. C., Skelly J. K., Stead E., Wyles J. M., Wood W. E. (ed.): *Colour Index*, 3. vyd. Society of Dyers and Colourists, Bradford 1971.
 64. Gourley R. N. (Eastman Kodak Co.): USP 4052379 (C09B29/00).
 65. Sedlák M., Hejtmánková L., Hanusek J., Macháček V.: *J. Heterocycl. Chem.* 39, 1105 (2002).
 66. Sedlák M., Hanusek J., Hejtmánková L., Kašparová P.: *Org. Biomol. Chem.* 1, 1204 (2003).
 67. Hanusek J., Hejtmánková L., Štěrba V., Sedlák M.: *Org. Biomol. Chem.* 2, 1756 (2004).
 68. Gale E.: *Lancet* 357, 1870 (2001).
 69. Weplo P. J.: *Pestic. Sci.* 39, 293 (1990).
 70. Bernhart C. A., Perreaut P. M., Ferrari B. P., Muneaux Y. A., Assens J.-L. A., Clément J., Haudricourt F., Muneaux C. F., Taillades J. E., Vignal M.-E., Gougat J., Guiraudou P. R., Lacour C. A., Roccon A., Cazau-bon C. F., Brelière J.-C., Le Fur G., Nisato D.: *J. Med. Chem.* 36, 3371 (1993).
 71. Sedlák M., Hanusek J., Bina R., Kaválek J., Macháček V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 1629 (1999).
 72. Sedlák M., Drabina P., Hanusek J.: *Heterocycl. Commun.* 9, 129 (2003).
 73. Ojima I. (ed.): *Catalytic Asymmetric Synthesis*. Wiley-VCH, New York 2000.
 74. Pfaltz A.: *J. Heterocyclic Chem.* 36, 1437 (1999).
 75. Seyden-Penne J.: *Chiral Auxiliaries and Ligands in Asymmetric Synthesis*. Wiley-VCH, New York 1995.
 76. Mulzer J., Waldmann H. (ed.): *Organic Synthesis Highlights III*. Wiley-VCH, Weinheim 1998.
 77. Jacobsen E. N., Pfaltz A., Yamamoto H. (ed.): *Comprehensive Asymmetric Catalysis*. Springer, Heidelberg 1999.
 78. Sedlák M., Drabina P., Císařová I., Růžička A., Hanusek J., Macháček V.: *Tetrahedron Lett.* 45, 7723 (2004).
 79. Sedlák M., Drabina P., Keder R., Hanusek J., Císařová I., Růžička A.: *J. Organomet. Chem.* 691, 2623 (2006).
 80. Drabina P., Hanusek J., Jirásko R., Sedlák M.: *Trans. Metal Chem.* 31, 1052 (2006).
 81. Drabina P., Valenta P., Jansa P., Růžička A., Hanusek J., Sedlák M.: *Polyhedron* 27, 268 (2008).
 82. Evans D. A., Kozłowski M. C., Murry A. J., Burgey C. S., Campos K. R., Connell B. T., Staples R.: *J. Am. Chem. Soc.* 121, 669 (1999).
 83. Desimoni G., Faita G., Quadrelli P.: *Chem. Rev.* 103, 3119 (2003).
 84. Schubert U. S., Hofmeier H., Newkome G. R.: *Modern Terpyridine Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim 2006.
 85. Turský M., Nečas D., Drabina P., Sedlák M., Kotora M.: *Organometallics* 25, 901 (2006).
 86. Nečas D., Drabina P., Sedlák M., Kotora M.: *Tetrahedron Lett.* 48, 4539 (2007).
 87. Hanusek J., Verner J., Potáček M.: *Heterocycles* 71, 903 (2007).
 88. Tang J.-Y., Han Z., Tang J. X., Zhang Z.: *Org. Proc. Res. Dev.* 4, 194 (2000).
 89. Kamer P. C. J., Roelen H. C. P. F., van den Elst H., van der Marel G. A., van Boom J. H.: *Tetrahedron Lett.* 30, 6757 (1989).
 90. Iyer R. P., Phillips L. R., Egan W., Regan J. B., Beaucage S. L.: *J. Org. Chem.* 55, 4693 (1990).
 91. Vu H., Hirschbein B. L.: *Tetrahedron Lett.* 32, 3005 (1991).
 92. Rao M. V., Reese C. B., Zhao Z.: *Tetrahedron Lett.* 33, 4839 (1992).
 93. Stec W. J., Uznanski B., Wilk A.: *Tetrahedron Lett.* 34, 5317 (1993).
 94. Rao M. V., Macfarlane K.: *Tetrahedron Lett.* 35, 6741 (1994).
 95. Efimov V. A., Kalinkina A. L., Chakhmakheva O. G., Hill T. S., Jayaraman K.: *Nucleic Acids Res.* 23, 4029 (1995).

96. Xu Q., Musier-Forsyth K., Hammer R. P., Barany G.: *Nucleic Acids Res.* 24, 1602 (1996).
97. Zhang Z., Nichols A., Tang J. X., Han Y., Tang J.-Y.: *Tetrahedron Lett.* 40, 2095 (1999).
98. Sinha N. D., Kuchimanchi S. N., Miranda G., Shaikh S.: *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem.* 45, 2297 (2006).
99. Hanusek J., Russel M. A., Laws A. P., Page M. I.: *Tetrahedron Lett.* 48, 417 (2007).
100. Spurlock L. A., Newallis P. E.: *J. Org. Chem.* 33, 2073 (1968).
101. Hanusek J., Russell M. A., Laws A. P., Jansa P., Atherton J. H., Fettes K., Page M. I.: *Org. Biomol. Chem.* 5, 478 (2007).
102. Davies W. C., Lewis W. P. G.: *J. Chem. Soc.* 1934, 1599.
103. Bartlett P. D., Meguerian G.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3710 (1956).
104. Hall C. D., Tweedy B. R., Kayhanian R., Lloyd J. R.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1992, 775.

J. Hanusek (*Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice*):
A Contribution to Study of Formation and Transformation of Some Five- and Six-membered Heterocyclic Compounds Containing Nitrogen and Sulfur

This article deals with the problems of synthesis, studies of formation and reactivity of some five and six membered heterocyclic compounds containing nitrogen and sulfur particularly derivatives of quinazoline, imidazole, thiazole and 1,2,4-dithiazole. These compounds, synthesised from simple precursors, form an extensive and always topical area of research in organic chemistry.

**VŠCHT Praha přijme pracovníka na pozici laboranta/ky
pro Ústav analytické chemie.**

Požadavky: středoškolské vzdělání, praxe v oboru

Nástup: 1. 1. 2009

Velikost úvazku: 40 hodin týdně

Příhlašku včetně životopisu s přehledem dosavadní pracovní činnosti zašlete do 30. 11. 2008 na adresu:
pavla.vlckova@vscht.cz

Kontakt: prof. RNDr. Štěpán Urban, CSc., tel. 220 444 267, Stepan.Urban@vscht.cz

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ KONCENTRACE PRODUKTU GENU *Reg-1 α* V SÉRU NOVOU METODOU ELISA

DAVID STEJSKAL^a, MICHAL KARPÍŠEK^b,
MAREK ŠVESTÁK^a a HELENA REUTOVÁ^c

^a Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk o.z.,
Středomoravská nemocniční a.s., ^b Veterinární a farmaceutická
Univerzita Brno, ^c Biovendor Brno
david.stejskal@nemstbk.cz, michal.karpisek@email.cz,
reutova@biovendor.cz

Došlo 1.10.07, přijato 10.1.08.

Klíčová slova: metabolický syndrom, ELISA, *Reg-1 α* ,
protilátka, akutní koronární syndrom

Úvod

V roce 1984 byl objeven nový gen, který hraje pravděpodobně významnou roli při regeneraci řady tkání¹. Nedávno bylo prokázáno, že tento tzv. *Reg* gen hraje významnou roli v regeneraci tkáně myokardu, kdy byla v experimentu po poškození myokardu zjištěna transkripční aktivace *Reg-1 α* v myokardu jako odpověď na myokardiální stres^{1–3}. Také u experimentálně vyvolaného infarktu myokardu byla zjištěna v cytoplasmě kardiomyocytů zvýšená exprese genu pro *Reg-1 α* (i jeho receptoru) a současně byla u těchto jedinců nalezena vyšší koncentrace *Reg-1 α* proteinu v séru ve srovnání s jedinci s konstrikcí aorty. Je možné, že systém „*Reg*“ hraje významnou roli jako protektivní ukazatel proti účinku akutního srdečního stresu. Vznikla tedy hypotéza, že stanovení proteinu *Reg-1 α* by mohlo být zajímavým ukazatelem přítomnosti vyššího koronárního rizika³.

Experimentální studie také prokázaly, že by *Reg-1 α* mohl být ukazatelem extrémního stresu obecně. Jelikož je obezita, resp. metabolický syndrom významným stresovým stimulem, který vede k řadě tkáňových komplikací (např. kardiovaskulární či cerebrovaskulární choroby, diabetes mellitus, hypertenze, autonomní vegetativní dysfunkce), vznikly proto hypotézy o možném diagnostickém využití stanovení *Reg-1 α* v diagnostice metabolického syndromu.

Naším cílem v předkládané práci byl vývoj, validace a klinické testování soupravy ELISA pro specifické stanovení sérové koncentrace lidského *Reg-1 α* .

Experimentální část

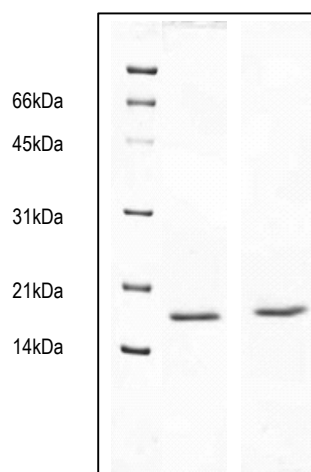
Příprava rekombinantního lidského *Reg-1 α*

Sekvence mRNA *Reg-1 α* byla získána z databáze RefSeq (Accession Number NM_00209); příslušná sekvence byla syntetizována a optimalizována pro *E.coli*. Syntetický gen byl klonován do restričních míst expresního vektoru pET21 (Novagen) a provedena transformace bakteriálního kmene *E.coli* BL21DE3. Produkční kmen byl kultivován při teplotě 37 °C a exprese rekombinantního proteinu byla indukována isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG, Sigma). Po rozbití produkční kultury ultrazvukem byl ze supernatantu izolován gelovou chromatografií rekombinantní *Reg-1 α* .

Protein byl dialyzován do prostředí 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,2), čistota proteinu analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (14% homogenní gel, SDS PAGE, obr. 1) a koncentrace bílkoviny stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma, katalogové číslo BCA1-1KT).

Příprava specifických protilátek proti lidskému *Reg-1 α*

Byla připravena králičí protilátka podle imunizačního schématu: dávka vždy 0,2 mg proteinu pro imunizaci králí-



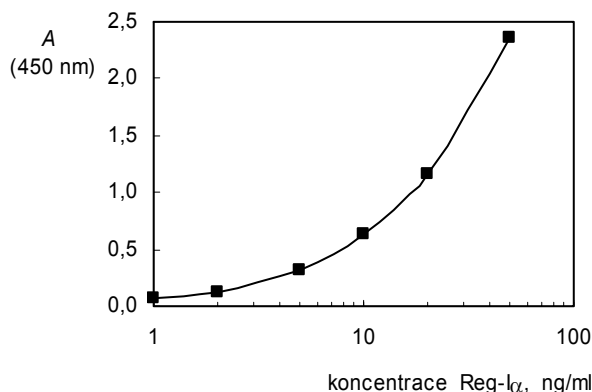
Obr. 1. Čistota rekombinantního lidského *Reg-1 α* byla ověřena elektroforézou (14% homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). Zleva: 1 – proteinový standard; 2 – rekombinantní lidský *Reg-1 α* v redukčním prostředí; 3 – rekombinantní lidský *Reg-1 α* v neredukčním prostředí. Čistota proteinu je vyšší než 95 %

ka; první dávka byla v kompletním Freundově adjuvans a následně 2 dávky v inkompletním Freundově adjuvans. Z připraveného antiséra byla izolována specifická protilátka imunoafinitní chromatografií na koloně s imobilizovaným rekombinantním Reg-I α , imunosorbent byl připraven podle návodu od výrobce (POROS-AL, Applied Biosystems, katalogové číslo 1-6022-24). Čistota protilátek byla stanovena elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (12% homogenní gel, SDS PAGE), celková koncentrace bílkoviny byla stanovena metodou BCA. Část králičí protilátky byla značena křenovou peroxidasou (Peroxidase activated, Roche, katalogové číslo 11 428 861 001) podle návodu od výrobce.

Vývoj sendvičové ELISA pro stanovení Reg-I α v lidském séru

V mikrotitrační desce (Corning Costar, High Binding, katalogové číslo 52-00-02) bylo vázáno 0,2 μ g protilátky/jamku v 0,1 M karbonátovém pufru pH 9,0 (inkubace 12 h při 4 °C). Deska byla poté jednou promyta promývacím roztokem TBS-Tw (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; 0,05% (w/v) Tween 20) na promývače Columbus (Tecan, Inc.). Nevyužitá vazebná místa byla zablokována 0,3 ml/jamku roztoku TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2), 0,5% (w/v) BSA (hovězí sérový albumin), 4% sacharosa a deska byla inkubována 30 min při 25 °C. Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo ředěného sérového vzorku (všechna měření byla prováděna 2 \times). Následně byla deska inkubována 1 h při laboratorní teplotě (25 °C). Po 3-násobném promytí desky promývacím roztokem (TBS, 0,05% Tween 20, pH 7,2) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml specifické protilátky značené křenovou peroxidasou (0,06 mg l⁻¹) a deska opět inkubována 1 h při laboratorní teplotě. Po 3-násobném promytí desky promývacím roztokem bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetrametylbendidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována 10 min při laboratorní teplotě (25 °C). Reakce byla zastavena přidáním 0,1 M roztoku kyseliny sírové a vzniklé žluté zbarvení (produkt) bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm. Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Hodnoty Reg-I α v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 2), která byla získána vynesemím absorbancí standardů oproti jejich známé koncentraci.

Ředícím roztokem pro standardy a vzorky byl roztok TBS 0,05% Tween 20, 0,05% (w/v) želatina, ředícím roztokem pro protilátku značenou křenovou peroxidasou byl roztok StabilZyme-HRP (SurModics, katalogové číslo SZ02). V testu byla použita sada standardů 50, 20, 10, 5, 2 a 1 μ g l⁻¹, připravená naředěním rekombinantního lidského Reg-I α . Sérové vzorky byly ředěny 50 \times podle schématu 1 díl vzorku + 49 dílů ředícího roztoku.



Obr. 2. Standardní kalibrační křivka byla sestavena s použitím 4-parametrové funkce

Klinické testování metody ELISA

Byly vyšetřeny tři skupiny osob:

- V první skupině bylo testováno 38 pacientů přijatých na interní oddělení pro podezření na akutní koronární syndrom (AKS). U těchto jedinců byl po příjmu, za 2 a 6 hodin stanoven srdeční troponin I (cTnI, metoda LEIA, přístroj Immulite, výrobce DPC), myoglobin (metoda LAT, přístroj Advia1650, výrobce Denka Seiken), C-reaktivní protein (CRP, metoda LAT, přístroj Advia 1650, výrobce Biovendor) a Reg-I α (ELISA, ELISA linka Marc-Max, výrobce Biovendor). Diagnóza AKS byla sestavena na základě kritérií AHA-ESC/ACC (cit.⁴),
- ve druhé skupině bylo vyšetřeno asymptomatických 60 pacientů ve vysokém kardiovaskulárním riziku (39 mužů, 21 žen). U všech byla provedena jednofotonová emisní počítačová tomografie myokardu (SPECT) po standardizované zátěži. Latentní forma myokardiální ischemie byla definována jako pozitivita nálezu na SPECT. U všech jedinců byla odebrána krev před zátěží, při subjektivním maximu, po 30 a 60 min po ukončení zátěže. V krvi byl stanoven Reg-I α výše uvedenou metodou,
- ve třetí studii bylo vyšetřeno 14 neobézních osob bez známek metabolického syndromu a 15 obézních jedinců s metabolickým syndromem. Metabolický syndrom byl diagnostikován na základě kritérií National Education Program's Adult Treatment Panel III Report (NCEP-ATP) (cit.⁵). U všech osob byl změřen v séru insulin (metoda LEIA, Immulite 2000, výrobce DPC), cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceridy, kyselina močová, glukosa (enzymové metody, Advia 1650, výrobce Biovendor) a Reg-I α .

Reg-I α byl stanoven ve všech případech ze séra. Po odběru byl každý vzorek ponechán po dobu 30 min

v pokojové teplotě. Poté byly vzorky centrifugovány (10 min, 1100 g, 4 °C) a následně zmrazeny při –80 °C. Reg-Ia byl stanoven ve všech případech do 3 měsíců po odběru materiálu po předchozí adaptaci na pokojovou teplotu (25 °C). Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech.

Výsledky a diskuse

Funkční charakteristika ELISA

Nebyla zjištěna zkřížená reaktivita této ELISA s lidskými rekombinantními proteiny Reg-I β (Biovendor); PAP (Biovendor) a Reg-IV (Biovendor) při koncentraci antigenů 50 $\mu\text{g l}^{-1}$. Současně nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita v sérech následujících zvířat: králík, koza, ovce, prase, myš, kůň, křeček, tur, kočka, pes a krysa. Silná křížová reaktivita byla naměřena pouze s opičím sérem.

Pro ověření funkčnosti Reg-I α ELISA byla testována také správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku a testem diluční linearit. Pro test standardního přídatku byly použity vzorky lidského séra od dvou pacientů o původní koncentraci Reg-I α 160 a 265 $\mu\text{g l}^{-1}$, které byly obohaceny o rekombinantní Reg-I α (+250, +500 a +750 $\mu\text{g l}^{-1}$) a otestovány. Průměrný výtěžek byl 101 %. Diluční linearita byla otestována na dvou dalších sérových vzorcích o koncentraci Reg-I α 345 a 595 $\mu\text{g l}^{-1}$. Průměrný výtěžek byl 100,1 %.

Přesnost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků u 3 sérových vzorků a vyjádřena jako variační koeficient (CV) v sérii (intra-assay; $n=7$) a reprodukovatelnost mezi sériemi měření (inter-assay; $n=10$). Hodnota variačního koeficientu byla ve všech případech menší než 9 %.

Mez stanovitelnosti metody, představující nejnížší stanovitelnou koncentraci Reg-I α , byla 0,094 $\mu\text{g l}^{-1}$ (tato hodnota je vyjádřením koncentrace Reg-I α , odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku ($n=8$) + 3 \times směrodatná odchylka průměru slepého vzorku). Mez detekce vypočítaná podle vzorce: 0,094 \times 50 (ředicí faktor vzorků) byla 4,8 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Klinické testování metody ELISA

a) Hodnoty Reg-I α vykazovaly u pacientů s akutním koronárním syndromem nenormální rozložení ($n=7$; medián 773,2 $\mu\text{g l}^{-1}$) a významně se nelišily od hodnot pacientů bez známek AKS ($n=28$; medián 679,7 $\mu\text{g l}^{-1}$; $P=0,67$). Současně hodnoty Reg-I α korelovaly významně s myoglobinem ($r=0,49$; $P<0,01$) a CRP ($r=0,67$; $P<0,01$). Korelace s CRP přetrvávala i po korekci na sérovou hodnotu kreatininu ($r=0,57$; $P<0,01$). Při použití krokové regrese nebyly do mode-

lu jako nezávislé proměnné zahrnutý věk ani myoglobin. Regresní rovnici lze vyjádřit jako:

$$\text{Reg-I} = 8,7 * \text{kreatinin} + 19,4 * \text{CRP} - 965,5 * \text{cTnI} - 354,5$$

(F ratio 22,1; $P<0,01$) (cit.⁶).

- b) Ve druhé studii mělo 14 osob latentní myokardiální ischemii; u 46 nebyly známky poškození myokardu zjištěny. Obě skupiny se však v hodnotách Reg-I α nelišily ani v jednom z náběrů (průměrné mediány Reg-I α činily 527,2 vs. 552,3 $\mu\text{g l}^{-1}$; $P=0,59$) (cit.⁷).
- c) Ve třetí studii bylo vyšetřeno 29 osob (18 mužů a 11 žen). 14 z nich byly zdravé osoby (8 mužů, 6 žen), 15 z nich trpělo metabolickým syndromem (9 mužů, 6 žen). Hodnoty Reg-I α v séru se významně nelišily mezi osobami zdravými a jedinci s metabolickým syndromem (mediány 550,7 vs. 442,3 $\mu\text{g l}^{-1}$; $P=0,51$) a korelovaly pozitivně pouze s hodnotami glykémie ($r=0,25$; $P=0,03$) a věku ($r=0,38$; $P<0,01$). Korelace mezi Reg-I α a hodnotou glukosy v séru přetrvávaly i po adjustaci Reg-I α na věk ($r=0,23$; $P<0,01$) (cit.⁸).

Závěrem ke klinickému testování pro validaci metody v séru lze říci, že nebyly potvrzeny hypotézy o možném rutinním diagnostickém využití Reg-I α v séru v diagnostice metabolického syndromu, obezity nebo myokardiální ischemie. Z prvních výsledků však vyplývá, že by měly následovat další studie, které by měly vysvětlit nalezenou souvislost mezi glykemií a Reg-I α a možná hledat další význam tohoto parametru jako prediktoru předčasné aterosklerózy nebo poruchy glukosové tolerance.

LITERATURA

1. Fukui H., Fujii S., Takeda J., Kayahara T., Sekikawa A., Nanakin A., Suzuki K., Hisatsune H., Seno H., Sawada M., Fujimori T., Chiba T.: *Digestion* 69, 177 (2004).
2. Sanchez D., Gmyr V., Kerr-Conte J., Kloppel G., Zenilman M. E., Guy-Crotte O., Pattou F., Figarella C.: *Pancreas* 29,14 (2004).
3. Kiji T., Dohi Y., Takasawa S., Okamoto H., Nonomura A., Taniguchi S.: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, 277 (2005).
4. Klocke J. F.: *ACC/AHA/ASNC Guidelines for the Clinical Use of Cardiac Radionuclide Imaging. V: ACC/AHA Practice Guidelines* (2003).
5. Grundy S. M., Cleeman C. J. I., Daniels S. R., Donato K. A., Eckel R. H., Franklin B. A., Gordon D. J., Krauss R. M., Savage P. J., Smith S. C., Spertus J. A., Costa F.: *Circulation* 112, 2735 (2005).
6. Stejskal D., Lacnak B., Karpíšek M., Kamínek M.: *Biomed. Papers* 150, 239 (2006).
7. Stejskal D., Karpíšek M., Horáková D., Čížek L., Janoutová G., Janout V.: *Bratisl. Med. J.* 108, 138 (2007).

D. Stejskal^a, M. Karpíšek^b, M. Švesták^a, and H. Reutová^c (^a *Department of Laboratory Medicine, Šternberk Hospital, Šternberk*, ^b *Pharmaceutical and Veterinary University, Brno*, ^c *Biovendor Brno*): **Determination of Serum Concentration of Gene Reg-I α Product by a New ELISA Method**

In recent few years several papers have dealt with the need for a new sensitive test for myocardial ischemia, which would allow an early and efficient therapeutic inter-

vention. A promising laboratory marker seems to be serum Reg-I α . An ELISA method for the Reg-I α determination in serum is described and validated and its diagnostic utility is discussed. However, the serum Reg-I α values in individuals with metabolic syndrome and latent or acute myocardial ischemia did not significantly differ from those in healthy people. First results of clinical testing did not confirm the hypotheses on the use of this serum parameter for diagnosis of acute myocardial or metabolic syndromes.

ŠTÚDIUM EXTRACELULÁRNEJ A IMOBILIZOVANEJ SACHARÁZY NÁPRSTNÍKA

JÁN STANO^a, BEATE DIETRICH^c, KAROL
MIČIETA^d, VÍŤAZOSLAVA BLANÁRIKOVÁ^b
a MARCELA KOREŇOVÁ^a

^a Záhrada liečivých rastlín, ^b Katedra molekulárnej
a subcelulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta
Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava

^c Ústav farmaceutickej biológie Univerzity Martina Luthe-
ra, Hoher Weg 8, 06120 Halle

^d Katedra botaniky, Prírodovedecká fakulta Univerzity
Komenského, Révová 39, 811 02 Bratislava
micieta@fns.uniba.sk, korenova@fpharm.uniba.sk,
beate.dietrich@pharmazie.uni-halle.de

Došlo 20.2.07, prepracované 13.11.07, prijaté 15.12.07.

Kľúčové slová: distribúcia, imobilizácia, permeabilizácia,
náprstník, *Digitalis*, sacharáza

Úvod

Glykozidázy sa podieľajú na významných biologických procesoch ako trávenie, anabolizmus glykoproteínov a katabolizmus glykokonjugátov. Biotechnologické procesy predstavujú alternatívnu cestu pre získanie mnohých, teraz už limitovaných biologicky aktívnych látok. Poznatky o totipotencii a zvládnutie kultivačných techník sa úspešne aplikovali v poľnohospodárstve pri mikropropagácii rastlín¹.

Totipotencia je vlastnosť somatickej bunky niest' kompletnú genetickú informáciu potrebnú pre vývin celej rastliny. Každá živá bunka, pletivo a orgán predstavujú teda potenciálny základ pre vytvorenie celého rastlinného organizmu².

Pri biosyntéze a biotransformácii prírodných látok sa využíva celý rad multifunkčných enzýmových komplexov. Kvalita potravín je vo veľkej miere podmienená a závislá na kvalite, kvantite, štruktúre a fyzikálno-chemických vlastnostiach peptidov, cukrov a iných zložiek potravín. Biotransformácia takýchto látok hrá dôležitú úlohu v rôznych biotechnologických procesoch^{1–4}. Zistilo sa, že cukry a glykozidázy majú dôležitú úlohu v rôznych oblastiach základného a aplikovaného výskumu^{5–7}.

Voľné alebo imobilizované enzýmy, prípadne živočíšne alebo rastlinné bunky, reprezentujú dôležitú cestu produkcie účinných enzýmových katalyzátorov aplikovateľných v celom rade technologických procesov⁷.

Rastlinné bunky imobilizoval prvý raz Brodelius⁸. Obaľovanie (enkapsulácia) buniek a enzýmov hydrogélmi

reprezentuje frekventovanú imobilizačnú techniku. Kovalentnú väzbu buniek na povrch nosičov, ako aj spontánnu adhéziu, popísali viacerí autori^{9–11}. Tvorba bunkových agregátov, ako aj stupeň diferenciácie buniek v suspenznej kultúre, sú z biotechnologického hľadiska veľmi dôležité.

Sacharáza (β -D-fruktofuranozidáza EC 3.2.1.26), nazývaná aj invertáza, katalyzuje hydrolýzu sacharózy na glukózu a fruktózu. Študovaný enzým sa využíva aj pri výrobe invertných sacharidov (zo sacharózy) s následnou možnosťou prípravy fruktózových prípravkov¹².

Vývoj imobilizačných techník, dôkaz a stanovenie aktivity biokatalyzátorov je úzko spojený s progresom biotechnologických procesov^{7,10}. Vzhľadom na to, že membrány bunky sú hlavnou bariérou transportu mnohých látok, zamerali sme svoju pozornosť na ich permeabilizáciu. Predpokladáme, že imobilizované bunky alebo biokatalyzátory rastlinného pôvodu, podobne ako mikrobiálne, môžu v budúcnosti zohrať dôležitú úlohu v biotechnologických procesoch^{7,13}. V predloženej práci sa študoval vplyv permeabilizácie na enzýmovú hydrolýzu sacharózy pomocou imobilizovaných buniek náprstníka a distribúcia intra- a extracelulárnej sacharózy testovaných buniek.

Dostupnosť jednoduchej a rýchlej skríningovej metódy detekcie sacharózy má veľký význam pre vedeckovýskumné a technologické účely.

Experimentálna časť

Rastlinný materiál

Suspenzné kultúry náprstníka vlnatého (*Digitalis lanata* Ehrh.) sa pestovali v kultivačnom médiu podľa Murashigeho a Skooga¹⁴, modifikovaného Diettrichovou a spol.¹⁵ na rotačnej trepačke (80 rpm min⁻¹) pri 25 °C a difúznom osvetlení v priebehu 10 dní.

Permeabilizácia buniek

15 g suspenzne pestovaných buniek sa po odfiltrovaní a premytí 1 l 0,15 mol l⁻¹ NaCl permeabilizovalo 50 ml: 5% Tweenom 20, 5% Tweenom 80, 30% etanolom, 50% etanolom, 0,1% hexadecyltrimetylamoniumbromidom, 0,1% hexadecylpyridiniumchloridom resp. 3 hodiny za pomalého miešania (60 rpm) pri laboratórnej teplote. Permeabilizované bunky sa po premytí 2,5 l destilovanej vody a 3 l 0,15 mol l⁻¹ NaCl imobilizovali glutaraldehydom.

Imobilizácia buniek glutaraldehydom

15 g permeabilizovaných buniek sa vložilo do 50 ml 0,15 mol l⁻¹ NaCl, pomaly sa pridalo 5 ml 25% glutaraldehydu a pri laboratórnej teplote sa za pomalého miešania (60 rpm) imobilizovali 2 hodiny. Imobilizované bunky sa premyli 2,5 l destilovanej vody, 3 l 0,15 mol l⁻¹ NaCl a uchovávali v 0,15 mol l⁻¹ NaCl pri 4 °C.

Stanovenie čerstvej hmotnosti a sušiny

Čerstvá hmotnosť a sušina suspenznej kultúry

a imobilizovaných buniek sa stanovili gravimetricky po vysušení do konštantnej hmotnosti pri 105 °C.

Využitie glukózy

Využitie glukózy suspenznými a imobilizovanými bunkami sa sledovalo

60 minút. Bunky suspenzných kultúr a imobilizované bunky sa preniesli do roztoku glukózy 200 mg l⁻¹ v 0,05 mol l⁻¹ Na-fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,0 a úbytok glukózy sa sledoval podľa Trindera¹⁶.

Životaschopnosť buniek

Životaschopnosť buniek sa sledovala podľa Dixona¹⁷ za použitia trifenylnitrazóliumchloridu (TTC), fluoresceín-diacetátu a kyslíkovej elektródy.

Dôkaz a stanovenie intra- a extracelulárnej sacharázy

Pri štúdiu aktivity intra- a extracelulárnej sacharázy sa použil prirodzený substrát sacharóza. Ako zdroj intracelulárnej sacharázy sa použili bunky suspenznej kultúry, pričom kultivačné médium slúžilo ako zdroj extracelulárnej sacharázy. Suspenzne kultivované bunky sa po odfiltrovaní na silónovej tkanine (10 g) premyli 2,5 l destilovanej vody. 15 g takto premytých buniek sa zhomogenizovalo vo vychladenej trecej miske s 15 ml 0,1 mol l⁻¹ Mc Ilvainovým tlmivým roztokom pH 4,6 pri 4 °C. Homogenát sa prefiltroval, odcentrifugoval (10 min, 15 000 g pri 4 °C) a použil na stanovenie aktivity intracelulárnej sacharázy.

Pri dôkaze a stanovení extracelulárnej sacharázy sa použilo kultivačné médium bez buniek, ktoré sa odstránili centrifugáciou (10 min, 15 000 g pri 4 °C).

Stanovenie aktivity enzýmu

Enzýmová aktivita sa sledovala modifikovanou metódou podľa Trindera¹⁶ pomocou testovacích prúžkov na stanovenie glukózy (Intes Poprad s r.o., Slovenská republika) a meracieho prístroja Accutrend (fy F. Hoffmann – La Roche Ltd., Nemecko).

Reakčná zmes obsahovala vhodné množstvo enzýmového preparátu (0,1–0,3 ml), sacharózu (6 mmol l⁻¹) v celkovom objeme 2 ml 0,1 mol l⁻¹ Mc Ilvainovho tlmivého roztoku pH 4,6. Zmes sa inkubovala 60 min pri 30 °C. V kontrolnom pokuse sa použil tepelne inaktivovaný enzýmový preparát (10 min pri 100 °C).

Na testovací prúžok sa aplikovalo požadované množstvo inkubačnej zmesi (40 µl) a pomocou meracieho prístroja Accutrend sa stanovila koncentrácia glukózy uvoľnenej enzýmovou hydrolyzou sacharózy. Enzýmová aktivita je vyjadrená v kataloch (označuje sa skratkou kat). Enzýmový preparát má aktivitu 1 kat, ak je schopný pri nasýtení substrátom za definovaných podmienok (teplota, pH, zloženie a koncentrácia) za prítomnosti aktivátorov a neprítomnosti inhibítorov premeniť 1 mol substrátu za 1 sekundu. Katal je pomerne veľká jednotka a preto sa často používajú odvodené jednotky ako nanokatal (nkat), mikrokatal (µkat) a pod. Uvádzané výsledky sú aritmetickým priemerom z piatich paralelných stanovení a hodnotene

né v rozsahu špecifickosti, citlivosti a reprodukovateľnosti uvedenej metódy kvantifikácie glukózy. Jej výhodou je jednoduchosť a rýchlosť stanovenia.

Stanovenie proteínov

Obsah proteínov sa stanovil podľa Doumasy a spol.¹⁸ za použitia hovädzieho sérumalbumínu ako štandardného proteínu.

Stanovenie efektu glukózy, fruktózy a galaktózy na aktivitu sacharázy

Efekt glukózy, fruktózy a galaktózy na aktivitu sacharázy v bunkách suspenzných kultúr a imobilizovaných bunkách sa testoval pri koncentráciách 1, 5, 10, 20 mmol l⁻¹ študovaných cukrov.

Sledovanie vplyvu pH na aktivitu sacharázy

Vplyv pH na aktivitu sacharázy sa testoval v rozsahu pH 4,2–5,6 v 0,1 mol l⁻¹ Mc Ilvainovho tlmivého roztoku.

Stabilita enzýmu v imobilizovaných bunkách

Stabilita sacharázy v priebehu uchovávaní buniek sa sledovala nasledovne: imobilizované bunky sa uchovávali pri 4 °C v 0,15 mol l⁻¹ NaCl s prídavkom týchto konzervačných látok: a) chloramfenikol 50 mg l⁻¹, b) chlór-tetracyklíniumchlorid (CLCTC) 50 mg l⁻¹, c) (1-metyldodecyl) dimetylamin N-oxid (ATDNO) 100 mg l⁻¹ (cit.²⁰). Imobilizované bunky sa uchovávali aj v dehydratovanej forme po ich vysušení pri laboratornej teplote v uzavretých nádobách. Vysušené bunky pred použitím nabobtnávali 1 h v 0,15 mol l⁻¹ NaCl.

Výsledky a diskusia

Rozvoj imobilizačných techník má veľký vplyv na vývoj biotechnológií. Imobilizácia buniek resp. biokatalyzátorov predstavuje veľmi dôležitý spôsob uchovávaní (stabilizácie) vysoko účinných biokatalyzátorov (enzýmov), ktoré sú dôležité pre biotransformačné procesy^{7,10,19}.

Pri histochemickom a biochemickom štúdiu hydrolytických enzýmov sa výhodne aplikujú rôzne chromogénne substráty^{10,19}. Pretože chromogénne substráty (4-nitrofenyl-β-D-fruktofuranozid a 1-naftyl-β-D-fruktofuranozid) neboli pripravené, pri štúdiu sacharázy sa používal prirodzený substrát – sacharóza. Pri štúdiu intracelulárnej frakcie sa použil enzýmový preparát pripravený homogenizáciou suspenzne kultivovaných buniek náprstníka (po 10 dňoch kultivácie). Kultivačné médium (bez buniek) sa použilo pri dôkaze a stanovení intracelulárnej frakcie sacharázy. Distribúcia intra- a extracelulárnej sacharázy je prezentovaná v tab. I.

Prevažná časť (88,4 %, intracelulárna sacharáza) je lokalizovaná v bunkách suspenznej kultúry. Minoritná časť (11,6 %) sa exkretuje do média (extracelulárna sacharáza). Špecifická aktivita intracelulárnej sacharázy je 4,5×

Tabuľka I

Aktivita sacharázy v 10-dňových bunkách suspenznej kultúry náprstníka a v kultivačnom médiu

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g ⁻¹ čerstvej hmotnosti]	Aktivita [nkat g ⁻¹ čerstvej hmotnosti]	Špecifická aktivita [nkat mg ⁻¹ proteínov]
Intracelulárna aktivita (homogenát izolovaných buniek)	0,2	0,63 ± 0,06	18,3 ± 0,36	28,2
Extracelulárna aktivita (kultivačné médium bez buniek) ^a	1,0	0,38 ± 0,05	2,4 ± 0,25	6,3

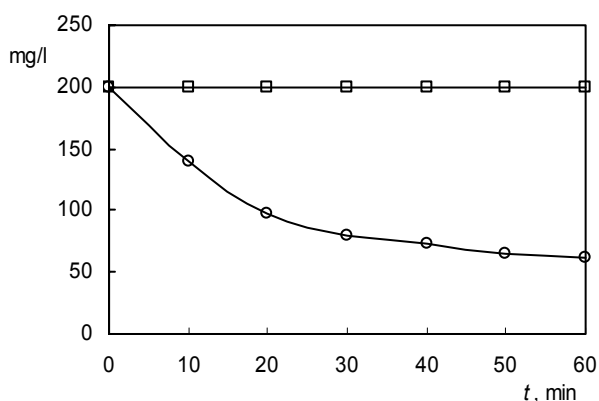
^a Zodpovedajúca obsahu izolovaných buniek

vyššia ako špecifická aktivita extracelulárnej sacharázy. Pri porovnaní distribúcie intra- a extracelulárnej aktivity galaktozidázy a sacharázy možno konštatovať, že bunky suspenzných kultúr exkretujú do kultivačného média oveľa menej sacharázy ako galaktozidázy²¹.

Glutaraldehydom imobilizované bunky nevyužívajú glukózu (obr. 1) a nie sú životaschopné – nevykazujú respiračnú aktivitu a nefarbia sa fluoresceínom a ani 2,3,5-trifenylnitrotetrazóliumchloridom.

Pri permeabilizácii buniek náprstníka Tweenom 20, Tweenom 80, etanolom, hexadecyltrimetylamoniombromidom a hexadecylpyridiniumchloridom dochádza k preukaznému poklesu proteínov. Aktivita študovaného enzýmu s výnimkou aplikácie etanolu mierne stúpa; špecifická aktivita enzýmu sa zvyšuje vo všetkých prípadoch. Pri permeabilizácii kvasiniek na rozdiel od buniek náprstníka dochádza k preukaznému vzostupu aktivity fenylalaninamoniaklyázy (PAL)²². Pri zosieťovaní buniek glutaraldehydom dochádza k poklesu enzymovej aktivity (tab. II).

V imobilizovaných a životaschopných bunkách má sacharáza pH optimum pri 4,6 a pri pH 5,4 (obr. 2). Dve pH optimá sacharázy zistili aj u mikroorganizmov²³.



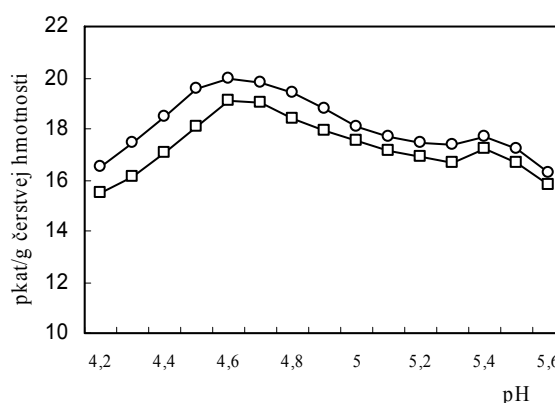
Obr. 1. Časový priebeh využitia glukózy v bunkách náprstníka imobilizovaných glutaraldehydom a v bunkách suspenznej kultúry; 10 g buniek, 20 ml tlmivého roztoku s glukózou, □ glutaraldehyd, ○ suspenzná kultúra

Enzymová hydrolyza sacharózy má lineárny priebeh 4 h, dosahuje 63 % konverzie substrátu a potom sa zastavuje. Tepelné optimum imobilizovaných buniek je pri 50 °C a buniek suspenznej kultúry pri 45 °C (obr. 3). V porovnaní s α -galaktozidázou sú tieto hodnoty oveľa nižšie²⁴.

Sacharóza je pravdepodobne najčastejším zdrojom uhlíka a energie pri kultivácii pletivových a suspenzných kultúr^{14,25}. V predloženej práci sme sledovali vplyv glukózy, fruktózy a galaktózy na aktivitu sacharázy vo vitálnych a imobilizovaných bunkách. Prítomnosť glukózy a fruktózy aktivitu testovanej hydrolyzy mierne inhibuje, zatiaľ čo galaktóza aktivuje (tab. III).

Hamilton a spol.²⁵ zistili, že pri využití sacharózy rastlinnými pletivovými kultúrami sa tento sacharid najskôr enzymovo transformuje na glukózu a fruktózu. Obsah oboch sacharidov v kultivačnom médiu je v prvých dňoch po inokulácii približne rovnaký. V prítomnosti glukózy bunky fruktózu nevyužívajú.

V imobilizovaných a vitálnych bunkách je zdanlivá hodnota Michaelis-Mentenovej konštanty K_m sacharázy rovná 4,6 mmol l⁻¹. Podobné vlastnosti má aj sacharáza



Obr. 2. pH optimum sacharázy suspenznej kultúry a buniek náprstníka imobilizovaných glutaraldehydom; 2,5 g buniek v 10 ml tlmivého roztoku so sacharózou, □ glutaraldehyd, ○ suspenzná kultúra

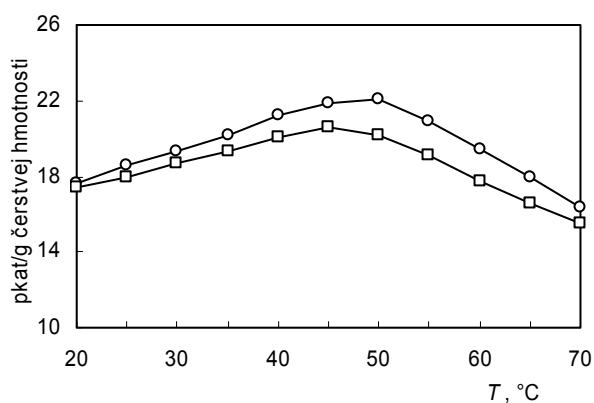
Tabuľka II

Obsah bielkovín a aktivita sacharázy v 10-dňových bunkách náprstníka a v bunkách suspenznej kultúry permeabilizovanej 5% Tweenom 20, 5% Tweenom 80, 30% etanolom, 50% etanolom, 0,1% hexadecyltrimetylamóniumbromidom (HTAB), 0,1% hexadecylpyridíniumchloridom (HPCH) v bunkách imobilizovaných glutaraldehydom

Bunky		Proteíny [mg g ⁻¹ čerstvej hmotnosti]	Aktivita [nkat g ⁻¹ čerstvej hmotnosti]	Špecifická aktivita [nkat mg ⁻¹ proteínov]
Suspenszia		0,63 ± 0,03	18,3 ± 0,42	29,1
Permeabilizované	0,1%HTAB	0,28 ± 0,013	20,3 ± 0,61	72,5
	0,1%HPCH	0,28 ± 0,012	20,2 ± 0,61	72,2
	5% Tween 20	0,28 ± 0,013	20,0 ± 0,62	71,4
	5% Tween 80	0,28 ± 0,014	20,0 ± 0,63	71,4
	30% etanol	0,28 ± 0,013	17,1 ± 0,62	61,1
	50% etanol	0,28 ± 0,014	17,1 ± 0,63	61,1
Imobilizované	0,1%HTAB	0,29 ± 0,014	15,6 ± 0,60	53,8
	0,1%HPCH	0,29 ± 0,013	15,6 ± 0,59	53,8
	5% Tween 20	0,29 ± 0,013	15,3 ± 0,58	52,7
	5% Tween 80	0,29 ± 0,014	15,3 ± 0,59	52,7
	30% etanol	0,29 ± 0,014	12,8 ± 0,58	44,1
	50% etanol	0,29 ± 0,015	12,7 ± 0,57	43,8

izolovaná z ryže $K_m = 6,6 \text{ mmol l}^{-1}$ (cit.²⁶), maku $K_m = 5,5 \text{ mmol l}^{-1}$ (cit.²⁷), kukurice $K_m = 2,9 \text{ mmol l}^{-1}$ a *Schizophyllum commune* $K_m = 4,8 \text{ mmol l}^{-1}$ (cit.²⁸).

Kyselina 4-(chlórmerkuri)benzoová v koncentrácii 0,1–0,5 mmol l⁻¹ inhibuje sacharázu. Jej účinok možno eliminovať 5–10 mmol l⁻¹ cysteínom, 5–10 mmol l⁻¹ 2-merkptoetanolom alebo 5–10 mmol l⁻¹ ditiotreitólom, čo dokazuje, že SH skupiny sú pre enzýmovú aktivitu esenciálne^{27,29}. Glukóza a fruktóza inhibujú aktivitu sacharázy izolovanej z uhoriek a maku^{27,29}, podobný efekt sa pozoroval aj pri imobilizovaných bunkách. Isla a spol.²⁶



Obr. 3. Vplyv teploty na aktivitu sacharázy suspenznej kultúry buniek náprstníka imobilizovaných glutaraldehydom; 2,5 g buniek v 10 ml tlmivého roztoku so sacharózou, □ glutaraldehyd, ○ suspenzá kultúra

zistili, že fruktóza je kompetitívnym a glukóza nekompetitívnym inhibítorom študovaného enzýmu.

Glutaraldehydom imobilizované bunky uchovávané v 0,15 mol l⁻¹ NaCl v prítomnosti konzervačných látok (chloramfenikol, chlór tetracyklíniumchlorid, (1-metyldodecyl)dimetylamín N-oxid a azid sodný si v priebehu 6 mesiacov uchovávajú pomerne vysokú enzýmovú aktivitu (tab. IV). Podobnú aktivitu sacharázy majú aj glutaraldehydom imobilizované bunky, ktoré sa usušili v tenkej vrstve pri laboratórnej teplote a udržiavali v uzavretých nádobách. Takto udržiavané bunky možno po 60-minútovom nabobtnaní v 0,15 mol l⁻¹ NaCl použiť ako imobilizované bunky uchovávané v 0,15 mol l⁻¹ NaCl v predošlom prípade (množstvo vysušených buniek je ekvivalentné množstvu imobilizovaných buniek uchovávaných v roztoku NaCl). Je všeobecne známe, že imobilizované bunky majú v porovnaní so suspenznými kultúrami tieto výhody: zabezpečenie nepretržitého prítoku, zlepšenie separácie biokatalyzátora, predĺženie počasu biokatalyzátora, fyzikálnu ochranu voči strižným silám, ochranu pred zhlukovaním, stimuláciu produkcie sekundárnych metabolitov, konzerváciu multifunkčného systému^{7,9,10,19}.

V bunkách imobilizovaných zosieťovaním glutaraldehydom je aktivita sacharázy, tyrozín-dekarboxylázy, DOPA-dekarboxylázy, α- a β-galaktozidázy v porovnaní s aminopeptidázami pomerne vysoká^{30–32}.

Glutaraldehyd možno preto výhodne využiť aj pri imobilizácii rastlinných buniek. Predložené výsledky poukazujú na to, že extracelulárne a imobilizované glykozidázy a iné enzýmy rastlinného pôvodu nájdu biotechnologické uplatnenie v potravinárskom, farmaceutickom priemysle ako aj vo výskume^{33,34}. Tieto enzýmy sú všeobecne prí-

Tabuľka III

Efekt glukózy, fruktózy a galaktózy na aktivitu sacharázy (%) imobilizovaných buniek a suspenznej kultúry náprstníka

Koncentrácia cukrov [mmol l ⁻¹]	Pôvodná aktivita [%]					
	glukóza		fruktóza		galaktóza	
	A	B	A	B	A	B
0	100	100	100	100	100	100
1	74	75	63	64	147	145
5	73	74	58	57	142	140
10	67	68	54	55	133	132
20	64	65	51	52	128	126

Pozn.: A – suspenzná kultúra, B – imobilizované bunky

Tabuľka IV

Stabilita sacharázy v imobilizovaných bunkách náprstníka v priebehu skladovania

Konzervačná látka	Pôvodná aktivita [%]				
	0 mesiacov	1 mesiac	2 mesiace	3 mesiace	6 mesiacov
–	100	–	–	–	–
CLCTC (50 mg l ⁻¹)	88	87	84	82	78
ATDNO (100 mg l ⁻¹)	88	87	84	82	78
Chloramfenikol (50 mg l ⁻¹)	88	86	83	81	77
Azid sodný (200 mg l ⁻¹)	88	86	83	81	76
Zamrznuté v 0,15 mol l ⁻¹ NaCl	89	85	81	79	74
Dehydratované bunky	90	85	82	79	75

Pozn.: CLCTC – chlortetracyklíniumchlorid, ATDNO – (1-metyldodecyl)dimetylamin *N*-oxid, pôvodná aktivita = enzýmová aktivita (100 %) v bunkách suspenznej kultúry pred imobilizáciou

tomné v rastlinách. Žiaľ, doposiaľ sa v biotechnologických procesoch neaplikovali.

Náklady na horeuvedenú imobilizáciu sú nízke a nevyžadujú ani náročné prístrojové vybavenie. Pri imobilizácii celých buniek sa zachováva vysoká aktivita enzýmu bez jeho izolácie. Fyzikálne vlastnosti biokatalyzátora a kinetické parametre reakcie sú porovnateľné s biokatalyzátorom pripraveným imobilizáciou na rozpustný, resp. nerozpustný nosič³⁵. Biotransformácia poskytuje okrem alternatívneho a účinného riešenia početných syntetických problémov aj environmentálne nezávadné technológie, čím prispieva k ochrane životného prostredia^{7,9,10}.

Prezentovaným spôsobom imobilizovaná sacharáza a iné hydrolázy sa môžu perspektívne uplatniť v biotransformačných procesoch farmaceuticky a potravinársky dôležitých substancií. Štúdiom štruktúry niektorých látok a ich participácia v biologických systémoch je ďalšou možnosťou ich praktického využitia^{36–40}.

Záver

V práci sa testovala vhodnosť aplikácie glutaraldehydu pri imobilizácii suspenzných kultúr náprstníka. Výsledky experimentov ukázali, že bunky náprstníka po permeabilizácii Tweenom 20, Tweenom 80, etanolom, hexadecyltrimetylamoniombromidom a hexadecylpyridíniumchloridom možno pri zachovaní pomerne vysokej aktivity sacharázy imobilizovať glutaraldehydom. Takto imobilizované bunky je vhodné uchovávať v roztoku 0,15 mol l⁻¹ NaCl v prítomnosti konzervačných látok (chloramfenikol, chlortetracyklíniumchlorid,

(1-metyldodecyl)dimetylamin *N*-oxid a azid sodný alebo ich vysušiť a skladovať v tomto stave.

Majoritná časť aktivity študovaného enzýmu predstavuje intracelulárnu a iba minoritná časť extracelulárnu sacharázu.

Pomocou testovacích prúžkov na stanovenie koncen-

trácie glukózy a meracieho prístroja Accutrend sa vypracovala rýchla, jednoduchá a spoľahlivá metóda dôkazu extracelulárnej sacharózy.

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia grantového projektu VEGA 1/3289/06. Za technickú spoluprácu touto cestou ďakujeme p. P. Kečkešovi.

LITERATÚRA

- Tilemann I., Tokhtaeva E., Sedlárová E., Barth A., Valent A., Siekel P., Ďuriček M.: *Chem. Nat. Prod.* 39, 394 (2003).
- Hudák J., Dvořák M., Herichová A., Lux A., Nátr L., Peterková I.: *Biológia rastlín*. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava 1991.
- Szczodrac J.: *Acta Biotechnol.* 19, 235 (1999).
- Obložinský M., Shoeps R., Ulbrich-Hoffmann R., Bezáková L.: *Biochim. Biophys. Acta* 1631, 153 (2003).
- Pereira R. A., Batista J. A. N., Da Silva M. C. M., Neto O. B. O., Figuera E. L. Z., Jiméz A. V., Grosside-Sa M. F.: *Phytochemistry* 67, 2009 (2006).
- Romero-Gómez S., Augur C., Vinięgra-González G.: *Biotechnol. Lett.* 22, 1255 (2000).
- Trelles J. A., Bentancor L., Schoijet A., Porro S., Lewkowicz E. S., Sinisterra J., Iribarren A. M.: *Chem. Biodiversity* 1, 280 (2004).
- Brodélius P., Deus B., Moesbach K., Zenk M. H.: *FEBS Lett.* 103, 93 (1979).
- Jirků V., Macek T., Vaněk T., Krumphanzl V., Kubánek V.: *Biotechnol. Lett.* 3, 447 (1981).
- Gill I., Ballesteros A.: *Trends Biotechnol.* 18, 282 (2000).
- Platková Z., Polakovič M., Štefuca V., Vandáková M., Antošová M.: *Chem. Pap.* 60, 469 (2006).
- Schlee D., Kleber H. P.: *Biotechnologie*. Vol. 2. Gustav Fischer Verlag, Jena 1991.
- Barth A., Siekel P., Sedlárová E., Valent A., Tokhtaeva E.: *Acta Histochem.* 107, 253 (2005).
- Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
- Diettrich B., Steup C., Neumann N. D., Schreiber H., Reinbothe C., Luckner M.: *J. Plant Physiol.* 124, 441 (1986).
- Trinder P.: *J. Clin. Pathol.* 22, 158 (1969).
- Dixon R. A.: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1991.
- Doumas T. B., Bayse D. D., Carter R. J., Peters T., Schaffer R.: *Clin. Chem.* 27, 1642 (1981).
- Báleš V., Gemeiner P., Kuniak L., Rexová-Benková E., Vojtíšek V., Zemek J.: *Enzymové inžinierstvo*. Alfa, Bratislava 1987.
- Devínsky D., Lacko I., Nagy A., Krasnec L.: *Chem. Pap.* 32, 106 (1978).
- Stano J., Kovács P., Mičieta K., Neubert K., Tintemann H., Koreňová M.: *Acta Histochem.* 4, 441 (2002).
- Srinivansan-Nagajyothi A. R., Gowda L. R., Bhat S. G.: *Biotech. Tech.* 8, 729 (1994).
- Rubio M. C., Runco R., Navarro A. R.: *Phytochemistry* 61, 605 (2002).
- Stano J., Bezáková L., Kovács P., Kákoniová D., Lišková D.: *Pharmazie* 51, 245 (1996).
- Hamilton R., Pedersen H., Chin C. K.: *Biotechnol. Bioeng.* 14, 383 (1984).
- Isla M. I., Salermo G., Pontis H., Vattuone M. A., Sampietro A. R.: *Phytochemistry* 38, 321 (1995).
- Kováčiková M.: *Diplomová práca*. Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava 1991.
- Rajo H. P., Vattuone M. A., Sampietro A. R.: *Phytochemistry* 37, 119 (1994).
- Machová B.: *Rigorózná práca*. Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava 1994.
- Stano J., Nemeč P., Weissová K., Kovács P., Kákoniová D., Lišková D.: *Phytochemistry* 38, 859 (1995).
- Mičieta K., Tokhtaeva E., Stano J., Koreňová M., Neubert K., Ulbrich-Hoffmann R., Blanáriková V.: *Chem. Nat. Comp.* 38, 284 (2002).
- Stano J., Mičieta K., Koreňová M., Blanáriková V.: *Chem. Listy* 101, 65 (2007).
- Assano N., Nash R., Molyneus R., Fleet C. W. J.: *Tetrahedron: Asymmetry* 11, 1645 (2000).
- Czigle Sz., Veres K., Háznagy-Randai E., Tóth L., Mučaji P., Máthé I., Grančai D.: *J. Essent. Oil Res.* 18, 423 (2006).
- Hasal P., Vojtíšek V., Čejková A., Kleczek P., Kofronová O.: *Enzyme Mikrob. Technol.* 14, 211 (1992).
- Tekeľová D., Tóth J., Mrlianová M., Czigle Sz., Filipová A., Grančai D.: *Farm. Obzor* 10–11, 85 (2006).
- Neubert K., Stano J., Mičieta K., Koreňová M., Blanáriková V.: *Eng. Life Sci.* 4, 281 (2004).
- Gupta P., Achari B., Pal B. C.: *Phytochemistry* 66, 615 (2005).
- Bezáková L., Obložinský M., Sýkorová M., Paulíková I., Košťálová D.: *Czech. Slov. Pharm.* 67, 225 (2002).
- Nehls U., Grunze N., Willmann M., Reich M., Küster H.: *Phytochemistry* 68, 82 (2007).

J. Stano^a, B. Diettrich^c, K. Mičieta^d, V. Blanáriková^b, and M. Koreňová^a (^a Medicinal Plants Garden, ^b Department of Molecular and Subcellular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, ^c Institute of Pharmaceutical Biology, Martin Luther University, Halle/Saale, Germany, ^d Department of Botany, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava): **Study of Extracellular and Immobilized Saccharase in Foxglove**

Cells in suspension culture of foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh.) were permeabilized with Tween 20, Tween 80, ethanol, hexadecyltrimethylammonium bromide or hexadecylpyridinium chloride and immobilized using glutaraldehyde. Saccharase showed a pH optimum at 4.6 and

5.4; the optimum temperature for immobilized cells and for cell suspension culture were 50 °C and 45 °C, respectively. Four-hour hydrolysis of the substrate proceeded with a conversion of 63 %. The immobilized cells showed a high saccharase activity, good stability of plant saccharase in long-term storage and convenient physico-mechanical properties. The culture medium (without cells)

was used for identification and determination of extracellular enzyme activity. The intracellular activity of saccharase estimated in cell suspension accounts for 88.4 % of the total activity the rest is due to the extracellular activity. The specific intracellular activity is 4.6 times higher than the extracellular one. The described method permits a rapid, simple and specific identification.

OBSAH A ZLOŽENIE ŠKROBU V ZRNE PŠENICE, RAŽE A TRITIKALE

DANIELA MIKULÍKOVÁ^a, VIERA HORVÁTHOVÁ^b a ALŽBETA ŽOFAJOVÁ^a

^a Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 01 Piešťany, ^b Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovenská republika
mikulikova@vurv.sk, viera.horvathova@ucm.sk, zofajova@vurv.sk

Došlo 12.10.07, prijaté 24.1.08.

Kľúčové slová: α -amyláza, amylopektín, amylóza, bioetanol, škrob

Úvod

Snaha o ekologizáciu životného prostredia (najmä zníženie emisií škodlivých látok do ovzdušia) vyústila do vypracovania dokumentu Rady Európy č. 39/97, ktorý určuje zloženie reformulovaných pohonných hmôt obsahujúcich alkoholy, prípadne butylétery z nich vyrobené (MTBE alebo ETBE). Okrem toho smernica EÚ č. 93/500 EEC č. 1972 stanovuje ciele na dosiahnutie náhrad spotreby energií obnoviteľnými zdrojmi a stanovuje doporučenia v oblasti daňových úľav, potrebných na spracovanie poľnohospodárskych surovín ako náhrady za lacnejšie suroviny fosílného pôvodu.

Na produkciu bioetanolu sú vhodné suroviny s vysokým obsahom škrobu, celulózy alebo hemicelulózy, ktoré možno hydrolyzovať na kvasiteľné monosacharidy. Pri nadprodukcii obilnín sú práve tieto vhodným substrátom na výrobu palivového etanolu. Za limitnú hranicu rentability sa považuje 65 % škrobu v sušine zrna. Z hľadiska efektívnej rastlinnej produkcie v SR je pre využitie na energetické účely perspektívnym zdrojom škrob zo semien pšenice a tritikale. Možno ich úspešne pestovať aj v marginálnych oblastiach.

Škrob je jedným z najvýznamnejších a najrozšírenejších rastlinných polysacharidov na Zemi. Ako zdroj chemickej energie ho využívajú živočíchy, vyššie rastliny aj mikroorganizmy. Nachádza sa v semenách a hľuzách rastlín (obilniny, pseudoobilniny, strukoviny, zemiaky a ďalšie plodiny). V obilninách sa syntetizuje v endosperme semien vo forme zásobného škrobu alebo v chloroplastoch počas fotosyntézy vo forme prechodného škrobu. Z chemickeho hľadiska sú škroby (včítane obilných škrobov) zmesou dvoch α -D-glukózových homopolymérov: 20–30 % amyλό-

zy a 70–80 % amylopektínu¹.

Amylóza je dlhý lineárny α -D-glukán zložený z pomerne širokého rozmedzia počtu glukózových jednotiek, v závislosti od botanického druhu^{2,3}, ktoré sú pospájané α -1,4-glykozidovými väzbami. Reťazce amyλόzy sú zvinuté do závitnice, v ktorej na 1 závit pripadá 6 glukózových jednotiek. Molekulová hmotnosť amyλόzy je okolo 10^5 – 10^6 Da (cit.⁴).

Amylopektín je tiež zložený z glukózových reťazcov, spojených α -1,4-glykozidovými väzbami, ktorých je asi 95 % (cit.⁵). Sú však kratšie než reťazce amyλόzy. Priemerne obsahujú 25–30 glukózových jednotiek. Sú vetvené tak, že nad každou 10. až 12. jednotkou je α -1,6-glykozidovou väzbou pripojený ďalší reťazec. Rozvetvená molekula amylopektínu je väčšia než molekula amyλόzy. Jeho molekulová hmotnosť sa pohybuje medzi 10^7 – 10^9 Da (cit.⁵) Stupeň polymerizácie amylopektínu varíruje; existujú však tri typické podskupiny: rozmedzie 13400–26500, 4400–8400 a 700–2100 (cit.⁶).

Škrob sa nachádza vo forme škrobových zrn A-typu alebo B-typu, ktoré sa líšia veľkosťou, tvarom, chemickým zložením a fyzikálno-chemickými vlastnosťami^{7,8}. Zrná A-typu sú väčšie (>10 μ m), majú lentikulárny tvar. Škrobové zrná B-typu sú menšie (<10 μ m), sú sférické a v porovnaní s A-typom obsahujú menej amyλόzy a viac fosfolipidov.

Od podielu amyλόzy a amylopektínu závisia fyzikálno-chemické vlastnosti škrobu⁹. Prejavujú sa najmä v rozdielnej rozpustnosti, napučívaní, retrogradácii a stráviteľnosti a majú určujúci význam z hľadiska využitia škrobu. Škrob má široké uplatnenie vo výrobe potravín aj v technickej praxi. Škroby s vysokým podielom amylopektínu sú vhodné na výrobu papiera, adhezív, piva, cestovín a mrazených potravín. Škroby s vysokým podielom amyλόzy sa používajú na výrobu funkčných potravín na báze zdraviu prospešného rezistentného škrobu (RS), v cukrárenstve a na výrobu fotografických filmov.

Biosyntézu škrobu katalyzuje 14 rôznych enzýmov¹⁰, pričom tri z nich možno považovať za kľúčové¹¹: ADP-glukóza-pyrofosforyláza (AGP), škrobová syntetáza (SS) a enzým vetviaci škrob (BE). Enzým AGP je zodpovedný za tvorbu ADP-glukózy ako monoméru pre syntézu polymérneho škrobu, škrobová syntetáza predlžuje reťazce a vetviaci enzým sa podieľa na vetvení reťazcov do klastrovej štruktúry. Všetky tri sa nachádzajú vo viacerých izoformách a majú rozdielnu enzýmovú aktivitu aj fyzikálno-chemické a imunologické vlastnosti¹². Sú podmienené rozdielnymi génmi a líšia sa primárnou štruktúrou, molekulovou hmotnosťou, hodnotou Michaelisovej konštanty K_m , citlivosťou k aktivátorom a inhibítorm, teplotným optimom a podobne. Gény, ktoré regulujú syntézu týchto enzýmov, možno mutovať alebo klonovať v bakteriálnom plazmide a následne zabudovať do iných genómov. Prostredníctvom týchto génov možno zasiahnuť do syntézy škrobu a zmeniť jeho obsah aj zloženie.

In vivo prebieha syntéza amyλόzy a amylopektínu súčasne. O zastúpení ich podielu v škrobe rozhodujú dva

špecifické izoenzymy: škrobová syntetáza viazaná na granuly (GBSSI) a vetviaci enzým BEIIb. Škrobová syntetáza viazaná na granuly je v obilninách podmienená génmi *WAXY*, v zemiaku génom *AMF* a v hrachu génom *LAM*. Mutáciou génu, ktorá spôsobí stratu tejto izoformy, možno v škrобе znížiť, prípadne až celkom odstrániť, amylozu¹³. Škroby takýchto *waxy* mutantov bez amylozy obsahujú iba amylopektín. Mutácie génu *AMYLOSE-EXTENDER (AE)* v obilninách alebo génu *RUGOSUS (R)* hrachu spôsobujú zasa stratu vetviaceho izoenzymu BEIIb, ktorý prednostne vetví amylopektín. V dôsledku týchto mutácií je podiel amylozy v škrобе zvýšený^{14,15}. Šľachtením alebo pomocou biotechnológií možno cielene získať škrob s požadovaným zastúpením amylozy a amylopektínu podľa účelu, na ktorý je určený^{16–24}.

Cieľom práce bolo zhodnotiť vplyv plodiny, odrody a poveternostných faktorov na parametre, ktoré významne ovplyvňujú produkciu etanolu: obsah škrobu, podiel amylozy v ňom a enzýmová aktivita α -amylázy (α -AMS), ktorá hrá dôležitú úlohu v jeho degradácii. Cieľom bolo tiež vybrať najvhodnejšie odrody pšenice pre molekulárne šľachtenie za účelom získania línie s vysokým obsahom škrobu bez amylozy ako vhodného substrátu pre etanolovú fermentáciu.

Experimentálna časť

Materiál

Na porovnanie sledovaných parametrov v bežne používaných druhoch obilnín sa hodnotilo 26 odrôd pšenice letnej f. ozimnej (*Triticum aestivum* L., v texte ďalej pšenica), 11 odrôd raže siatej (*Secale cereale* L., v texte raž), a 13 odrôd ozimného tritikale (*X Triticosecale* Wittmarck, v texte tritikale). Plodiny sa pestovali v jednej lokalite (Borovce pri Piešťanoch) v r. 2005.

Na zistenie vplyvu lokality na hodnotené parametre sa vybralo 16 odrôd pšenice, pestovaných v r. 2006 v rôznych lokalitách (Malý Šariš, Michalovce, Vígľaš-Pstruša pri Zvolene a Borovce), ktoré sa významne líšia nadmorskou výškou, priemernou dennou teplotou a množstvom zrážok počas vegetačného obdobia. Lokality Borovce a Michalovce patria medzi teplé suché oblasti s nižšou nadmorskou výškou. Vígľaš-Pstruša a Malý Šariš sú v chladnejšej oblasti s vyššou nadmorskou výškou.

Vplyv vegetačného roku na jednotlivé parametre sa hodnotil v 48 odrodách pšenice pestovanej v lokalite Borovce v rokoch 2004 a 2005.

Metódy

Stanovenie obsahu škrobu

Použila sa akceptovaná polarimetrická metóda stanovenia škrobu STN 46 1011-37 podľa Ewersa. Po kyslej hydrolyze vo vriacom vodnom kúpeli, vyčistení pomocou Carrezovho činidla I a II a filtrácii sa oproti destilovanej vode merala optická aktivita filtrátu (digitálny polarimeter GENEQ 3001, fa Kruss). Ako štandardná vzorka sa použila 5% glukóza; kontrolnou vzorkou bol šrot pšenice so 65% obsahom škrobu. Výsledky sú vyjadrené v sušine zrna ako hmotnostné %.

Stanovenie podielu amylozy a amylopektínu

Podiel amylozy a amylopektínu v škrобе sa určil kitom Amylose/Amylopectin Assay Kit (Megazyme, Írsko). Škrob sa kompletne dispergoval v dimetylsulfoxide vo vriacom vodnom kúpeli. Lipidy sa odstránili po precipitácii v etanole. Pridaním konkanavalínu A sa vyzrážal amylopektín a odstránil sa centrifugáciou. Amylóza sa nechala zhydrolyzovať enzýmovou zmesou (30 U amyloglukozidázy a 4,5 U α -amylázy*). Vzniknutá glukóza sa stanovila enzýmovou metódou pomocou enzýmového činidla (obsahujúceho glukózaoxidázu a peroxidázu). Extinkcia červeného komplexu sa merala pri 510 nm oproti 0,1 M octanovému tmivému roztoku pH 4,5. Ako štandardná vzorka sa použila glukóza (1 g l⁻¹); kontrolná vzorka mala v škrобе 70 % amylozy. Výsledky sú uvedené ako hm.% amylozy v škrобе. Zvyšok do hodnoty 100 % je hm.% amylopektínu.

Stanovenie aktivity α -amylázy (α -AMS)

Enzýmová aktivita sa stanovila kitom Alpha-amylase Assay Procedure (Megazyme, ICC Standard method No. 303). Aktivita α -AMS je priamo úmerná množstvu *p*-nitrofenolu, ktorý sa uvoľní po 20 min inkubácii pri 40 °C a pH 5,4 zo syntetického substrátu BPNPG7 (*p*-nitrofenylmaltoheptaosid). Po zastavení reakcie pomocou tris-(hydroxymetyl)aminometánu sa extinkcia žltého komplexu merala pri 400 nm oproti destilovanej vode. Ako štandard sa použil *p*-nitrofenol (molárny extinkčný koeficient E_{mM} 18,1 mol⁻¹cm⁻¹). Enzýmová aktivita α -AMS v šrote kontrolnej pšenice bola 340 U g⁻¹.

Štatistické hodnotenie výsledkov

Údaje boli spracované programom Statgraphics plus for Windows.

* Cereálna jednotka (U) je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré je v prítomnosti nadbytku termostabilnej α -glukozidázy potrebné na uvoľnenie 1 μ mol *p*-nitrofenolu z BPNPG7 za minútu pri 40 °C a pH 5,4.

Výsledky

Všetky analýzy sa robili v 2 opakovaníach. V pomletých vzorkách zrna sa stanovila vlhkosť (analytické váhy Sartorius MA 150) a výsledky sa prepočítali na obsah sušiny. V tabuľkách I–III je pre každý parameter uvedený aritmetický priemer, smerodajná odchýlka (SD) a najvyššia (Max.) a najnižšia (Min.) nameraná hodnota.

Zistili sa štatisticky významné rozdiely v aktivite α -AMS aj v podiele amylozy v škrobe medzi jednotlivými druhmi obilnín. Priemerné hodnoty obsahu škrobu v šrote klesali v poradí: raž (70,38 %), pšenica (69,90 %) a tritikale (69,61 %). Vzhľadom na väčšie rozdiely v obsahu škrobu medzi odrodami v rámci jednej plodiny však neboli rozdiely medzi pšenicou, ražou a tritikale štatisticky významné. Enzymová aktivita α -AMS (U g^{-1}) bola: v tritikale 182,34, v raži 167,16 a v pšenici 113,19. Podiel amylozy (vyjadrený ako hm. % škrobu) v týchto obilninách bol: v pšenici 26,48 %, v tritikale 23,02 % a v raži 22,02 % (tabuľka I). Z tabuľky je zrejmé, že z uvedených obilnín má pre produkciu etanolu najlepšie hodnoty sledovaných parametrov tritikale.

Vplyv lokality sa hodnotil v 16 odrodách pšenice pestovaných v 1 roku na 4 miestach (Malý Šariš, Michalovce, Vígľaš-Pstruša a Borovce), ktoré sa významne líšia klimatickými podmienkami. Najvyšší priemerný obsah škrobu mali odrody pšenice z chladnejšej vlhkej lokality Vígľaš-Pstruša s nadmorskou výškou 375 m (65,07 %), najmä Pavlina, Torysa, Venistar, Mladka, Akteur a Cubus. Najnižší priemerný obsah škrobu (62,80 %) mali odrody

pšenice z teplej suchej oblasti Borovce s nadmorskou výškou 167 m (tabuľka II). Nezistil sa štatisticky významný vplyv lokality na podiel amylozy v škrobe. Nadmerné zrážky počas dozrievania zrna v lokalite Borovce sa prejavili v zvýšenej enzymovej aktivite α -AMS.

Vplyv vegetačných rokov (2004 a 2005) sa hodnotil v 48 odrodách pšenice pestovaných v lokalite Borovce (tabuľka III). Roky sa výrazne líšili počasím, najmä počas vegetačného obdobia. V r. 2005 boli oproti r. 2004 vyššie priemerné teploty v máji a vysoké zrážky v júli, čo výrazne zhoršilo chlebo-pekársku kvalitu pšenice. Odrody pšenice v r. 2005 mali vyšší obsah škrobu aj vyššiu aktivitu α -AMS, pričom podiel amylozy v škrobe sa nezmenil.

V tabuľke IV sú zhrnuté výsledky jednotlivých odrôd pšenice ako priemerná hodnota zo 4 lokalít. Odroda Pavlina mala najvyšší obsah škrobu vo všetkých hodnotených lokalitách a Veldava mala zo všetkých odrôd vo všetkých lokalitách najvyššiu aktivitu α -AMS. Aktivita tohto enzýmu bola ovplyvnená viac odrodou než lokalitou; bola vyššia pri odrodách s horšou potravinárskou kvalitou (odrody 1 až 8). Daždivé počasie počas dozrievania zrna v Borovciach viac zvýšilo aktivitu α -AMS v odrodách s nižšou kvalitou než v odrodách s dobrou chlebo-pekárskou kvalitou. Podiel amylozy v škrobe bol nižší v odrodách s dobrou chlebo-pekárskou kvalitou (odrody 9 až 16).

Na základe hodnotenia obsahu a zloženia škrobu a aktivity α -AMS sú pre produkciu bioetanolu veľmi perspektívne nové slovenské odrody pšenice Pavlina (vysoký obsah škrobu) a Veldava (vysoká aktivita α -AMS).

Tabuľka I
Vplyv plodiny na parametre škrobu v zrne (Borovce 2005)

Plodina	Škrob [%]			Amylóza [% škrobu]			α -Amyláza [U g^{-1}]		
	priemer \pm SD	Min.	Max.	priemer \pm SD	Min.	Max.	priemer \pm SD	Min.	Max.
Pšenica	69,90 \pm 1,65	67,18	73,68	26,48 \pm 0,94	24,32	27,95	113,19 \pm 28,56	73,91	205,38
Raž	70,38 \pm 2,47	64,81	73,41	22,02 \pm 1,49	19,68	24,18	167,16 \pm 33,01	127,45	242,17
Tritikale	69,61 \pm 3,15	60,88	73,55	23,02 \pm 0,83	21,32	24,18	182,34 \pm 51,55	118,56	278,97

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka

Tabuľka II
Vplyv lokality na parametre škrobu v pšeničnom zrne (2006)

Lokalita	Škrob [%]			Amylóza [% škrobu]			α -Amyláza [U g^{-1}]		
	priemer \pm SD	Min.	Max.	priemer \pm SD	Min.	Max.	priemer \pm SD	Min.	Max.
Vígľaš-Pstruša	65,07 \pm 2,86	56,56	70,11	25,40 \pm 1,25	23,32	27,82	133,69 \pm 20,93	103,19	172,30
Michalovce	64,84 \pm 2,84	59,39	69,32	25,57 \pm 1,20	23,41	27,45	131,06 \pm 21,41	102,54	170,97
Borovce	62,80 \pm 1,15	61,01	64,52	24,96 \pm 0,91	23,60	26,36	146,25 \pm 31,66	100,86	202,41
Malý Šariš	64,35 \pm 2,11	60,58	67,10	25,17 \pm 0,81	23,89	26,50	128,63 \pm 19,56	107,25	165,32

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka

Tabuľka III
Vplyv vegetačného roka na parametre škrobu v pšeničnom zrne (Borovce)

Rok	Škrob [%]			Amylóza [% škrobu]			α -Amyláza [U g ⁻¹]		
	priemer \pm SD	Min.	Max.	priemer \pm SD	Min.	Max.	priemer \pm SD	Min.	Max.
2004	63,29 \pm 2,01	59,73	67,32	23,26 \pm 2,33	18,41	28,61	116,90 \pm 21,03	89,33	174,08
2005	65,25 \pm 1,74	62,07	68,93	23,13 \pm 2,52	18,18	28,77	139,07 \pm 23,97	95,82	192,19

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka

Diskusia

Liehová politika siaha na našom území už do obdobia existencie Rakúsko-Uhorska²⁵. V súčasnosti sa u nás na výrobu liehu spracováva cukrová repa, kukurica, pšenica, tritikale, prípadne raž^{26–28}. Pestovaniu pšenice, tritikale a raže na energetické účely sa u nás už dávnejšie venuje pozornosť^{29–30}. Z parametrov, ktoré významne ovplyvňujú produkciu etanolu, sa v nich však zatiaľ hodnotil iba obsah škrobu (prípadne aj bielkovín) v sušine zrna³¹. Popísal sa významný vplyv typu pôdy, predplodiny, hnojenia aj ošetrovania pesticídmi na obsah škrobu vo viacerých odrodách pšenice pestovaných vo viacerých lokalitách²⁹.

V našej práci sme zhodnotili pomerne veľký súbor odrôd pšenice z hľadiska troch dôležitých parametrov pre účinnú alkoholovú fermentáciu: obsah aj zloženie škrobu a aktivita α -AMS, ktorá hrá významnú úlohu v degradácii škrobu. Zistené hodnoty obsahu škrobu v troch hodnotených obilninách a v ich odrodách (od 56,56 do 73,68 %) sú porovnateľné s výsledkami iných autorov^{26,29} napriek tomu, že sme hodnotili iné odrody, pestované v iných vegetačných rokoch aj v iných lokalitách (tabuľky I–III). Nezistili sme štatisticky významný rozdiel v priemernom obsahu škrobu medzi pšenicou, ražou a tritikale. Obilniny sa však významne líšili podielom amyλόzy v škrobe aj enzýmovou aktivitou α -AMS. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že na etanolovú fermentáciu je tritikale vhodnejšie než pšenica alebo raž, zvlášť niektoré jeho odrody: Asper, Kendo, Largus, Presto, Radko, Tricolor a Woltario. Tieto odrody majú vyšší obsah škrobu, vyšší podiel amylopektínu aj vyššiu autoamylytickú aktivitu (α -AMS).

Nepriaznivé počasie počas vegetačného obdobia a pestovanie v lokalitách s vyššou nadmorskou výškou a nižšou priemernou ročnou teplotou zhoršujú chlebopekársku kvalitu pšenice. Z hľadiska dosiahnutia vysokého obsahu škrobu sú však tieto faktory priaznivé.

V súčasnosti sú už známe parametre, ktoré priamo ovplyvňujú produkciu bioetanolu^{32–36}. Patria k nim: vysoký obsah škrobu, schopnosť rýchleho stekúvania škrobových suspenzií a ich nízka viskozita po ukončení procesu a vysoká rýchlosť a účinnosť fermentácie. Ojedinele sa objavili informácie o niektorých *waxy* odrodách kukurice a o transgénnom *waxy* zemiaku (majú škrob bez amyλόzy) ako mimoriadne vhodných zdrojoch na produkciu etanolu.

V ostatnom čase sa intenzívne študuje kinetika hydro-

lýzy škrobu vo vzťahu k podielu amyλόzy a amylopektínu v ňom. Hĺbka hydrolyzy škrobu a hodnota DE (dextrózového ekvivalentu) procesu sa zvyšuje v poradí: 100% amyλόza < vysoký obsah amyλόzy < obsah amyλόzy bežný v natívnych škrobových substrátoch < 0 % amyλόzy (= 100% amylopektín)³⁷.

Iní autori tiež zistili v škroboch bez amyλόzy vyššiu rýchlosť aj vyšší stupeň hydrolyzy než v škroboch s normálnym alebo zvýšeným podielom amyλόzy^{38–43}. V zhode s tým sa zistilo, že proces hydrolyzy prebieha rýchlejšie v malých škrobových granulách typu B (cit.⁴⁴), ktoré majú nižší obsah amyλόzy.

Vyšší obsah amylopektínu zapríčiňuje vysokú schopnosť škrobu napučiať a viazať vodu, ale prítomnosť komplexu amyλόzy s lipidmi túto schopnosť negatívne ovplyvňuje^{45,46}. Teplotný interval mazovatenia posúva do oblastí vyšších teplôt⁴⁷. Okrem toho vysoký podiel amyλόzy spôsobuje odolnosť škrobu voči enzymatickému štiepeniu α -amyložou⁴⁸. Línie jačmeňa s génom *amol* majú zvýšený podiel amyλόzy v škrobe a zároveň nevyhovujúcu sladovnícku kvalitu⁴⁹. Okrem toho tieto línie majú významne zníženú aktivitu β -AMS, ktorá je jedným z ukazovateľov sladovníckej kvality jačmeňa.

Z našich výsledkov je zrejme, že registrované slovenské a české odrody pšenice majú v škrobe približne rovnaký podiel amyλόzy (19–28 %). Nenašli sme odrodu, ktorá má oproti ostatným v škrobe významne znížený podiel amyλόzy. Okrem toho sme zistili, že podiel amyλόzy neovplyvnila lokalita ani ročník. Z týchto výsledkov vyplýva, že obsah amyλόzy je podmienený iba geneticky. Možno ho znížiť napríklad krížením pestovaných odrôd pšenice s mutovanými *waxy* líniami, ktoré majú škrob bez amyλόzy.

Niektoré odrody pšenice majú veľmi vhodné hodnoty ďalších parametrov, ktoré podporujú hydrolyzu: vysoký obsah škrobu a vysokú aktivitu α -AMS. Screeningom celého radu odrôd pšenice sme zistili, že mimoriadne vhodné parametre pre produkciu etanolu majú nové slovenské odrody Pavlina a Veldava, ktoré boli šľachtené za účelom dosiahnutia vysokého obsahu škrobu v zrne. Obe boli vyšľachtené na Výskumno-šľachtiteľskej stanici Vigfaš-Pstruša. Odroda Pavlina vykazovala vysoký obsah škrobu a Veldava vysokú aktivitu α -AMS vo všetkých hodnotených lokalitách. Tieto odrody sú veľmi vhodné pre molekulárne šľachtenie s cieľom získať línie pšenice

Tabuľka IV
Vplyv odrody na priemerné hodnoty (zo 4 lokalít) parametrov škrobu

Odroda	Škrob [%]	α -AMS [U g ⁻¹]	Amylóza [% škrobu]
1 – Torysa	65,03	157	25,73
2 – Malvína	63,43	157	24,77
3 – Malyska	65,28	147	25,20
4 – Markola	65,56	149	26,40
5 – Pavlina	66,83	143	26,23
6 – Veldava	64,82	178	25,93
7 – Mladka	64,23	167	24,62
8 – Venistar	64,74	149	26,23
9 – Akteur	64,01	116	25,93
10 – Vanda	65,15	118	25,76
11 – Sulamit	60,59	120	25,60
12 – Ilona	63,46	115	25,02
13 – Ilias	65,36	104	24,29
14 – Cubus	63,35	112	23,74
15 – Barroko	62,67	119	23,99
16 – Petrana	63,67	111	24,90
LSD _{0,05}	–	10,43	1,07
\bar{x}	64,26	135	25,27

Pozn.: \bar{x} – aritmetický priemer zo všetkých odrôd pšenice, LSD_{0,05} – najmenšia štatisticky významná odchýlka na hladine $\alpha = 0,05$

s vysokým obsahom škrobu bez amyλόzy.

Škrob bez amyλόzy možno získať zablokovaním enzýmovej aktivity škrobovej syntetázy viazanej na granuly (GBSSI), ktorá je v pšenici podmienená tromi génmi *WAXY*: *Wx-A₁* (krátke rameno 7A chromozómu), *Wx-B₁* (dlhé rameno 4A chromozómu) a *Wx-D₁* (krátke rameno 7D chromozómu). Tieto gény môžu mať normálne (funkčné) alebo mutované (nefunkčné, tzv. nulové) alely. Ak sa v genóme pšenice nachádzajú iba funkčné *waxy* alely, aktivita GBSSI je normálna a vzniká normálne množstvo amyλόzy. Prítomnosť mutovanej *waxy* alely však spôsobí výrazné zníženie aktivity GBSSI, preto vzniká menej amyλόzy. Obsah amyλόzy je nepriamo úmerný počtu mutovaných *waxy* alel. V prítomnosti všetkých troch nulových *waxy* alel sa podiel amyλόzy v škrobe zníži až na nulovú hodnotu^{13,50}. Prirodzený výskyt mutovaných *waxy* alel je pomerne nízky a je podmienený geograficky.

V šľachtiteľských programoch sa ako donory nulových *waxy* alel celosvetovo používajú prirodzené *waxy* mutanty pšenice: japonská odroda Kanto 107 s dvoma nulovými *waxy* alelami (*Wx-A₁* a *Wx-B₁*) a čínska odroda BaiHuo (prípadne BaiHuoMai) s veľmi vzácnou nulovou alelou *Wx-D₁*.

Na základe našich výsledkov predpokladáme, že mo-

lekulárnym šľachtením (princíp selekcie pomocou molekulárných PCR markerov viazaných s génmi) možno z odrôd pšenice Pavlina alebo Veldava získať novú líniu bez amyλόzy. Takáto línia bude mať podľa literárnych údajov zvýšenú rýchlosť aj hĺbku hydrolýzy a bude preto veľmi vhodná pre produkciu bioetanolu.

Záver

- 1) Niektoré odrody tritikale (Asper, Kendo, Largus, Presto, Radko, Tricolor, Voltario) majú v porovnaní s odrodami pšenice a raže vyššiu enzýmovú aktivitu α -AMS, vyšší obsah škrobu a nižší podiel amyλόzy. Sú preto veľmi vhodné pre etanolovú fermentáciu. Perspektívna je aj nová línia tritikale TC 16/04 z Výskumno-šľachtiteľskej stanice Vígľaš-Pstruša.
- 2) Lokalita Vígľaš-Pstruša je mimoriadne vhodná na produkciu pšenice a tritikale s vysokým obsahom škrobu.
- 3) Daždivé počasie počas dozrievania zrna významne zvyšuje obsah škrobu aj enzýmovú aktivitu α -AMS v zrne pšenice.
- 4) Pre produkciu palivového etanolu sú perspektívne

nové slovenské odrody pšenice Pavlina a Veldava. Obe odrody majú najlepšie hodnoty parametrov, ktoré podporujú hydrolýzu škrobu, sú preto veľmi vhodné pre molekulárne šľachtenie s líniami pšenice s nulovými *waxy* alelami.

Autori ďakujú Ing. P. Hauptvoglovi, PhD. a Ing. L. Rückschlossovi za poskytnutie rastlinného materiálu a S. Hruščíkovej za pomoc pri chemických analýzach.

LITERATÚRA

- Preiss J.: *Oxf. Surv. Plant Mol. Cel. Biol.* 7, 59 (1991).
- Morrison W. R., Karkalas J.: Starch. In: *Methods in Plant Biochemistry* 2, s. 323. Academic Press, London 1990.
- Hanashiro I., Takeda Y.: *Carbohydr. Res.* 306, 421 (1998).
- Mua J. P., Jackson D. S.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 3840 (1997).
- Buléon A., Colonna P., Planchot V., Ball S.: *Int. J. Biol. Macromol.* 23, 85 (1998).
- Takeda Y., Shibahara S., Hanashiro I.: *Carbohydr. Res.* 338, 471 (2003).
- Bertolini A. C., Souza E., Nelson J. E., Huber K. C.: *Cereal Chem.* 80, 544 (2003).
- Tester R. F., Karkalas J., Qi X.: *J. Cereal Sci.* 39, 151 (2004).
- Sasaki T.: *Jpn. Agric. Res. Quart.* 39, 253 (2005).
- Smith A. M., Denyer K., Martin C.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 67 (1997).
- Morell M. K., Rahman S., Regina A., Appels R., Li Z.: *Euphytica* 119, 55 (2001).
- James M. G., Denyer K., Myers A. M.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 215 (2003).
- Shure M., Wessler S., Federoff N.: *Cell* 35, 225 (1983).
- Stinard P. S., Robertson D. S., Schnable P. S.: *Plant Cell* 5, 1556 (1993).
- Burton R. A., Bewley J. D., Smith A. M., Bhattacharyya M. K., Tatge H., Ring S., Bull V., Hamilton W. D. O., Martin C.: *Plant J.* 7, 3 (1995).
- Graybosch R. A.: *Trends Food Sci. Tech.* 9, 135 (1998).
- Graybosch R. A., Baenziger P. S.: *Crop Sci.* 44, 2273 (2004).
- Graybosch R. A., Peterson C. J., Hansen L. E., Rahman S., Hill A., Skerritt J. H.: *Cereal Chem.* 75, 162 (1998).
- Graybosch R. A., Souza E. J., Berzonsky W. A., Baenziger P. S., Chung O. K.: *J. Cereal Sci.* 38, 69 (2003).
- Graybosch R. A., Souza E. J., Berzonsky W. A., Baenziger P. S., McVey D. J., Chung O. K.: *Crop Sci.* 44, 1491 (2004).
- Graybosch R. A., Souza E. J., Berzonsky W. A., Baenziger P. S., McVey D. J., Chung O. K.: *Crop Sci.* 44, 1492 (2004).
- Rahman S., Li Z., Batey I., Cochrane M. P., Appels R., Morell M.: *J. Cereal Sci.* 31, 91 (2000).
- Regina A., Bird A., Topping D., Bowden S., Freeman J., Barsby T., Kosar-Hashemi B., Li Z., Rahman S., Morell M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3546 (2006).
- Jobling S.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 210 (2004).
- Petr J.: *Úroda* 52, 21 (2004).
- Šimůnek P.: *Úroda* 44, 25 (1996).
- Tichý F., Hubík K.: *Farmář* 6, 21 (2000).
- Kunteová L.: *Úroda* 48, 28 (2000).
- Petr J., Novotná D., Capouchová I., Faměra O.: *Rostl. Výroba* 45, 145 (1999).
- Tichý F., Hubík K.: *Farmář* 4, 13 (1998).
- Petr J.: *Úroda* 54, 19 (2006).
- Wu X., Zhao R., Wang D., Bean S. R., Seib P. A., Tuinstra M. R., Campbell M., O'Brien A.: *Cereal Chem.* 83, 569 (2006).
- Wu X., Zhao R., Bean S. R., Seib P. A., McLaren J. S., Madl R. L., Tuinstra M., Lenz M. C., Wang D.: *Cereal Chem.* 84, 130 (2007).
- Rosenberger A.: *Zuckerindustrie* 130, 697 (2005).
- Rosenberger A., Kaul H. P., Senn T., Aufhammer W.: *Ind. Crops Prod.* 15, 91 (2002).
- Rosenberger A., Kaul H. P., Senn T., Aufhammer W.: *J. Agronom. Crop Sci.* 185, 55 (2000).
- Jendleman J. A.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 171 (2000).
- Anker-Nilssen K., Faergestad E. M., Sahlström S., Uhlen A. K.: *Anim. Feed Sci. Technol.* 130, 3 (2006).
- Hiele M., Ghooos Y., Rutgeerts P., Vantrappen G., de Buyser K.: *Gut* 31, 175 (1990).
- Barredo Moguel L. H., Rojas de Gante C., Serna Saldivar S. O.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59, 24 (2001).
- Kabir M., Rizkalla S. W., Champ M., Luo J., Boillot J., Bruzzo F., Slama G.: *J. Nutr.* 128, 35 (1998).
- Noda T., Kimura T., Otani M., Ideta O., Ideta O., Shimada T., Saito A., Suda I.: *Carbohydr. Polym.* 49, 253 (2002).
- Noda T., Nishiba Y., Sato T., Suda I.: *Cereal Chem.* 80, 193 (2003).
- Stevnebo A., Sahlström S., Svihus B.: *Anim. Feed Sci. Technol.* 130, 23 (2006).
- Słomińska L., Wiśniewska D., Grześkowiak A.: *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2, 17 (2003).
- Nebesny E., Rosicka J., Tkaczyk M.: *Starch/Stärke* 54, 603 (2002).
- Sasaki T., Yasui T., Matsuk J., Satake T.: *Cereal Chem.* 79, 861 (2002).
- Evans A., Thompson D. B.: *Cereal Chem.* 81, 31 (2004).
- Swanston J. S., Ellis R. P., Stark J. R.: *J. Cereal Sci.* 22, 265 (1995).
- Morris C. F., Konzak C. F.: *Crop Sci.* 41, 934 (2001).

D. Mikulíková^a, V. Horváthová^b, and A. Žofajová^a
(^a *Research Institute of Plant Production, Piešťany, Slovak Republic*, ^b *University of SS. Cyril and Methodius, Trnava, Slovak Republic*): **Starch Level and Composition of Wheat, Rye and Triticale Grains**

The aim of the present study was to evaluate the influence of genetic and environmental factors on main wheat grain parameters important in bioethanol production – starch content, amylose/amylopectin ratio, and α -amylase (α -AMS) activity. Forty-eight wheat cultivars from two different years and 16 cultivars from four Slovak regions were assessed. In addition, the parameters of

wheat, rye and triticale were compared. Differences between individual cereals and their cultivars in all three parameters were found. The highest starch content was observed in wheat cultivars grown in the locality Vígľaš-Pstruša. The starch content and α -AMS activity were markedly high at low temperatures and with more rainfall during grain maturation. The locality and year did not affect the amylose/amylopectin ratio. From the viewpoint of evaluated parameters, new Slovak cultivars Pavlina and Veldava offer good prospects in bioethanol production. Both the cultivars show high starch and amylopectin contents and the α -AMS activity.

HODNOCENÍ VLASTNOSTÍ PŠENIČNÉHO TĚSTA ANALÝZOU NIR SPEKTER MOUKY

ONDŘEJ JIRSA^a, MARIE HRUŠKOVÁ^b a IVAN ŠVEC^b

^a Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, Kroměříž,
^b Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola
chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28
Praha 6
j.cenda@volny.cz

Došlo 7.9.07, přijato 4.2.08.

Klíčová slova: difusní reflektance, NIR spektroskopie,
pšeničná mouka, těsto, reologie

Úvod

Blízká infračervená (NIR) spektroskopie zaujímá významné místo mezi používanými metodami pro stanovení chemických a fyzikálních vlastností potravin a potravinových produktů. Tato analytická metoda spočívá v takových interakcích elektromagnetického záření s hmotou, které jsou spojeny s výměnou energie mezi hmotou a zářením, přičemž energie NIR záření může změnit pouze vibrační nebo rotační stav molekuly. Oblast NIR záření bývá obvykle definována rozsahem vlnových délek 780 nm až 2500 nm, mezi infračervenou a viditelnou částí spektra. Tento rozsah odpovídá frekvencím (ve vakuu) mezi $3,84 \cdot 10^{14}$ a $1,20 \cdot 10^{14}$ Hz a vlnočtům mezi 12820 a 4000 cm^{-1} . Tato technika je dostatečně známá a její použití v potravinářství bylo již v tomto časopise popsáno¹.

Hodnocení cereálních materiálů NIR spektroskopií

Pro průmyslovou výrobu běžného pečiva je důležité objasnit složité chemické, biochemické a fyzikálně-chemické pochody probíhající během fermentace, aby bylo možno cílenými zásahy dosahovat požadované kvality hotových výrobků. Pro zjištění vlastností mouky a těsta se používá řada klasických metod. K základním ukazatelům pšeničné mouky patří obsah bílkovin a mokrého lepku, hodnota Zeleného sedimentace (ukazatel bobtnavosti lepku) a číslo poklesu (ukazatel stavu škrobovo-amylasového komplexu, zejména aktivity α -amylasy). Vlastnosti základních složek mouky a jejich chování v technologickém procesu se sledují uzančnými metodami, které mají simulovat jeho jednotlivé fáze. Např. přístroj fermentograf kombinuje sledování vývinu plynu a změny objemu těsta za standardních podmínek během první fáze fermentace (tj.

zrání) a zaznamenává průběh těchto procesů odděleně ve dvou grafech.

Kromě zmíněných klasických přímých metod hodnocení kvality se běžně používá nepřímá metoda NIR spektroskopie. Měření v blízké infračervené oblasti je využíváno především pro hodnocení kvality a obsahu složek v rozsáhlých sériích vzorků stejného či velmi podobného chemického složení. V této oblasti se velmi výrazně, především v reflektančních spektrech, projeví vlhkost a granulace vzorku, původ a ročník sklizně apod. Původ a klimatické podmínky se projeví v různé koncentraci složek v měřených materiálech, které jsou ve spektru dobře postižitelné.

V cereálním oboru přineslo využití NIR spektroskopie úspěšné výsledky při sledování kvalitativních ukazatelů. Predikce analytických ukazatelů pšeničné mouky byla intenzivně zkoumána v 80. letech a stanovení obsahu základních složek bylo zavedeno do mlýnsko-pekárenské praxe s přesností, která umožnila ve značné míře nahradit přímé instrumentální metody. Problematiku použití NIR metody pro zemědělské a potravinářské produkty dobře podává např. Williams a Norris². NIR technologie je velmi vhodná pro stanovení obsahu bílkovin, vlhkosti a popela v mouce a semolině. Mimoto mohou být získány užitečné informace o vaznosti, poškození škrobu, granulaci a barvě³. Ukazatele související s kvalitou dávají nižší úspěšnost predikce podle toho, do jaké míry jsou příčinné složky (bílkoviny, škrob aj.) reflektovány v NIR spektrech. Metoda byla aplikována i pro sledování kvalitativních ukazatelů mouky (hodnota Zeleného sedimentace, číslo poklesu, vaznost mouky aj.) a nefermentovaného těsta (doba vývinu těsta, stabilita těsta, odpor těsta k deformaci aj.) a objemu pečiva⁴⁻⁷. Dále byla sledována použitelnost NIR techniky i pro predikci dalších ukazatelů fermentovaného těsta, např. objemu fermentačních plynů^{8,9}. Kromě hodnocení jednotlivých ukazatelů bylo ověřeno rozlišení odrůd a skupin vzorků, které se liší svou pekařskou kvalitou^{10,11}.

Použití NIR je výhodné pro velké série měření, protože se jedná o rychlou techniku se schopností odhadnout velký počet parametrů z jednoho měření konkrétního vzorku. Další výhodou je, že pro analýzu stačí pouze malé množství vzorku. Jediná zkouška tak může stanovit nejvýznamnější složky mouky. Hodnocení vzorků mouk klasickými přímými metodami neposkytuje výsledky v dostatečně krátké době, což zdržuje nápravná opatření. NIR reflektance může poskytnout informace o chemických i fyzikálních charakteristikách vzorků mouky a má potenciál pro řízení kvality on-line.

Experimentální část

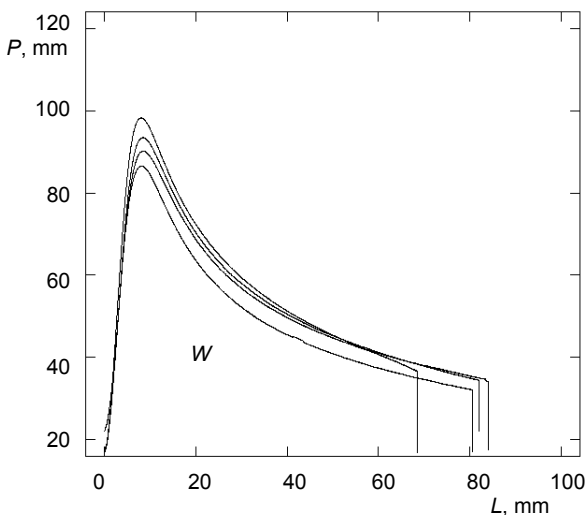
V práci bylo použito 281 vzorků pšeničných mouk, z toho 201 odrůdových (vyrobených z odrůd potravinářské pšenice) a 80 komerčních (vyrobených z potravinářské pšenice přijímané do mlýna). Odrůdové mouky pocházely ze šlechtitelských pokusů SELGEN Stupice (sklizeň 2003 až 2005), VÚRV Ruzyně (sklizeň 2003 až 2005) ze ZVÚ

Kroměříž (sklizeň 2004 až 2006). Komerční vzorky pocházely z potravinářských pšeníc dodávaných ze tří oblastí středních Čech. Mouky byly připraveny pokusným mletím na laboratorním mlýnu Chopin CD1-auto při dosahované výtěžnosti 60 až 70 %. Pro všechny vzorky byla získána spektra v blízké infračervené oblasti na dvou typově odlišných přístrojích.

Stanovení obsahu bílkovin a vlhkosti bylo provedeno spektrometricky na přístroji Inframatic 8600. Pro zjištění Zeleného sedimentačního hodnoty byla použita klasická metoda s přístrojem SEDI-TESTER (ZZN Strakonice) podle normy ČSN ISO 5520. Jedná se o sedimentační test, kterým se zjišťuje objem usazených částic mouky z několikrát promíchané suspence mouky a roztoku kyseliny mléčné a isopropanolu.

Alveografická zkouška

Alveograf měří odolnost těsta proti deformaci a rozsah, ve kterém může být těsto napínáno za podmínek metody. V této práci byl použit pracovní postup podle normy ČSN ISO 5530-4. Těsto se standardně připravuje v alveografické hnětačce z pšeničné mouky a solného roztoku, s konstantním obsahem vody bez ohledu na vaznost (množství vody potřebné pro dosažení standardní konzistence těsta). Změny v pružnosti a tažnosti těsta při uzančně provedené trojrozměrné deformaci a jejich poměr umožňují po stanovené době odležení predikovat chování těsta ve výrobě. Podle deformační energie lze odlišit tzv. pekařsky silné a slabé mouky a zajistit požadované úpravy těchto



Obr. 1. Záznam alveografické zkoušky; provádí se pět měření, pro vyhodnocení jsou třeba alespoň tři vyhovující křivky. P (mm) – maximální přetlak (výška křivky), L (mm) – průměrná hodnota prasknutí (délka křivky), W (10^{-4} J) – deformační energie (odpovídá ploše pod křivkou)

charakteristik např. přidávkem enzymů nebo kyseliny askorbové.

Ze záznamu (obr. 1) byly vyhodnocovány čtyři charakteristiky:

- 1) Maximální přetlak, P (mm H_2O), daný výškou maxima křivky. Označuje se jako pružnost a udává odpor těsta k deformaci.
- 2) Průměrná hodnota prasknutí, L (mm), což je vzdálenost na vodorovné souřadnici od prvního vzestupu křivky do prvního prudkého zlomu na křivce při přetržení těsta. Označuje se jako tažnost.
- 3) Konfigurační poměr křivky, P/L . Počítá se jako poměr pružnosti a tažnosti a udává vyrovnanost vlastností.
- 4) Deformační energie těsta, W (10^{-4} J). Počítá se z plochy pod křivkou a souvisí s mechanickou energií nutnou pro vyhnětení těsta.

Fermentografická zkouška

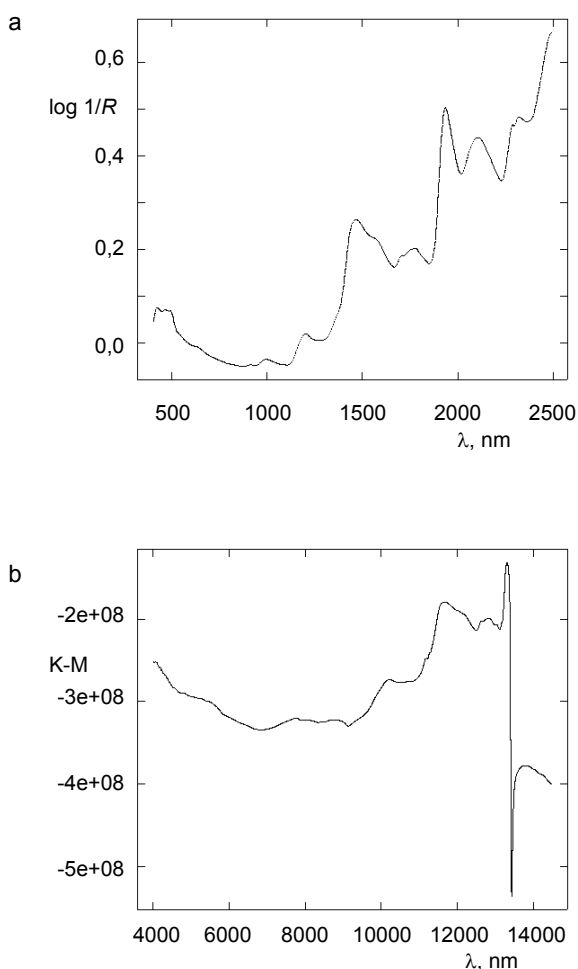
Pro hodnocení objemu vyprodukovaného plynu během fermentace byla použita zkouška na fermentografu SJA, která není upravena mezinárodní ani českou normou. Proto byl použit postup vypracovaný podle doporučení výrobce (interní metodika VŠCHT Praha)¹². Těsto bylo připraveno na farinografu (Brabender, SRN) za standardních podmínek (hnětačka temperovaná na 30 °C) podle této receptury: 300 g mouky, droždí 4,0 %, cukr 1,5 %, tuk 1,0 %, sůl 0,7 % a voda v množství pro dosažení optimální konzistence (600 ± 20) farinografických jednotek. Dva vzorky těsta o hmotnosti 150 g byly poté umístěny do dvou fermentačních válců, kde probíhala fermentace po dobu 160 min při 30 °C.

Ze dvou záznamů se vyhodnocují tři charakteristiky:

- 1) Objem kvasných plynů, V_{pl} (FeJ, fermentografická jednotka), tj. úsek na svislé ose od počátku zkoušky do dosažení maxima křivky na konci měření objemu plynu. Závislost je zpravidla lineární.
- 2) Konečný objem těsta, V_t (FeJ), tj. úsek na svislé ose od počátku zkoušky do dosažení maxima křivky na konci měření hladiny těsta. Odpovídá nárůstu objemu těsta během dokynutí.
- 3) Doba maximálního nárůstu, T (min), tj. časový úsek, ve kterém je dosaženo max. objemu těsta před zborcením jeho struktury.

Infračervená spektroskopie

Reflektanční infračervená spektra v rozsahu vlnových délek 400–2500 nm s rozlišením 2 nm (obr. 2a) byla získána na přístroji NIRSystems 6500 (Perstorp Analytical, USA). Jedná se o dispersní spektrofotometr vybavený mřížkovým monochromátorem a wolframovou žárovkou jako zdrojem světla. Pro získání referenčních dat používá přístroj vnitřní keramický standard. Vzorky mouk byly proměřovány v malých kruhových kyvetách o průměru 38 mm a výšce 8 mm, které jsou opatřeny křemenným sklíčkem propustným pro NIR záření. Objem kyvety byl zcela naplněn moukou v množství 3–5 g. Spektrum každé-



Obr. 2. a) NIR spektrum odrůdové mouky (NIRSystem 6500), reflektance je vyjádřena jako $\log(1/R)$; b) FT-NIR spektrum odrůdové mouky (Bruker IFS66v), reflektance je vyjádřena jako Kubelkova-Munkova funkce (K-M); λ je vlnová délka

ho vzorku bylo průměrem dvou měření v téže kyvetě bez nového plnění, s pootočením kyvetu o 90°. V každém měření bylo provedeno 36 akumulací spektra. Pro zaznamenání dat byl použit program WinISI II (Infrasoft International, USA).

Spektra v NIR spektrální oblasti v rozsahu vlnočtů 14500–4000 cm^{-1} (obr. 2b) byla získána na FT-IR spektrometru Bruker IFS 66v/S v Laboratoři molekulové spektroskopie VŠCHT. Měření bylo provedeno metodou difusně reflektanční spektroskopie (DRIFTS). Byl použit Ge/Sn detektor a jako pozadí leštěné ocelové zrcátko. Spektra byla snímána s rozlišením 16 cm^{-1} při počtu akumulací 1024 a apodizací Happ-Genzel. Každý vzorek byl proměřen třikrát a v programu OMNIC bylo získáno průměrné spektrum.

Statistická analýza

Pro kalibraci byly použity odrůdové mouky, nezávislá validace byla provedena souborem mouk z komerčních pšenic. Zpracování spekter a výpočet kalibračních rovnic byl prováděn ve statistickém prostředí R s použitím běžných chemometrických postupů užívaných v NIR spektroskopii zemědělských a potravinářských materiálů². Všechna získaná spektra byla před zpracováním matematicky upravena. Pro vyhlazení a derivaci byla použita konvoluce¹³ polynomem třetího stupně v segmentu pěti bodů. Spektra byla upravena metodou SNV (Standard Normal Variate), která koriguje vliv nestejného rozptylu záření.

Kalibrační modely byly vypočteny metodou částečných nejmenších čtverců (PLS). Touto metodou jsou vyvinuty regresní modely použitím skóre (tj. vlastních čísel) každého spektra po rozložení souboru kalibračních spekter na soubor hlavních komponent (vážených indexem referenčních hodnot), jinak známých jako vlastní vektory. Analýza PLS byla provedena dvěma způsoby. V jednom nebyla použita korekce rozptylu světla, ve druhém byl použit algoritmus SNV na všechna spektra před analýzou za účelem minimalizace rozdílů v rozptylu světla mezi vzorky, které jsou způsobeny potenciálně nestejnou hustotou plnění mouky v kyvetě nebo rozdíly v distribuci částic mouky mezi vzorky. Odlehlé vzorky zjištěné během vývoje kalibračního modelu nebyly vyřazovány.

K optimalizaci kalibračních modelů a detekci odlehklých hodnot byla použita vzájemná validace s vyloučením jednoho vzorku. Optimální počet členů modelu byl vybrán podle hodnoty střední chyby vzájemné validace (SECV). Protože rozhodujícím měřítkem pro posouzení kvality kalibrační rovnice jsou výsledky validace, případně vzájemné validace, byl model po dokončení kalibrace validován použitím nezávislého souboru pšeničných mouk, který nebyl zahrnut při tvorbě modelu. Výkonnost každého modelu byla stanovena jako multivariační koeficient determinace (R^2) validačního souboru. Chyba modelu byla udávána jako odmocnina z průměrného čtverce rozdílů mezi měřenými a modelovanými hodnotami – tj. střední chyba kalibrace, vzájemné validace a predikce (SEC, SECV a SEP). Pro srovnání modelové chyby mezi ukazateli byly použity bezrozměrné statistiky jako např. variační koeficient (CV).

Výsledky a diskuse

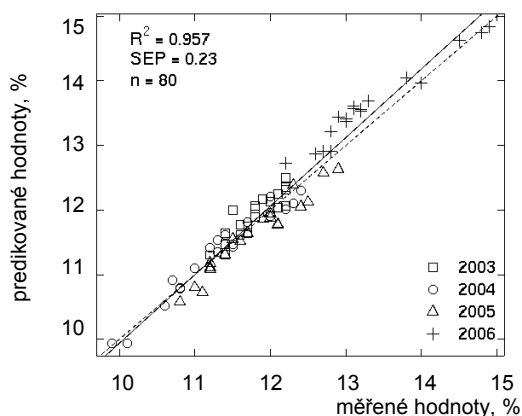
Pro sedm jakostních znaků (obsah bílkovin, hodnota Zeleného sedimentace, alveografické parametry – pružnost, tažnost, konfigurace křivky a energie, a fermentografický objem plynu) byly vytvořeny kalibrační modely ze spekter získaných na dvou přístrojích. Pro analýzu FT-NIR byly použity stejné vzorky jako v případě NIR, avšak nižší počet kalibračních vzorků (nevyhovující spektra). Kalibrační soubor byl sestaven z 201, resp. 171, vzorků odrůdových pšenic. Souhrn analytických a reologických vlastností mouk z odrůdových a komerčních pšenic je uveden

Tabulka I
Charakteristika souborů mouk

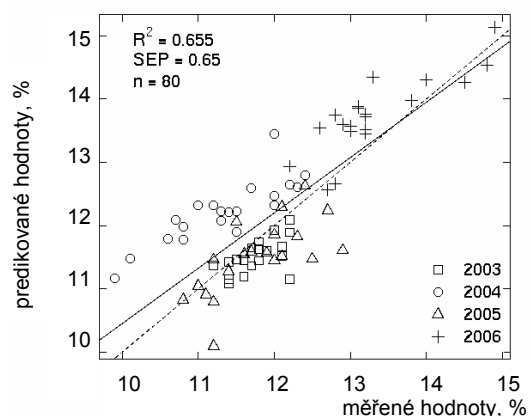
Ukazatel	n^a	Průměr	Rozpětí		Směrodatná odchylna	Variační koeficient
			min.	max.		
<i>Mouky z odrůdových pšeníc</i>						
Bílkoviny, % v s.	201	12,2	8,6	16,1	1,34	11,0
Zeleného sedimentace, ml	201	48	21	72	12,3	25,6
Pružnost, mm	178	108	46	213	33	30,6
Tažnost, mm	181	47	15	91	15,7	33,4
Konfigurace křivky	178	2,46	0,60	10,14	1,47	59,8
Deformační energie, 10^{-4} J	178	177	48	377	65	36,7
Objem kvasných plynů, FeJ	201	114	56	145	13,6	11,9
<i>Mouky z komerčních pšeníc</i>						
Bílkoviny, % v s.	80	12,1	9,9	14,9	0,96	7,9
Zeleného sedimentace, ml	80	46	33	66	7,6	16,5
Pružnost, mm	80	102	61	170	28	27,4
Tažnost, mm	80	60	28	109	22,1	36,8
Konfigurace křivky	80	2,10	0,66	5,64	1,29	61,4
Deformační energie, 10^{-4} J	80	182	127	297	37	20,3
Objem kvasných plynů, FeJ	80	121	101	134	6,6	5,5

^a Počet vzorků

a



b



Obr. 3. a) Nezávislá validace modelu pro bílkoviny z NIR spekter, — dosažená regresní přímka, ---- ideální regresní přímka; b) Nezávislá validace modelu pro bílkoviny z FT-NIR spekter, — dosažená

v tabulce I. Soubor komerčních pšeníc se vyznačuje užším rozpětím hodnot, které zpravidla nepřesahuje rozsah kalibračního souboru, a srovnatelnými průměrnými hodnotami. Větší rozdíl je pouze v alveografické tažnosti, kdy soubor

mouk z komerčních pšeníc má vyšší hodnoty a přesahuje svým rozsahem soubor odrůdových pšeníc.

Na obr. 2 jsou uvedena NIR a FT-NIR spektra kalibračního souboru. Narozdíl od NIR spekter zaznamenaných

Tabulka II
Výsledky kalibrace získané metodou PLS

Ukazatel	n^a	Počet faktorů	Kalibrace			Vzájemná validace		
			SEC ^b	CV ^c [%]	R^2	SECV ^d	CV [%]	R^2
<i>NIR spektra</i>								
Bílkoviny, % v s.	201	6	0,22	1,8	0,972	0,30	2,5	0,949
Zeleného sedimentace, ml	201	3	7,3	15,2	0,650	7,7	16,0	0,604
Pružnost, mm	178	4	18	16,9	0,694	21	19,6	0,589
Tažnost, mm	181	5	7,6	16,2	0,768	9,0	19,1	0,668
Konfigurace křivky	178	5	0,75	30,5	0,736	0,94	38,2	0,589
Deformační energie, 10^{-4} J	178	4	31	17,5	0,769	36	20,3	0,704
Objem kvasných plynů, FeJ	201	6	6,5	5,7	0,775	8,9	7,8	0,578
<i>FT-NIR spektra</i>								
Bílkoviny, % v s.	171	9	0,53	4,4	0,817	0,67	5,5	0,703
Zeleného sedimentace, ml	171	7	8,2	17,8	0,579	9,9	21,5	0,408
Pružnost, mm	151	7	22	21,2	0,623	26	25,5	0,443
Tažnost, mm	151	8	7,3	12,2	0,667	10	17,0	0,376
Konfigurace křivky	151	5	1,11	52,9	0,456	1,26	60,0	0,312
Deformační energie, 10^{-4} J	151	7	35	19,2	0,542	43	23,6	0,326
Objem kvasných plynů, FeJ	171	8	7,3	6,0	0,665	9,3	7,7	0,458

^a Počet vzorků, ^b střední chyba kalibrace, ^c koeficient variace, ^d střední chyba vzájemné validace

jako závislost difusní reflektance vyjádřené jako $\log(1/R)$ na vlnové délce byla FT-NIR spektra zaznamenána jako závislost reflektance vyjádřené Kubelkovou-Munkovou funkcí na vlnočtu. Rozdíl je také v menším intervalu vlnových délek FT-NIR spekter (5180–14500 cm^{-1} , tj. 690 až 1930 nm). Protože vztah mezi vlnočtem a vlnovou délkou není lineární, byly pro výpočet modelů použity původní veličiny. Kalibrační modely vybraných sedmi jakostních ukazatelů vypočítané z NIR a FT-NIR spekter byly porovnány podle výsledků vzájemné a nezávislé validace. FT-NIR modely byly vypočteny z menšího počtu vzorků, protože některá spektra byla nevyhovující. Přehled výsledků kalibrace (statistiky kalibrace a vzájemné validace) vybraných technologických ukazatelů je uveden v tab. II. Obdobné statistiky nezávislé validace souborem komerčních pšeníc jsou uvedeny v tab. III.

Predikce analytických znaků pšeničné mouky

Při predikci analytických ukazatelů byly potvrzeny zkušenosti z literatury. Nejspolehlivější byl model pro obsah bílkovin, jehož přesnost (SECV = 0,30 %) se blížila referenční metodě. Ze statistiky kalibrace (tab. II) je zřejmá nižší přesnost predikce v kalibračním souboru ve srovnání s NIR spektry. S FT-NIR spektry byla chyba predikce

přibližně dvojnásobná (SECV = 0,67 %), což představuje největší rozdíl mezi NIR a FT-NIR. Nezávislá validace (obr. 3) poskytla srovnatelnou úspěšnost predikce jako vzájemná validace (SEP = 0,22 % pro NIR a 0,65 % pro FT-NIR). Mezi průměry predikovaných a referenčních hodnot byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Rovněž jednotlivé ročníky validačních vzorků se vzájemně odlišovaly a vytvářely shluky, což naznačuje vhodnost korekce modelu pro jednotlivé ročníky. Potenciál regresního modelu PLS/SNV FT-NIR dat jako rychlé metody pro zjištění důležitých mlynářských a pekařských vlastností zkoušel také Sorvaniemi¹⁴. S laboratorně připravenými moukami získal kalibrace pro bílkoviny SEP = 0,40 %.

Pro Zeleného sedimentační hodnotu umožnil model pouze hrubý odhad hodnot, přesto pro praxi využitelných. Chyba odhadu Zeleného hodnoty v případě kalibračních vzorků byla do 1,3násobku a přibližně dvojnásobná pro validační vzorky. Přesnost predikce z FT-NIR spekter (SECV = 9,9 ml) byla v kalibračním souboru (tab. II) nižší ve srovnání s NIR spektry (SECV = 7,7 ml). Nezávislá validace (tab. III) poskytla s FT-NIR srovnatelnou úspěšnost predikce (SEP = 9,5 ml) jako vzájemná validace (tab. II), hodnoty však byly zcela nekorelované. S NIR byla při nezávislé validaci dosažena nižší chyba (SEP = 5,1 ml). Mezi průměry predikovaných a referenčních hodnot byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Rozdíly mezi

Tabulka III
Výsledky nezávislé validace

Ukazatel	n^a	Průměr	SEP ^b	CV ^c [%]	R^2	Sklon	Bias	RPD ^d
<i>NIR spektra</i>								
Bílkoviny, % v s.	80	12,1	0,23	1,9	0,957	1,061	-0,071	4,12
Zeleného sedimentace, ml	80	46	5,1	11,1	0,577	0,453	0,9	1,48
Pružnost, mm	80	102	18	17,6	0,710	0,411	-4,6	1,56
Tažnost, mm	80	182	10	5,5	0,817	0,681	2,5	2,22
Konfigurace křivky	80	2,1	0,68	32	0,747	0,876	0,20	1,92
Deformační energie, 10^{-4} J	80	182	34	18,7	0,493	0,906	-18	1,09
Objem kvasných plynů, FeJ	80	121	8,5	7,0	0,000	-0,001	5,5	0,78
<i>FT-NIR spektra</i>								
Bílkoviny, % v s.	80	12,1	0,62	5,1	0,655	0,875	-0,2	1,54
Zeleného sedimentace, ml	80	46	9,5	20,7	0,000	-0,013	-4,0	-1,89
Pružnost, mm	78	102	33	32,2	0,002	-0,028	1,0	0,85
Tažnost, mm	78	182	23	12,6	0,005	0,025	1,4	0,97
Konfigurace křivky	78	2,1	1,30	62	0,122	0,242	0,23	0,99
Deformační energie, 10^{-4} J	78	182	30	16,4	0,362	0,449	16	1,08
Objem kvasných plynů, FeJ	80	121	8,5	7,0	0,001	0,028	1,0	0,78

^a Počet vzorků, ^b střední chyba predikce, ^c koeficient variace, ^d ukazatel relativního výkonu

ročníky nebyly tak výrazné jako v případě bílkovin, přesto bylo možné rozlišit ročníkové skupiny vzorků.

Predikce vlastností nefermentovaného těsta

Vlastnosti nekynutého těsta byly hodnoceny na alveografu. Ukázalo se, že alveografické charakteristiky (pružnost, tažnost, konfigurace křivky a energie), které souvisejí zejména s bílkovinami, lze odhadovat s přesností, která je srovnatelná s odhadem Zeleného hodnoty. Při použití FT-NIR spekter pro alveografickou pružnost, tažnost a konfiguraci křivky byla chyba predikce kalibračních vzorků do 1,3násobku a přibližně dvojnásobná pro validační vzorky ve srovnání s NIR spektry. Pro deformační energii byla chyba srovnatelná v případě kalibračních (tab. II) i validačních (tab. III) vzorků. Při validaci se projevily systematické odchylky pro jednotlivé ročníky, podobně jako pro analytické ukazatele.

Přesnost predikce pružnosti byla s FT-NIR spektry v kalibračním souboru nižší (SECV = 26 mm) ve srovnání s NIR spektry (SECV = 21 mm). Nezávislá validace poskytla menší přesnost predikce s FT-NIR (SEP = 33 mm) než vzájemná validace a nekorelovanost hodnot, ale větší přesnost s NIR (SEP = 18 mm). Mezi průměry predikovaných a referenčních hodnot nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Přesnost predikce tažnosti při vzájemné

validaci (SECV = 10,2 mm) byla s FT-NIR v kalibračním souboru srovnatelná s NIR spektry (SECV = 9,0 mm). Nezávislá validace souborem komerčních pšeníc poskytla s FT-NIR nedostatečnou úspěšnost predikce (SEP = 23 mm) proti vzájemné validaci, zatímco s NIR spektry byla srovnatelná (SEP = 10 mm). Mezi ročníky byly zjištěny významné systematické odchylky.

Přesnost predikce konfigurace křivky byla s FT-NIR v kalibračním souboru nižší (SECV = 1,26) ve srovnání s NIR spektry (SECV = 0,94). Nezávislá validace souborem komerčních pšeníc poskytla vyšší úspěšnost predikce (SEP = 0,68) s NIR spektry, ale nižší s FT-NIR (SEP = 1,30). Přesnost predikce deformační energie byla v kalibračním souboru nižší s FT-NIR (SECV = $43 \cdot 10^{-4}$ J) ve srovnání s NIR spektry (SECV = $36 \cdot 10^{-4}$ J). Kalibrační vzorky vykázaly slabou korelaci (tab. II). Nezávislá validace komerčními pšenicemi poskytla srovnatelnou úspěšnost predikce (SEP = $30 \cdot 10^{-4}$ J pro FT-NIR a $34 \cdot 10^{-4}$ J pro NIR) jako vzájemná validace.

Predikce vlastností fermentovaného těsta

Chování kynutého těsta během I. fáze fermentace bylo hodnoceno na fermentografu. Sledována byla fermentační schopnost vyjádřená jako objem vytvořeného plynu na konci zkoušky. Fermentografický objem plynu byl jediným ukazatelem kynutého těsta, který byl modelován ze

spekter. S NIR i FT-NIR spektry byly získány srovnatelné chyby predikce v případě kalibračních (tab. II) i validačních (tab. III) vzorků. Odhad objemu kvasných plynů byl srovnatelný s odhadem Zeleného sedimentace. Přesnost predikce z FT-NIR spekter (SECV = 9,3 FeJ) byla v kalibračním souboru nižší ve srovnání s NIR spektry (SECV = 8,9 FeJ). Nezávislá validace souborem komerčních pšenic ukázala na nekorelovanost mezi odhadnutými a referenčními hodnotami, ale chyba predikce byla nižší (SEP = 8,5 FeJ) než v případě vzájemné validace. Pro jednotlivé ročníky se chyba predikce pohybovala v rozsahu 5,4 až 7,7 FeJ pro FT-NIR, resp. 7,1 až 10,2 FeJ pro NIR.

Modely pro predikci chování fermentovaného těsta jsou unikátní a v literatuře nebylo nalezeno ekvivalentní srovnání. Úspěšnost predikce ukázala na možnost využití NIR pro diskriminační analýzu odlišných skupin vzorků v souborech s velkou variabilitou hodnot.

Závěr

Předložená práce se zabývala posouzením možnosti NIR spektroskopie při predikci technologické kvality v jednotlivých stupních obilní vertikály od zrna a mouky až po hotový výrobek. Použity byly dva typy přístrojů – mřížkový (NIRSystem 6500) a interferometrový (Bruker IFS66v). Nové poznatky přináší práce zejména ve spojení NIR s hodnocením vlastností těsta. Při predikci se ukázalo, že její přesnost byla významně ovlivněna ročníkem sklizně pšenice, z čehož vyplývá vhodnost nastavení kalibračních rovnic pro konkrétní ročník. Pro řadu parametrů souvisejících s pekařskou kvalitou byly vyvinuty dobré NIR kalibrace. Kromě hodnocení analytických ukazatelů (obsah bílkovin, Zeleného sedimentace) metoda umožnila screeningově hodnotit i některé funkční vlastnosti pšeničné bílkoviny hodnocené uzančnými reologickými přístroji (alveograf) a v omezené míře i vlastností kynutého těsta. Příklad komerčního využití představuje např. NIR analyzátor DA7200 (Perten), který umožňuje hodnotit alveografickou energii.

Při použití FT-NIR spekter se ukázala celkově nižší přesnost predikce vlastností kalibračních i validačních vzorků ve srovnání s NIR spektry, což bylo zřejmě způsobeno odlišným způsobem prezentace vzorků použitého typu FT-IR spektrometru, který není specificky přizpůsoben pro měření potravinářských materiálů, na rozdíl od mřížkového spektrofotometru. Protože referenční data byla shodná, příčinu je třeba hledat ve vlastních FT-NIR spektrech. Rozdíly v úspěšnosti predikce modelů získaných z obou typů NIR spekter souvisely s chybou referenční metody – větší rozdíly odpovídaly menší chybě stanovení. Pro deformační energii a fermentografický objem plynu byly získány srovnatelné výsledky s oběma přístroji.

Autoři článku děkují pracovníkům Laboratoře molekulové spektroskopie VŠCHT za pomoc při měření spekter na přístroji Bruker IFS66v a institucím (Selgen a. s., VÚRV, v.v.i., ZVÚ Kroměříž, s.r.o., a Jaroslav Chochole, DELTA – obchodní podnik) za poskytnutí vzorků pšenice.

Symbole a zkratky

CV	koeficient variace
FeJ	fermentografická jednotka
P	maximální přetlak
L	průměrná hodnota prasknutí
P/L	konfigurační poměr alveografické křivky
SEC	střední chyba kalibrace
SECV	střední chyba vzájemné validace
SEP	střední chyba predikce
SNV	standard normal variate
V_{pl}	objem kvasných plynů
V_t	konečný objem těsta
T	doba maximálního nárůstu objemu těsta
W	deformační energie těsta

LITERATURA

- Čopíková J., Novotná M., Šmidová I., Snytytsya A., Černá M.: Chem. Listy 97, 571 (2003).
- Williams P. C., Norris K. (ed.): *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul 2001.
- Gradenecker F.: Cereal Foods World 48, 18 (2003).
- Williams P. C., El-haramein F. J., Oritz-Ferreira G., Srivastava J. P.: Cereal Chem. 65, 109 (1988).
- Delwiche S. R., Graybosch R. A., Peterson C. J.: Cereal Chem. 75, 412 (1998).
- Rubenthaler G. L., Pomeranz Y.: Cereal Chem. 64, 407 (1987).
- Delwiche S. R., Weaver G.: J. Food Sci. 59, 410 (1994).
- Jirsa O., Hrušková M.: Czech J. Food Sci. 23, 184 (2005).
- Jirsa O., Hrušková M., Švec I.: Scientia Agriculturae Bohemica 37, 146 (2006).
- Devaux M. F., Bertrand D., Martin G.: Cereal Chem. 63, 151 (1986).
- Jirsa O., Hrušková M., Švec I.: Getreidetechnologie 61, 150 (2007).
- Švec I., Hrušková M.: Czech. J. Food Sci. 22, 17 (2004).
- Savitzky A., Golay M. J. E.: Anal. Chem. 36, 1627 (1964).
- Sorvaniemi J., Kinnunen A., Tsados A., Maelkki Y.: Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 26, 251 (1993).

O. Jirsa, M. Hrušková, and I. Švec (*Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Evaluation of Wheat Dough Properties by NIR Spectral Analysis of Flour**

The article deals with the possibility of predicting technological quality of dough by NIR spectroscopy. Seven quality indices were evaluated – the protein content,

Zeleny sedimentation value, four alveograph indices, and gas volume – using a dispersion NIR spectrometer and interferometer. It was shown that the prediction was significantly influenced by the crop year. In addition to evaluation of quality indices, the method made it possible to evaluate functional properties of wheat proteins as measured by usual rheological instruments with a screen-

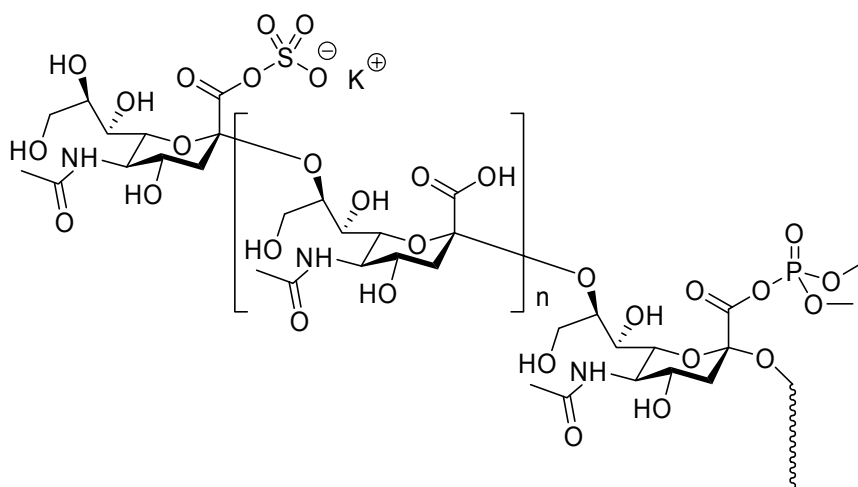
ing performance and, to a limited extent, also properties of fermented dough. Using FT-NIR spectra, lower prediction values were generally obtained when compared with NIR spectra. The differences in prediction performance between both types of spectra were related to experimental errors – the lower experimental error, the greater differences.

Ústav chemie a technologie
sacharidů VŠCHT Praha



Ústav živočišné fyziologie
a genetiky AV ČR

Česká společnost chemická



POLYSACHARIDY IV:
„ANALÝZA, REAKCE A BIOLOGICKÉ ÚČINKY
POLYSACHARIDŮ A JEJICH DERIVÁTŮ,
INŽENÝRSKÉ ASPEKTY PRODUKCE NA BÁZI POLYSACHARIDŮ“

13.–14. listopadu 2008
Novotného lávka 5, Praha 1

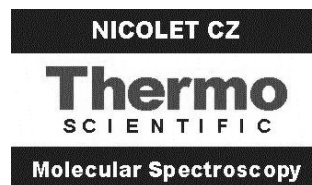
Když pracovníci Ústavu chemie a technologie sacharidů VŠCHT organizovali první konferenci o polysacharidech v roce 2005 nebyli si – upřímně řečeno – jisti úspěchem. Naštěstí realita byla jiná a tato konference se letos již bude konat počtvrté – a s mezinárodní účastí. Odborníci v této oblasti i široká chemická obec viditelně nepochybují o významu polysacharidů, takže fórum, kde je možné se seznámit s nejnovějšími výsledky bádání v tomto oboru, si našlo své opodstatnění. Tak tomu bude i letos, kdy hlavními směry přednesených příspěvků i posterů budou otázky struktury polysacharidů, moderních analytických metod a fyziologických účinků polysacharidů; teoreticky směřované příspěvky budou vyváženy příspěvky technologického zaměření a samozřejmě i příspěvky, zabývajícími se – v současné době značně zpolitizovaným – využitím polysacharidů jako suroviny pro alternativní zdroje energie.

Doufám (a ve skrytu duše jsem i přesvědčen), že letošní konference bude nejméně stejně úspěšná jako všechny předchozí.

Miroslav Novák

Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

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



PRÍRODNÉ POLYSACHARIDY TYPU β -1,3 (1,6)-D-GLUKÁNOV

JOZEF AUGUSTÍN^a, ALEXANDER DANDÁR^a,
KRZYSZTOF SURÓWKA^b, GRAŻYNA
JAWORSKA^b a LUCIA MINAROVÍČOVÁ^a

^a Ústav biotechnológie a potravinárstva FCHPT STU Bratislava, SR, ^b Akademia Rolnicza, Kraków, PL
jozef.augustin@stuba.sk

Autori v predkladanej štúdií zamerali pozornosť na optimalizáciu izolácie biopolymerného fungálneho polysacharidu β -1,3 (1,6)-D-glukánu z Hlívy ustricovitej (*Pleurotus ostreatus*). Jedná sa o korpuskulárny polysacharid prírodného pôvodu o hmotnosti 750 kD a veľkosti častíc 150 μ m. Tento druh polysacharidu je štruktúrnym polysacharidom bunkových stien kvasiniek, rôznych druhov húb a obilia. Glukány tvoria ojedinelú, účinne pôsobiacu skupinu, v ktorej každý izolovaný polysacharid má svoju špecifickosť. Po chemickej stránke sa jedná o homopolymér, obsahujúci glykozidické väzby β -1,3 v hlavnom lineárnom reťazci a glykozidické väzby β -1,6 v bočnom vetvení. Jedná sa o polysacharid s bioaktívnymi účinkami ako nešpecifického stimulátora obranného systému organizmu s priamou aktiváciou buniek imunitného systému. Beta-glukány majú schopnosť prednostne sa špecificky viazať na makrofágy, teda bunky, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu v obranných reakciách nášho tela pri jeho ataku choroboplodnými zárodkami (baktérie, víry, toxíny a pod.). Po identifikácii infekcie nasleduje celá kaskáda činností, ktorá zahŕňa pohlcovanie a likvidáciu baktérií, vírov, ničenie nádorových buniek a iniciáciu ďalších aktivátorov imunitných reakcií. Autori ďalej uvádzajú celý rad pomerne výrazných imunofarmakologických účinkov β -1,3 (1,6)-D-glukánov na organizmus. Majú už spomínanú schopnosť zvyšovať odolnosť organizmu proti bakteriálnym, fungálnym, vírusovým a parazitárnym ochoreniam a to priamo, alebo v kombinácii s inými liečivami. Ďalej tento typ polysacharidov zlepšuje imunopresívne stavy, pôsobí imunoadjuvantne a zvyšujú rezistenciu organizmu proti chemickým karcinogénom. Beta glukány majú antimutagénne a antikoagulačné vlastnosti. Majú schopnosť inhibovať väzbu HIV vírusom vyvolávajúceho AIDS, stimulujú tvorbu červených a bielych krviniek, vyvolávajú rádioprotektívny účinok (predĺženie doby prežitia po rádioaktívnom ožiarení), môžu pôsobiť ako tzv. „odprávače“ voľných radikálov v organizme, s čím súvisí ich antilipoperoxidačný účinok a tiež majú potenciálny teratogénny účinok. V práci autori konštatujú, že výsledok a intenzita pôsobenia prírodných polysacharidov typu β -1,3 (1,6)-D-glukánov, ich biologická aktivita (imunomodulačné vlastnosti) je závislá od ich pôvodu (rastlinný, mikrobiálny, živočíšny), chemickej štruktúry, stupňa rozpustnosti, aplikácie a druhu genetickej výbavy buniek.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-0310-06.

RHEOLOGICAL CONTROL OF ENZYMATIC CONVERSION OF BIOMASS POLYSACCHARIDES

HOUDA BOUSSARSAR^a, BARBARA ROGÉ^a,
CAROLINE RÉMOND^b, PHILIPPE DEBEIRE^b,
and MOHAMED MATHLOUTHI^{a*}

^a Laboratoire de Chimie Physique Industrielle, UMR URCA-INRA FARE, UFR Sciences, B.P. 1039 - 51687 Reims Cedex 2(France) ; ^b Equipe TEPA, UMR INRA-URCA, FARE, 8 Rue Gabriel Voisin, 51100 Reims (France)
mathlo01@univ-reims.fr

Control of enzymatic hydrolysis of polysaccharides from crops or agriculture co-products can be achieved by use of physico-chemical methods like rheology or FTIR spectroscopy. This approach was applied at the laboratory scale to elucidate the amylolytic action pattern of *Thermococcus hydrothermalis* recombinant type II pullulanase (Th-Apu Δ 2) and in pilot reactor to evaluate the feasibility of control of the solubilization and saccharification of hemicelluloses from the lignocellulolytic fraction in different co-products like corn cob, wheat bran or sugarcane bagasse.

Viscosity results were correlated to reducing sugars analysis to show a similarity between glucoamylase and Th-Apu Δ 2 behaviour. While α -amylase action rapidly decreased the viscosity of medium, glucoamylase and Th-Apu Δ 2 hydrolysates have only shown a negligible reduction in viscosity. The presence of more numerous differentiated and intense peaks in the FTIR spectrum of Th-Apu Δ 2 hydrolysate reveals the presence of short chain oligosaccharides. These results confirm thin layer chromatography results and incite us to conclude that Th-Apu Δ 2 has a dual “endo” and “exo” catalytic action pattern.

It was also observed for a bioreactor agitated at 200 rpm where corncob suspension (200g/L) bioconversion was catalysed by an endo-xylanase, that the force applied on the agitator rotor decreases as solubilization (release of soluble arabinoxylans) increases. In parallel, the corncob suspension viscosity was measured during the bioconversion. Decrease in viscosity followed the same trend as the force on the agitator rotor. These results suggest that hydrolysis evolution in a complex material like the lignocellulosic fraction of an agriculture co-product, can be controlled by viscosity measurement in the reaction medium.

PŘÍTOMNOST NEŠKROBOVÝCH POLYSACHARIDŮ V ZRNU JEČMENE

NATÁLIE BŘEZINOVÁ BELCREDI^a, JAROSLAVA
EHRENBERGEROVÁ^a, EVA FEČKOVÁ^a, SIMONA
MACUCHOVÁ^b a KATEŘINA VACULOVÁ^c

^a Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství,
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Země-
dělská 1, 613 00 Brno, ^b Výzkumný ústav pivovarský a sla-
dařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00
Brno, ^c Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.,
Havlíčková 2787/121, 767 01 Kroměříž
belcr@centrum.cz

Neškrobové polysacharidy (β -glukany a arabinoxyla-
ny) jsou zastoupeny v zrnu ječmene z 86 % a pro člověka
představují dietní vlákninu přítomnou v ječmeni z 15 až
24 %. β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)-D-glukany neboli β -glukany se
nacházejí v buněčných stěnách vyšších rostlin a ve větším
množství v semenech některých obilovin (ječmen, oves).
Během sladování a rmutování se částečně štěpí vlivem
enzymů a pro technologii výroby piva se tedy požaduje
obsah β -glukanů ve sladu co nejnižší. Vyšší obsah β -
glukanů se může projevit zvýšenou viskozitou sladiny
a piva, špatnou filtrovatelností a prodlouženou dobou sce-
zování, na kterém se také podílí vyšší obsah arabinoxyla-
nů. Arabinoxylany jsou hlavními polysacharidy primár-
ních buněčných stěn jednoděložných rostlin a signifikova-
ných buněk jednoděložných a dvouděložných rostlin. Stě-
ny buněk ječmene obsahují asi 20 % arabinoxylanů.

Byly hodnoceny sladovnické odrůdy (Amulet, Kom-
pakt, Krona, Nordus, Tolar), odrůdy americké provenien-
ce, které jsou považovány za donory β -glukanů (Wabet,
Wanubet, Washonubet), linie vzniklé z uvedených skupin
odrůd a bezpluché linie vyšlechtěné v Zemědělském vý-
zkumném ústavu Kroměříž, s.r.o. (KM).

Pro další potravinářské využití by byly vhodné linie
Wabet x Washonubet, KM 2283 a odrůdy Wanubet, Wa-
bet a Krona, které měly nejvyšší obsah jak β -glukanů
(5,82–8,14 %) tak arabinoxylanů (6,60–8,09 %). Pro sla-
dovnické účely se jeví jako nejvhodnější linie Krona x
Kompakt, Wabet x Kompakt a odrůda Tolar, vhodná pro
výrobu českého typu piva, s nejnižším obsahem β -glukanů
(4,78–4,98 %) i arabinoxylanů (3,66–5,53 %).

VLIV PROSTÉ RECYKLACE NA MECHANICKÉ A HYPERMOLEKULÁRNÍ VLASTNOSTI CELULOSOVÝCH MATERIÁLŮ

BŘETISLAV ČEŠEK, MILOSLAV MILICHOVSKÝ
a JIŘÍ CHALUPA

Katedra dřeva, celulózy a papíru, Fakulta chemicko-
technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 95,
532 10 Pardubice
KDCP.FCCHT@upce.cz

Recyklace papíru a papírenských výrobků je jednou
z nejdůležitějších věcí současnosti. Cílem této práce bylo
určení „nových“ metod, které mohou recyklační proces papí-
ru (celulosových materiálů) popisovat. Byly odzkoušeny dvě
metody, které se srovnávaly s velmi dobře známou metodikou
WRV. Absolutní hodnota parametru WRV závisí na vazeb-
ném systému vláken a taktéž na jejich povrchové abrazi.

Byly odzkoušeny následující dvě metodiky. Prvou
z nich je tzv. „navlhávací zkouška“. Tato metoda je zalo-
žena na principu sledování procesu navlhání papíru.
Z naměřených údajů můžeme vypočítat povrchově-
strukturní vlastnosti celulosových materiálů. Tyto vlast-
nosti jsou závislé na povrchové abrazi vláken v průběhu
recyklace. Další použitou metodikou, bylo užití tzv.
„rheosedimentace“, která zkoumá a vyhodnocuje sedimen-
taci celulosových materiálů v suspenzi. Výsledky získané
touto metodikou jsou závislé na morfologii a tuhosti vlá-
ken a jejich vazebném potenciálu. Jsou taktéž závislé na
povrchové abrazi vláken.

Byla vyslovena hypotéza, že deformace a oděr vláken
se zvyšuje se stoupajícím počtem jejich recyklací. To zna-
mená, že tzv. papírotvorné vlastnosti vláken se budou
v průběhu recyklace zhoršovat. Tato hypotéza však nebyla
vždy potvrzena, z důvodu dvojího druhu destrukce vláken.
Prvním z nich je úplná destrukce primární (P) a sekundární
(S1) vrstvy vláken, která způsobuje zhoršení papírotvor-
ných vlastností. Druhou z nich je částečná destrukce fibri-
lárních svazků, která může vést ke zlepšení výše uvede-
ných vlastností. Tudiž vícenásobná recyklace papíru
a papírenských výrobků může vést i ke zlepšení papíro-
tvorných vlastností takto získaných vláken.

HYDROLYSIS OF OXIDIZED CELLULOSE

JANA ČOPÍKOVÁ^{a*}, JIŘÍ SOBEK^b, MIROSLAV
NOVÁK^a, and TOMÁŠ JEŘÁBEK^a

^a Institute of Chemical Technology, Department of Carbo-
hydrate Chemistry and Technology, Technická 1905,
166 28 Prague 6, ^b Institute of Chemical Process Funda-
mentals of the ASCR, v.v.i., Rozvojová 2, 165 02 Prague 6
jana.copikova@vscht.cz

Hydrolysis of oxidized cellulose was carried out in
heterogenous system by means of microwave heating at

100 °C. The reaction progress was monitored by reducing sugars determination and by size exclusion chromatography, *i.e.* by determination of molecular weight and molecular weight distribution of the product.

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

MICROALGAE – A PROMISING SOURCE OF STARCH FOR BIOETHANOL PRODUCTION

IRENA DOUŠKOVÁ, JIŘÍ DOUCHA, DÁŠA UMYSOVÁ, MILADA VÍTOVÁ, and VILÉM ZACHLEDER

*Institute of Microbiology AS CR, v.v.i., Department of Autotrophic Microorganisms, Opatovický mlýn, 379 81 Třeboň
zachleder@alga.cz*

The microalga *Chlorella vulgaris* is widely used as a protein-rich food and feed supplement. Its biomass productivity can be up to 100 tonnes of dry biomass per hectare per year depending on cultivation condition. The reserve compound is mainly starch in content of about 20 % of dry weight. When the cells are subjected to specific stress conditions, the starch content increase up to 65 % of dry weight. Such biomass could serve as a suitable feedstock for bioethanol production.

VLIV NĚKTERÝCH FAKTORŮ NA OBSAH ŠKROBU V ZRNU PŠENICE A TRITIKALE

OLDŘICH FAMĚRA^a, JAN LIPAVSKÝ^b, BOŽENA RILJÁKOVÁ^a a LENKA KOUŘIMSKÁ^a

^a *Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, ^b Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně
famera@af.czu.cz*

V současné době stoupá význam pšenice určené ke škrobárenskému zpracování. Mezi faktory, které přispívají ke stále vzrůstajícímu využití pšenice jako škrobárenské suroviny, patří velmi příznivé klimatické podmínky pro pěstování pšenice v České republice, dlouhodobá skladovatelnost zrna a rozšíření možností uplatnění pšeničného zrna na trhu. Odrůdy pěstované v horších podmínkách (marginálních) mají obvykle vyšší obsah škrobu. Zde je třeba ale vzít v úvahu celkově nižší výnosy v těchto oblastech. Z hlediska intenzity pěstování nebývají rozdíly v obsahu škrobu příliš významné, přesto však existují. Obsah škrobu v obilovinách je v negativní korelaci k obsahu dusíkatých látek v zrně.

V maloparcelkových pokusech (sklizeň 2006 a 2007) s odrůdami pšenice s nepekárenskou jakostí (5) a tritikale (5) byly uplatněny 2 intenzity pěstování: úsporná (90 kg N ha⁻¹ a 1 fungicid) a intenzivní (120 kg N ha⁻¹ a 2 fungicidy). Pokusy byly založeny u pšenice na čtyřech lokalitách (2 v řepařské výrobní oblasti a 2 v bramborářské VO), u tritikale na dvou stanovištích v BVO.

Největší vliv na obsah škrobu v zrně pšenice měl ročník pěstování – rozdíl průměrů činil 2,1 % (2006 66,1 %, 2007 68,2 %). Určité rozdíly se projevily u pokusných míst. V každém roce byl zjištěn na jednom stanovišti odlišný obsah škrobu oproti ostatním lokalitám – zvýšený 2006 v Humpolci o 1,2 % a nižší 2007 v Hněvčevsi o 2,2 %. Vždy to souviselo s opačnou tendencí v obsahu N-látek v zrně. Z tohoto hlediska se projevila tendence k vyššímu obsahu škrobu v bramborářské výrobní oblasti. Pěstitelská technologie s nižší dávkou dusíkatého hnojení (úsporná) vedla k nevýznamně vyššímu uložení škrobu do zrna – v průměru všech variant o 0,5 %. Přitom v BVO byl průměr o 1 % vyšší u úsporné technologie, v ŘVO byly výsledky obdobné. Mezi odrůdami se také ukázaly dílčí rozdíly na úrovni desetin procenta: Biscay 67,7 %, Mladka a Windsor 67,2 %. O 0,5–1 % nižší obsah škrobu byl zaznamenán u odrůd Rapsodia 66,8 % a Clarus 66,7 %. Také u obou technologií bylo pořadí zachováno.

Výsledky dosažené u tritikale měly podobné tendence jako pšenice. Ročníkový rozdíl zde byl vyšší o 3,1 % ve prospěch roku 2007 (69,0 %). U technologií pěstování byly vyšší hodnoty o desetiny procenta u úsporných variant. Projevilo se to na obou stanovištích. Odrůdové rozdíly u tritikale byly vyšší než u odrůd pšenice. Skupina odrůd Lupus 68,9 %, Ticino 68,4 %, Tricolor 68,2 % o 2 % převyšovala další odrůdy Lamberto 66,8 % a Kitaro 66,5 %.

Práce vznikla za podpory projektu NAZV č. 1G57056.

THE EFFECT OF ILLUMINATION OF POLARIZED LIGHT ON POLYSACCHARIDES AND POLYSACCHARIDE DEGRADING ENZYMES Zvaná přednáška

MACIEJ FIEDOROWICZ, ANNA KONIECZNA-MOLENDA, and GOHAR KHACHATRYAN

Department of Chemistry, University of Agriculture, 122 Balička Str., 30-149 Cracow, Poland

Illumination with visible polarized light of normal, waxy and high amylose (Hylon V, Hylon VII) corn, amaranthus, potato and sago starches, induced depolymerisation of starch polysaccharide chains followed by repolymerisation of resulting small molecules upon prolonged illumination. It resulted in structural changes within the starch granules (molecular weight of polysaccharide chains, crystallinity, distribution of amylopectin structural units) and, consequently, in changes of functional properties (swelling power, solubility, thermal and pasting prop-

erties, iodine binding properties, susceptibility to alpha-amylolysis) of all starches studied. The magnitude of changes of starch structural and functional properties induced by illumination depended on starch granule structure and botanical origin. In the case of all starches studied, fragmentation of amylopectin molecules was assisted by the formation of long amylose type chains. Therefore, polarized light illumination of starch granules, regardless of botanical origin, led to the formation of starch granule structures which exhibits functional properties resembled, taking into account amylose to amylopectin ratio, properties of starch granules obtained by genetic modifications of given species. We shown, that polarized light was absorbed by crystalline parts of starch granules inducing vibration of the crystalline lattice and, in consequence, depolymerisation- repolymerisation reactions.

It is obvious that enzyme polypeptide chains could be regarded as semicrystalline structures. Therefore, we decided to check the effect of polarized light on activity of polysaccharide hydrolyzing enzymes. We shown that preillumination of α -amylase solution with linearly polarized light leads to significant increase both in the rate and final yield of the starch enzymatic hydrolysis reaction. The hydrolytic enzymes, α -amylases, and the cyclodextrin glycosyltransferases (CGTases) are key enzymes in the depolymerization of starch. These two groups of enzymes are evolutionarily related. Therefore, we decided to study impact of illumination with polarized light of commercially available CGTase Turozyme (Novozymes, Denmark), on rate and selectivity of α -, β - and γ - cyclodextrin (CD) enzymatic production from starch. Additionally, we report impact of the illumination with polarized light of two other polysaccharide hydrolyzing enzymes i.e. glucoamylase and xylanase on their activity in hydrolysis reaction of starch and xylan, respectively. Obtained results indicate that illumination of enzymes studied, leads to greater yield and/or selectivity of enzymatic reactions.

COMPARISON OF LEGUME SEEDS OF CZECH AND TURKISH VARIETIES USING IMAGE ANALYSIS

EBRU FIRATLIGIL-DURMUŞ^{a,b}, EVŽEN ŠÁRKA^a, ZDENĚK BUBNÍK^a, MATYÁŠ SCHEJBAL^c, and PAVEL KADLEC^a

^a ICT Prague, Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic, ^b Istanbul Technical University, Food Engineering Department, Maslak – Istanbul, Turkey, ^c ICT Prague, Department of Chemical Engineering, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
evzen.sarka@vscht.cz, ebruf@itu.edu.tr, matyas.schejbal@vscht.cz

Geometric parameters of legume seeds are very important for designing of engineering processes such as heat

treatment, air transport, drying, milling, germination etc. Image analysis system was used to provide these parameters of lentil and bean. Four approximation models (a cone-sphere, an oblate spheroid, two sphere segments, a triaxial ellipsoid) were used to evaluate volume and surface area of lentil and bean varieties. The results were compared with the values obtained from pycnometric method. The best approximation model was found as the triaxial ellipsoid and the oblate spheroid for bean varieties and two sphere segments for lentil varieties. Weight and surface area data of white bean was used to develop equation to predict bean surface area.

Image analysis system provided fast and accurate values of important technological properties of legume such as geometric parameters, volume and surface area.

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

ANALYSIS OF POLYSACCHARIDES FROM WOOD-DESTROYING FUNGI

GORDON KARIKOGA GOMBA^a, MICHAL TOMŠOVSKÝ^b, ANDRYI SYNITSYA^a, MIROSLAV NOVÁK^a, and JANA ČOPÍKOVÁ^{a*}

^a Institute of Chemical Technology, Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6, ^b Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 3, 613 00 Brno
jana.copikova@vscht.cz

Wood decay fungi of the genus *Phellinus* and *Inonotus spp.* are an integral part of forest ecosystems due to enzymatic decomposition of wood. Content of β -glucans in the samples of intact fruiting bodies was determined. A molar ratio of neutral sugars in the water or alkali extracts was also determined. Isolated fractions were characterized by FT-IR and NIR spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG). Acquired results will serve as a basis for taxonomical fungi classification of the genus *Phellinus* and *Inonotus spp.* from the central European region.

This work was supported by the Czech Science Foundation (project 521/07/J039).

STARCH AS A PORE-FORMING AND BODY-FORMING AGENT IN CERAMIC TECHNOLOGY

EVA GREGOROVÁ, ZUZANA ŽIVCOVÁ,
and WILLI PABST

Department of Glass and Ceramics, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6
eva.gregorova@vscht.cz

Starch is one of the most popular biopolymeric additives in ceramic technology today. Apart from being a ubiquitous ingredient in many binder formulations for extrusion and plastic forming, starch is used as a pore-forming agent in dry pressing, tape casting and traditional slip casting (TSC) in plaster molds. When the as-shaped ceramic green body is fired (usually at temperatures in the range 1400–1600 °C), starch is burns out already during the heating stage (at temperatures below 600 °C) and voids (pores) remain after starch burnout. Of course, the amount, size and shape of these voids is determined by the starch type and amount of starch applied. The total porosity achievable with starch can be as high as 70 %, pore size may vary in the range 1–100 μm (with median values ranging from approx. 5 μm for rice starch to approx. 50 μm for potato starch) and pore shape corresponds to the starch type (polyhedral-isometric for rice, corn and tapioca starch, oblate for wheat starch – more precisely its A-fraction and well rounded / slightly elongated for potato starch). A relatively new ceramic shaping technique is starch consolidation casting (SCC), which is based on the capability of starch to undergo swelling and gelatinization in hot water, followed by gelation of the resulting starch paste upon cooling. Using this technique, rigid ceramic bodies can be made by casting highly concentrated ceramic suspensions in impermeable molds (which can be polymer or metal). A definite advantage of SCC compared to TSC is the microstructural uniformity (i.e. absence of undesired gradients) and isotropy (i.e. absence of particle orientation effects). However, because of the volumetric changes of starch granules during swelling in the SCC technique, porosity and pore size and shape control is more difficult and less reproducible than in TSC of starch-containing suspensions. Thus, in SCC the pore size is to some degree related to the porosity (volume fraction of pores), whereas in TSC these two parameters are independent from each other. As an example of advanced materials processing we show ceramic laminates (functional gradient materials) made of porous alumina layers with varying pore size and / or porosity. We explain the preparation procedure and discuss the microstrutural features of the laminates. In particular, it is shown that both TSC and SCC can be used to achieve defect-free laminates without delamination or cracking. Deformation (warping) can be largely avoided by controlling the shrinkage via adapting the alumina content.

Support within 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.

(1→3)(1→4)-β-D-GLUKÁN V ZRNE OVSA: VLASTNOSTI A MOŽNOSTI VYUŽITIA

MICHAELA HAVRLETOVÁ a ALENA
GAJDOŠOVÁ

Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika
havrletova@yurv.sk

Zrno ovsa, ako excelentný zdroj potravinovej vlákniny, nadobúda v dnešnej dobe z dôvodu nutričnej kvality i zdraviu prospešných účinkov čoraz širšie uplatnenie vo výskume i praxi¹. S jeho výživovými hodnotami (poukazujúcimi na priaznivý pomer bielkovín a sacharidov, vhodný obsah nenasýtených mastných kyselín a vysoký obsah vlákniny, hlavne β-D-glukánu) je spojené jeho potenciálne využitie v produkcii funkčných potravín². (1→3)(1→4)-β-D-glukán (ďalej len β-D-glukán), lineárny, vo vode čiastočne rozpustný homopolysacharid tvorený glukózovými jednotkami, predstavuje spolu s abinoxylánom najvýznamnejší neškrobový polysacharid semien obilnín³.

Hodnotením 100 členného súboru odrôd ovsa siateho sa pozorovala vysoká variabilita v obsahu β-D-glukánu. Najvyšší obsah sa zaznamenal v odrode nahého ovsa SV-5 (8,37 %), pričom nahé odrody obsahovali v priemere 4,48 % β-D-glukánu v zrnách a plevnaté 3,17 %. Odrody SV-5, PS-106, Neon, Šampionka, Arnold a Adam s obsahom β-D-glukánu viac ako 4,50 % sa identifikovali ako veľmi vhodné prirodzené zdroje daného polysacharidu a môžu nájsť uplatnenie v šľachtiteľských programoch a v potravinárstve ako východiskový materiál pre prípravu funkčných potravín, príp. ako zdroj izolácie β-D-glukánu. Ovsy s čiernou farbou plevy vykazovali najnižšie štandardné odchýlky v obsahu daného metabolitu, čo môže naznačovať jeho stabilnejšiu biosyntézu. Dusíkaté hnojenie v spojení so selénom predstavuje ďalší dôležitý faktor vplyvajúci na obsah β-D-glukánu. Hnojenie 15 kg ha⁻¹ dusíka a 5 g ha⁻¹ selénu spôsobilo zvýšenie obsahu danej látky v zreých zrnách z 3,31 % v kontrolnej vzorke na 3,77 % ($P < 0,05$).

Doba a miesto skladovania pomletej vzorky β-D-glukánu sa taktiež podieľa na zmene obsahu. Výsledky ukázali, že obsah danej látky sa s časom skladovania znižuje a to predovšetkým vo vzorkách skladovaných pri laboratórnej teplote⁴. Dôležité je skladovanie vzorky pri teplote 8 °C a jej čo najrýchlejšie spracovanie.

Mikrobiologické a senzorické pozorovania sa uskutočnili v dvoch druhov potravín (chlieb a kečup) s prídav-

kom β -D-glukánového hydrogélu izolovaného z ovsu. Kečup bol skladovaný po dobu 180 dní a všetky sledovania, ako aj monitoring vybraných technologických parametrov, ukázali, že prídavok hydrogelov neovplyvňoval negatívne kvalitu potravín (v niektorých kritériách naopak, kladne vplýval na reologické vlastnosti a chuť) a preto je perspektívny pre ďalšie výskumy a aplikácie spojené s prípravou nových, zdraviu prospešných foriem potravín.

Práca bola vykonaná v rámci úlohy MP SR č. 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11.

LITERATÚRA

- Peterson D. M.: Agrifood Res. Reports 51, 21 (2004).
- Demirbas A.: Food Chem. 90, 273 (2005).
- Trogh I., Courtin C. M., Andersson A. A. M., Åman P., Sørensen J. F., Delcour J. A.: J. Cereal Sci. 40, 257 (2004).
- Gajdošová A., Petruľáková Z., Havrlentová M., Červená V., Hozová B., Šturdík E., Kogan G.: Carbohydr. Polym. 70, 46 (2007).

NOVÁ TECHNOLOGIE OXIDACE CELULOSY

JANA HORČIČKOVÁ, PAVEL HAVELKA, LUBOŠ VÍŠEK a DAGMAR BULÁNKOVÁ

*Výskumný ústav organických syntéz (VUOS, a.s.), Procesní inženýrství, Rybitví 296, 533 54 Rybitví
jana.horcickova@vuos.com*

Oxidovaná celulóza je perspektívny materiál, ktorý má veľmi dobré hemostatické vlastnosti a v ľudskom tele je vstřebateľný bez výskytu jakýchkoľvek alergických reakcií. Nová technológia je založená na oxidácii celulózy roztokom oxidu dusičitého v perfluorovanom rozpúšťadle. Touto technológiou je získavaný absorbovatelný hemostatický produkt vysokej kvality: dobre zoxidovaný, jemný, stabilný a homogenný. Technológia je zároveň šetrná k životnému prostrediu.

HYDROLÝZA JAČMENNEJ, PŠENIČNEJ A REPKOVEJ SLAMY NA FERMENTAČNÉ ÚČELY

VIERA HORVÁTHOVÁ^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, Slovenská republika, ^b Výskumný ústav rastlinnej výroby SCPV, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika
viera.horvathova@ucm.sk*

Slama poľnohospodársky významných plodín obsahuje v priemere 60–70 % sacharidov v sušine vo forme

polysacharidov celulózy a hemicelulózy (Dien, 2007). Preto je možné ju energeticky využiť nielen na priame spaľovanie, ale aj ako substrát na fermentačnú výrobu palivového etanolu. Enzymová hydrolýza polysacharidov slamy si však vyžaduje predhydrolyzačnú úpravu, ktorej cieľom je narušenie štruktúry slamy (Hamelinck a spol., 2005).

Cieľom tejto práce bolo získanie skvasiteľných sacharidov z jačmennej, pšeničnej a repkovej slamy predhydrolyzou zriedenými roztokmi kyseliny chlorovodíkovej alebo sírovej v množstve 1,5; 2,5 a 3,5 g 100% kyseliny na 100 g slamy pri teplote 112 °C a následnou enzymovou hydrolýzou komerčnými prípravkami. Koncentrácia slamy v hydrolyzovanej suspenzii bola 10 % (w/w). Na overenie skvasiteľnosti sacharidov v pripravených hydrolyzátoch bol uskutočnený fermentačný experiment kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* CCY 11-3.

Koncentrácia redukujúcich látok v hydrolyzáte po kyslej predhydrolyze sa so stúpajúcou koncentráciou kyseliny zvyšovala, pričom kyselina chlorovodíková sa ukázala byť účinnejším hydrolytickým činidlom ako kyselina sírová. Maximálna dosiahnutá koncentrácia redukujúcich sacharidov po predhydrolyze bola 134 mg g⁻¹ sušiny jačmennej slamy.

Na enzymovú hydrolýzu bol použitý celulózový prípravok Celluclast 1,5 L v množstve 10 FPU g⁻¹ sušiny predhydrolyzovanej slamy a jeho kombinácia s β -glukozidázovým prípravkom Viscozyme L vo vzájomnom pomere 10:1 a 5:1. Najvyššie koncentrácie sacharidov boli dosiahnuté po 48 hodinách enzymovej hydrolýzy celulózovým a β -glukozidázovým prípravkom v pomere 5:1 v kombinácii s predhydrolyzou kyselinou chlorovodíkovou. U jačmennej slamy sa dosiahla koncentrácia redukujúcich sacharidov 336 mg g⁻¹ sušiny predhydrolyzovanej slamy. Po prepočte na koncentráciu sacharidov v sušine východiskovej slamy podľa Diena (2007) výtťažok redukujúcich sacharidov po kyslej aj enzymovej hydrolýze predstavoval 70 %. Po 48 hodinách enzymovej hydrolýzy pšeničnej slamy bola koncentrácia redukujúcich látok 252 mg g⁻¹ sušiny predhydrolyzovanej slamy, tj zodpovedajúci sumárny výtťažok redukujúcich sacharidov po kyslej aj enzymovej hydrolýze bol 50 %.

Na fermentáciu sa použili hydrolyzáty jačmennej a pšeničnej slamy, v ktorých sa doplnila koncentrácia skvasiteľných sacharidov na 2% obsah glukózy. Fermentáciou hydrolyzátu pšeničnej slamy bola konverzia glukózy na etanol 79 % (koncentrácia absolútneho etanolu predstavovala 0,81 g/100 g vyfermentovaného média), fermentáciou hydrolyzátu jačmennej slamy bola konverzia glukózy na etanol nižšia, konkrétne 60 %, čo zodpovedá 0,61 g absolútneho etanolu/100 g vyfermentovaného média.

LITERATÚRA

- Dien B. S.: Proceedings of U.S. Frontiers of Engineering, 65–74 (2007).
- Hamelinck C. N., Hooijdonk G., Faiij A. P. C.: Biomass and Bioenergy 28, 384 (2005).

CHEMICAL COMPOSITION OF KNOTWEED SPECIES

ZDENKA HROMÁDKOVÁ^a, NADĚŽDA VRCHOTOVÁ^b, JÁN HIRSCH, ANNA EBRINGEROVÁ^a, and BOŽENA ŠERÁ^b

^a Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia, ^b Institute of Systems Biology and Ecology AS CR, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic
chemhrom@savba.sk, nada@usbe.cas.cz

Japanese knotweed currently classified as *Fallopia japonica*¹ and previously classified as *Reynoutria japonica* or *Polygonum cuspidatum* is native to Japan, Taiwan and China. Japanese knotweed is an invasive non-native species. It is regarded as a troublesome pest in many parts of the Earth, including the Czech Republic and Slovakia, because of its rapid invasion and domination of habitats. Giant knotweed (*Fallopia* or *Reynoutria sachalinensis*) is a closely related species to *Fallopia japonica*. It grows much taller (4–5 metres) and their leaves are larger. ‘Bohemica’ (*Fallopia x bohemica*) is a hybrid species formed by Japanese knotweed and Giant knotweed.

Polygonaceae has traditionally been used in Asia to treat menoxenia, skin burn, gallstone, hepatitis, inflammation, and osteomyelitis^{2,3}. Generally, phenolic compounds are considered to be a major contributor to the antioxidant activity in Chinese medicinal plants. These antioxidants also possess diverse biological activities, such as anti-inflammatory, anti-carcinogenic and anti-atherosclerotic activities. These activities are suggested to be related to their antioxidant activity⁴. Methanol extracts of *Polygonum cuspidatum* root⁵ inhibited dental biofilm formation, which is responsible for subsequent dental caries development. Based on the preliminary phytochemical analysis, the activity of extracts may be related to the presence of anthraquinones, cardiac glycosides, terpenoids, and other phenolics. Wong et al.⁶ extracted of 30 Chinese medicinal plants by the traditional method (boiling in water) and in 80% methanol. It was found that the stem and root of *Polygonum multiflorum* exhibited the highest antioxidant activity and rich sources of natural antioxidants.

Except of the phenolic components of *Polygonum* species there are no reports on other plant components, particularly, the carbohydrate ones. The main objective of this study was to characterize the overall composition of the three knotweeds – *Reynoutria japonica*, *Reynoutria sachalinensis* and hybrid species ‘Bohemica’ (*Fallopia x bohemica*) formed by *Reynoutria japonica* and *Reynoutria sachalinensis*.

This work was financially supported by the Slovak Grant Agency VEGA, project No. 2/6131/27, by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic No. QH72117 and by the Research Intention of ISBE AS CR AV0Z60870520.

REFERENCES

1. Beerling D. J., Bailey J. P., Conolly A. P.: J. Ecol. 82, 959 (1994).
2. Zhou Z., Miwa M., Nara K., Wu B., Nakaya H., Lian C., Miyashita N., Oishi R., Maruta E., Hogetsu T.: Mol. Ecol. 12, 1361 (2003).
3. Park C. S., Lee Y. C., Kim J. D., Kim H. M., Kim C. H.: Vascular Pharmacol. 40, 279 (2004).
4. Chung K. T., Wong T. Y., Huang Y. W., Lin Y.: Crit. Rev. Food Sci. 38, 421 (1998).
5. Song J.-H., Yang T.-Ch., Chang K.-W., Han S.-K., Yi H.-K., Jeon J.-G.: J. Ethnopharmacol. 112, 419 (2007).
6. Wong Ch.-Ch., Li H.-B., Cheng K.-W., Chen F.: Food Chem. 97, 705 (2006).

PĚSTOVÁNÍ NOVÝCH DRUHŮ LÉČIVÝCH HUB OBSAHUJÍCÍCH POLYSACHARIDY

IVAN JABLONSKÝ

MZLU Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno
i.jablonsky@seznam.cz

V současné době je známo 700 druhů vyšších hub majících léčivé vlastnosti. Nejvýznamnější podíl léčivých látek houbách tvoří glukany. Byly studovány možnosti pěstování druhů *Ganoderma resinaceum*, *Bjerkandera adusta*, *Phellinus linteus*, *P. ingniarius* and *Trametes versicolor*. Byly zkoumány vhodné substráty a kultivační metody pro další druhy hub.

DETEKCIA WAXY ALEL PŠENICE

LENKA KLČOVÁ a DANIELA MIKULÍKOVÁ

Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu –
Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122,
921 68 Piešťany, Slovenská republika

Waxy bielkovina je známa ako na granuly viazaná škrobová syntetáza (GBSSI). GBSSI je kľúčovým enzýmom syntézy amylózy v škrobových zrnách rastlín. V pšenici sú tri GBSSI gény, lokalizované na chromozóme 7A (*Wx-A1*), 4A (*Wx-B1*) a 7D (*Wx-D1*). Waxy pšenice majú zabudované nefunkčné alely na *Wx* lokuse, preto ich škrob obsahuje znížené, prípadne nulové množstvo amylózy. Škroby s vyšším zastúpením amylopektínu sú vhodné na výrobu cestovín, piva, mrazených potravinových výrobkov, adhezív a papiera. Vyšší podiel amylózy v škrebe je výhodný pri výrobe fotografických filmov, vyprážených chuťoviek a pre cukrárenstvo. Šľachtením alebo pomocou biotechnológií je možné cielene získať škrob s požadovaným zastúpením amylózy a amylopektínu podľa jeho koncového využitia. Markermi podporované šľachtenie umožňuje selekciu línií s požadovaným alelickým

zložením už na molekulárnej úrovni. Zabudovaním všetkých troch mutovaných *Wx* alel je možné znížiť podiel amylozy v škrobe, prípadne obsah amylozy celkom eliminovať.

Pre účely markermi podporovaného výberu na DNA úrovni sme testovali niekoľko párov primerov pre *Wx-A1*, *Wx-B1* a *Wx-D1* lokus pšenice. Optimalizovali sme priebeh PCR reakcie a podmienky vizualizácie pre detekciu nefunkčných a funkčných *Wx* alel na 15 genotypoch pšenice. Tento spôsob selekcie bude využitý pri zabudovaní mutovaných *Wx* alel do perspektívnych slovenských odrôd pšenice, s cieľom znížiť podiel amylozy v ich škrobe.

Táto práca vznikla za podpory Ministerstva pôdohospodárstva SR (č. 2006 UO27/091 05 01/091 05 11).

THE CHARACTERIZATION OF PECTIN-WHEY PROTEIN INTERACTION IN RELATION TO DEGREE OF PECTIN ESTERIFICATION

RENÁTA KOVÁČOVÁ^a, JIŘÍ ŠTĚTINA^a, ANDRIY SYNYTSYA^b, and LUCIE FESSLOVÁ^b

^a Department of Dairy and Fat Technology, ^b Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology in Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6
renata.kovacova@vscht.cz

The aim of this work was to characterise electrostatic interactions between whey proteins and pectin in relation to degree of pectin esterification. There were observed areas of pH where the molecules were strongly bounded, resulting in the formation of protein-polysaccharide complexes. The complexes produced were characterised by determination of particle size by dynamic light scattering and by determination of zeta-potential by Doppler laser electrophoresis.

INFLUENCE OF LIGNOHUMATE APPLICATION ON HOT-WATER EXTRACTABLE CARBON CONTENT IN SOIL AND POTATO YIELD

JANA KREJČOVÁ

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 00 Praha 6 - Ruzyně
krejcova@vurv.cz

Lignohumate is a mixture organic carbon materials (humic and fulvic acids, polysaccharides and others). Therefore, the addition of Lignohumate can immediately affect the microbial activity, nutrient transformations (mainly mineral nitrogen) in soil and plant growth. The hot-water extractable carbon content in soil was used as a marker for study of soil available carbon changes. The

aim of this work was to evaluate the effect of Lignohumate application on the hot-water soluble carbon content in soil and on the potato yields. The hot-water extractable carbon content (C_{hw}) in soil with Lignohumate application was higher by 33.15 % and total carbon content (C_{ox}) by 10.40 %, in comparison with control. There was a positive effect on potato yield, too. The yield of potatoes increased after Lignohumate addition (weight of tubers by 13.28 % and number of tubers by 11.50 %). The hot-water extractable carbon content is a more sensitive indicator of available carbon changes in soil and for prediction of yield than total carbon content.

THE SURFACE PROPERTIES MODIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE POLYMERS. I. NATRIUM SALT OF CARBOXYMETHYL-CELLULOSE AND HYDROXYETHYLCELLULOSE

LUBOMÍR LAPČÍK, JIŘÍ RAŠNER, ALENA MACHÁČKOVÁ, BARBORA LAPČÍKOVÁ, ANTONÍN MINAŘÍK, ANTONÍN PROCHÁZKA, MICHAL BARTOŠ^b, and JAROSLAV ŠTĚPÁN^c

^a Institute of Physics and Materials Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Nad stráněmi 4511, 760 05 Zlín, ^b Research Institute for Organic Synthesis, Rybitví 286, 533 54 Rybitví 296, ^c Synthesia a.s., 533 07 Pardubice – Semtín
llapcik@ft.utb.cz

There was studied a process of solid polysaccharide (2-HEC, and NaCMC) modification through substitution reaction on surface -OH groups. This process was activated by high frequency plasma discharge applied on flat sample after its limited swelling in liquid solution of the modificant (2-nitrobenzaldehyde, and 4-nitrobenzaldehyde). There were determined an extend of substitution reaction and changes in UV-VIS and FT IR spectra as well.

FLUORESCENT ANALYSIS OF BARLEY POLYSACCHARIDES

EVA LHOTÁKOVÁ, JANA ČOPÍKOVÁ, FRANTIŠEK KVASNÍČKA, and ANDRIY SYNYTSYA

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

β -Glucans are important constituents of barley grains. Mould infection may influence the content of these polysaccharides in barley grains, and fungal glucans can be present in infected plants. The topic of this his work was

detection of non-cereal glucans in aqueous and alkali extracts from barley grains by fluorescent direct flow inject analysis. Experiments with various polysaccharides confirmed that fluorescent agents aniline blue (Lachema, CR) and Fluorochrom (Biosupplies, Australia) are partially selective to β -1,3 glycoside bonds of fungal β -glucans. Fluorochrom was more effective agent than raw aniline blue. Both agents are able to form fluorescent complexes with arabinoxylan and oxycelulose, i.e. with β -1,4 glycosidic bonds. The aqueous and alkali extracts from infected grains showed higher fluorescent signal than those from normal grains. This difference can be explained by the contribution of mould β -glucans, while the influence of variety was not insignificant too. The fluorescence of non-infected samples confirmed the presence of proteins and other substances supporting fluorescence. Despite these factors the fluorescent analysis is able to identify barley attacked by mould infection.

This study was supported by the Czech Scientific Foundation (project No. 525/06/0663) and by the Ministry of Education of the Czech Republic (project No. CEZ: MSM6046137305).

PERSPECTIVES OF BUTANOL PRODUCTION FROM STARCH AND CELLULOSE MATERIALS

JAKUB LIPOVSKÝ, PETRA PATÁKOVÁ, MOJMÍR RYCHTERA, HANA ČÍŽKOVÁ, and KAREL MELZUCH

*Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
Jakub.Lipovsky@vscht.cz*

Recently, an interest in a technology of butanol production based on clostridial fermentation of various mainly polysaccharidic substrates has been revived. Although, especially starch materials were used in the original process, nowadays cellulose ones are considered to be superior for second generation biofuel production. Possibilities of process arrangement together with upstream and downstream adjustments are discussed.

QUALIFY AND QUANTIFY (1→3; 1→6)- β -D-GLUCANS IN *Ganoderma* PRODUCTS Zvaná přednáška

TING-JANG LU

*Institute of Food Science & Technology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, 10617
tjlu@ntu.edu.tw*

Ganoderma lucidum, also known as Reishi or Lingzhi, is a popular traditional Chinese medical mushroom

used as a remedy. Polysaccharides are associated with immuno-modulating attributes of *Ganoderma*. The isolated polysaccharides from fruiting bodies hot-water extracts, representing Traditional Chinese Medicine servings, contained 31% of branched (1→3; 1→6)- β -D-glucans which were proven to be the most abundant active component to stimulate human peripheral blood mononuclear cells to release tumor necrosis factor- α (TNF- α). The D-glucans had a backbone of (1→3)-linked β -D-glucosyl units and about 1/3 of backbone units bearing single β -D-glucosyl side chains attached at O-6 position. One fluorometric method and one enzyme-chromatographic method were developed for the quantitative determination of these β -D-glucans. In addition, the degrees of branching of the β -D-glucans could be simultaneously determined by the enzyme-chromatographic method. Routine determination of (1→3)- β -D-glucans contents and their molecular weight distribution became accessible with these two methods. Cultivar and growth stage of fruiting bodies significantly changed the content of the D-glucans. The highest extracting yields of the polysaccharides and the β -D-glucans both occurred at the stage of pileus differentiation of the mushroom, while the β -D-glucan ratio in polysaccharide increased as the mushroom becoming mature. The β -D-glucans were also found to be the major component in mycelium biomass to activate TNF- α production from RAW264.7, a murine macrophage-like cell line. The cultural condition of mycelium dramatic changed the β -D-glucan content and its degrees of branching.

OBSAHY REZISTENTNÍHO ŠKROBU V TĚSTOVINÁCH

DOBROMILA LUKEŠOVÁ, JANA DOSTÁLOVÁ a LADA POKORNÁ

*Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Dobromila.Lukesova@vscht.cz*

Rezistentní škrob je přirozenou součástí mnoha potravin. Je přítomný v surových i technologicky upravených potravinách. Rezistentní škrob je část škrobu, která není trávena v tenkém střevě a přechází do tlustého střeva, kde slouží jako substrát pro mikroorganismy. Náhradou části stravitelného škrobu rezistentním dochází ke zpomalení vzestupu hladiny glukosy v krvi. Obsah rezistentního škrobu je sledován pro jeho pozitivní účinky na lidský organismus, neboť podněcuje střevní peristaltiku, čímž způsobuje rychlejší průchod tráveniny střevem a tím snižuje využitelnost energie ze stravy. K dalším pozitivním fyziologickým účinkům patří snížení cholesterolu v krvi. Semena a jiné zásobní orgány rostlin jsou významným zdrojem rezistentního škrobu. Dobrým zdrojem rezistentního škrobu jsou také celozrnné těstoviny.

Těstoviny se řadí mezi potraviny s nízkým glykemic-

kým indexem. Některé jsou navíc rezistentním škrobem obohacovány pro zvýšení příjmu vlákniny. V naší práci jsme se zaměřili na sledování obsahu rezistentního škrobu v této komoditě.

V obchodní síti bylo zakoupeno 12 vzorků různých druhů těstovin (vaječné, bezvaječné, celozrnné a semolino-vé) pocházejících od různých výrobců (tuzemských i zahraničních). Pro stanovení jsme využili enzymový set dodávaný firmou Megazyme International Ireland, Ltd.

Změny obsahu rezistentního škrobu byly sledovány pro uvaření a následném skladování za různých podmínek.

V syrových těstovinách se obsah rezistentního škrobu z celkového škrobu pohyboval v rozmezí 0,4–0,5 %. V těstovinách, které byly po uvaření skladovány po dobu 4 hodin při laboratorní teplotě, se obsah pohyboval v rozmezí 1,8–3,2 %. Největší nárůst obsahu rezistentního škrobu byl zaznamenán při skladování uvařených těstovin v chladničce (4 °C) po dobu 28 hodin, obsah rezistentního škrobu byl stanoven v rozmezí 2,0–3,9 %. K nejmenšímu nárůstu obsahu rezistentního škrobu došlo při skladování uvařených těstovin po dobu 4 hodin při teplotě 65 °C, kde se obsah pohyboval v rozmezí 1,5–2,9 %.

Bylo zjištěno, že vařením se zvýší obsah rezistentního škrobu v těstovinách. Při skladování za laboratorní teploty dochází k retrogradaci škrobu a tím i k nárůstu obsahu rezistentního škrobu. Při skladování při 65 °C byl obsah škrobu nižší než při skladování za laboratorní teploty, tudíž nedocházelo k rozsáhlejší retrogradaci. Zatímco při skladování v chladničce byl zaznamenán významnější nárůst rezistentního škrobu, který byl pravděpodobně způsoben probíhající rozsáhlejší retrogradací.

KINETICS OF DISSOLUTION OF Na⁺ [CARBOXYMETHYLCELLULOSE] AND OXYCELLULOSE MIXTURE

ALENA MACHÁČKOVÁ^a, LUBOMÍR LAPČÍK^a,
JÍŘÍ RAŠNER^a, ANTONÍN PROCHÁZKA^a,
ANTONÍN MINAŘÍK^a, and MICHAL BARTOŠ^b

^a Institute of Physics and Materials Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Nad stráněmi 4511, 760 05 Zlín, ^b Research Institute for Organic Synthesis, Rybitví 286, 533 54 Rybitví 296
llapcik@ft.utb.cz

There was studied the kinetics of dissolution of solid films of NaCMC and OC prepared from their mixtures in water by fast plaster casting method on Petri dishes. The dependences of the kinetics parameters of the process (t_Q , u_{OC} , $\Delta H_{i,j}^\ddagger$, $RA_{\sigma,i}$) on the given polymer compositions were determined. It has been found, that internal pressure in the solid swollen layer decreased with increasing content of OC in the mixture as well as the activation enthalpy of diffusion connected with swelling $\Delta H_{D,s}^\ddagger$.

CHEMICAL CHARACTERISTICS AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF OXIDIZED POTATO STARCH - CONGLYCININ COMPLEXES

IRENEUSZ MACIEJASZEK, KRZYSZTOF
SURÓWKA, RYSZARD MACURA, and IWONA
TESAROWICZ

Department of Refrigeration & Food Concentrates, University of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Kraków, Poland
rtsurowk@cyf-kr.edu.pl

Polysaccharides and proteins are the fundamental components of agricultural raw materials that are used for food and non-nutritional applications. Under favourable conditions these macromolecules can interact and as a result new products can be obtained. The objective of this study was to adapt the method of electrosynthesis for the production of complexes of oxidized potato starch (Lubox) with conglycinin (a 7S soy globulin), and to evaluate the functionality of such obtained products. Aqueous solutions containing Lubox and 7S, at various ratios, were brought to pH 8 and the electrosynthesis was conducted at 12 V. Insoluble complexes were collected from anode and freeze dried. They were usually richer in protein than the initial blends. It was shown, by the FTIR analysis, that carboxylic groups and peptide moieties, as well as probably hydrophobic interactions, are involved in complex formation. Thermogravimetry showed that the complexes are slightly more thermally stable than their components alone. The analysis of X-ray diffractograms showed that electrosynthesis of soy conglycinin with Lubox did not lead to crystalline products. Instead, a partial denaturation was observed as was proven by the DSC method. Electrosynthesis provided insoluble products, and this is reflected by very low nitrogen solubility index (NSI), their water holding capacity (WHC) was relatively high and increased with an increase in Lubox contribution in initial blend. Sorption isotherms of electrocomplexes are typical for biopolymers such as proteins and polysaccharides, and are located below isotherms for both substrates. Irrespective of the fact, that 7S globulin had superior emulsifying properties among soy proteins, complexes obtained had the low emulsifying activity. Likely, the poor solubility could be responsible for it. Rheological properties were recognized for 20% aqueous suspensions, involving oscillatory mode. It was observed that elasticity dominated over viscosity, suggesting interactions, which maintain the structure of weak gels. Taking biodegradability into consideration complexes had distinctly higher susceptibility for proteolysis than amylolysis and remarkable intensity in decomposition was observed by soil bacteria.

To sum up, there are two factors limiting the potential applications of 7S soy protein – oxidized potato starch electrocomplexes namely low solubility and weak emulsifying properties. However, they can be considered as supporting materials in food related and non-nutritional appli-

cations. Utilisation of potato starch as a substrate for non-nutritive purposes falls in with the current policy of European Union, which limits the potato harvest for nutritional usage.

ÚČINEK AMIDOVANÉHO PEKTINU NA HOMEOSTÁZI CHOLESTEROLU U POTKANŮ WISTAR: SROVNÁNÍ S DALŠÍMI SORBENTY STEROLŮ

MILAN MAROUNEK, ZDENĚK VOLEK,
EVA SKŘIVANOVÁ a DAGMAR DUŠKOVÁ

Výzkumný ústav živočišné výroby a Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Praha
marounek@iapg.cas.cz

Potkani byli krmeni dietou s vysokým obsahem cholesterolu, doplněnou o celulosu (kontrola), *N*-oktadecylpektinamid, psyllium či cholestyramin à 60 g kg⁻¹. Pektinamid, cholestyramin a psyllium snížily sérový cholesterol z 3,41 μmol ml⁻¹ na 1,68, 1,78 a 2,04 μmol ml⁻¹, rovněž cholesterol v játrech. Psyllium a cholestyramin významně zvýšily koncentraci žlučových kyselin v exkrementech, zatímco pektinamid zvýšil fekální vylučování neutrálních sterolů.

VÝZNAM ZLOŽENIA ŠKROBU A MOŽNOSTI JEHO OVPLYVNENIA

DANIELA MIKULÍKOVÁ^a, LENKA KLČOVÁ^a,
ŠTEFAN MASÁR^a, VIERA HORVÁTHOVÁ^b a JÁN
KRAIC^{a,b}

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

Väčšina rastlinných škrobov pozostáva z 20–30 % amylozy a 70–80 % amylopektínu. Niektoré plodiny (napr. strukoviny, najmä hrach so zvráskaveným povrchom semien), ich mutanty (jačmeň Glacier), prípadne geneticky modifikované odrody kukurice, pšenice alebo jačmeňa však majú podiel amylozy vyšší (až 80 %). Okrem toho existujú voskové (tzv. waxy) škroby, ktoré amylozu vôbec neobsahujú alebo sa v nich nachádza v zníženom množstve.

Fyzikálno-chemické vlastnosti škrobu (najmä jeho rozpustnosť, napučovanie, želatinizácia, hydrolýza a retrogradácia) a z nich vyplývajúca použiteľnosť sú dané pomerom amylozy a amylopektínu. Vzťahy medzi zložením a vlastnosťami škrobu sú najviac preskúmané v pekárstve, sladovníctve, pri výrobe cestovín a pri tvorbe

zdraviu prospešného rezistentného (odolného, nestráviteľného) škrobu.

V zastúpení podielu amylozy a amylopektínu majú významné postavenie dva špecifické izoenzyémy syntézy škrobu: na granuly viazaná škrobová syntetáza (GBSSI) a vetviaci enzým BEIIb. Izoenzým GBSSI je v obilninách podmienený génmi *WAXY*, v zemiaku génom *AMF* a v hrachu génom *LAM*. Zabudovaním mutovaného génu, ktorý spôsobí stratu tejto izoformy, možno v škrobe znížiť (až celkom eliminovať) obsah amylozy. Mutácie génu *AE* obilnín alebo génu *R* hrachu spôsobujú stratu vetviaceho izoenzyému BEIIb. V dôsledku týchto mutácií je v škrobe podiel amylozy zvýšený. Šľachtením alebo pomocou biotechnológií možno cielene získať škrob s požadovaným zastúpením amylozy a amylopektínu podľa účelu, na ktorý je určený.

Na našom pracovisku sme sa zamerali na molekulárnu selekciu genotypov vzniknutých na báze slovenských odrôd pšenice so zahraničnými full waxy líniami (vznikli krížením prirodzených mutantov Kanto 107 x BaiHuo) s cieľom získať nové línie bez amylozy (nepotravinové využitie) aj línie so zníženým podielom amylozy (potravinové využitie).

Izoenzým GBSSI je v pšenici kódovaný tromi génmi *WAXY*: *Wx-A₁* (7AS chromozóm), *Wx-B₁* (4AL) a *Wx-D₁* (7DS). Tieto gény môžu mať normálne (funkčné) alebo mutované (nefunkčné, tzv. nulové) alely. Ak sa v genóme pšenice nachádzajú iba funkčné alely *waxy*, aktivita GBSSI je normálna a vzniká normálne množstvo amylozy. Prítomnosť mutovanej (nulovej) alely *waxy* však spôsobí výrazné zníženie enzymovej aktivity GBSSI, preto vzniká menej amylozy. Obsah amylozy je nepriamo úmerný počtu mutovaných alel *waxy*. V prítomnosti všetkých troch sa podiel amylozy v škrobe zníži až na nulovú hodnotu.

Prenos jednotlivých nulových alel *waxy* sledujeme pomocou vhodných primerov v PCR analýzach. Pre účinnú produkciu bioetanolu sa snažíme vyselektovať novú líniu pšenice s vysokým obsahom škrobu bez amylozy. Táto línia bude mať v genóme všetky tri nulové recesívne alely *waxy* v homozygotnom stave. V porovnaní s bežnou pšenicou by mal mať jej škrob zvýšenú schopnosť napučovať a viazať vodu, zvýšenú rýchlosť aj hĺbku hydrolýzy a nižšiu teplotu želatinizácie.

Pre zlepšenie kvality cestovín sa snažíme zabudovať nulové alely *Wx-A1b* a *Wx-B1b* do genómu slovenskej tvrdej pšenice. Zvýšený podiel amylopektínu by mal výrazne zlepšiť textúru aj chuťovú kvalitu cestovín, zvýšiť viskozitu, číslo poklesu a napúchavosť škrobu a znížiť teplotu želatinizácie.

Táto práca vznikla za podpory Ministerstva pôdohospodárstva SR (projekt 2006 UO27/091 05 01/091 05 11 Biologické faktory podmieňujúce efektívnu a konkurencieschopnú rastlinnú výrobu).

LITERATÚRA

1. Baik B. K., Czuchajowska Z., Pomeranz Y.: *Cereal Chem.* 71, 315 (1994).
2. Baik B. K., Lee M. R.: *Cereal Chem.* 80, 304 (2003).
3. Graybosch R. A.: *Trends Food Sci. Tech.* 9, 135 (1998).
4. Jobling S.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 210 (2004).
5. Morris C. F., Konzak C. F.: *Crop Sci.* 41, 934 (2001).
6. Nakamura T., Vriten P., Saito M., Konda M.: *Genome* 45, 1150 (2002).
7. Rahman S., Li Z., Batey I., Cochrane M. P., Appels R., Morell M.: *J. Cereal Sci.* 31, 91 (2000).
8. Rosenberger A., Kaul H. P.: *Ind. Crop. Prod.* 15, 91 (2002).
9. Sasaki T., Yasui T., Matsuk J., Satake T.: *Cereal Chem.* 79, 861 (2002).

A SPONTANEOUS SELF-ORGANISATION PROCESS OF POLYSACCHARIDES IN LIQUID AND GEL-LIKE PHASES

ANTONÍN MINAŘÍK, LUBOMÍR LAPČÍK,
ANTONÍN PROCHÁZKA, LUBOMÍR LAPČÍK, Jr.,
ALENA MACHÁČKOVÁ, and BARBORA
LAPČÍKOVÁ

*Institute of Physics and Materials Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Nad stráněmi 4511, 760 05 Zlín
llapcik@ft.utb.cz*

There was studied an influence of thermodynamic flow on the thermal Rayleigh – Benard convection in concentrated solutions and dispersions of solid particles in selected cellulose derivatives. As the common parameters of the process characterisation there were used the Rayleigh and Marangoni numbers. The geometry of originating Benard cells are characterised with fractal dimension values. Light – microscopy pictures of them have a characteristic symmetry.

PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF β -GLUCANS IN MACROORGANISM

MIROSLAV NOVÁK* and JANA ČOPÍKOVÁ

*Institute of Chemical Technology, Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6
novaks@vscht.cz*

β -Glucans show notable physiological effects; this is their most important quality and the reason why so much attention has been devoted to them. They belong to biological response modifiers (BRMs), and exert pronounced

immunostimulating role in macroorganisms. The most pronounced effect of β -glucans consists in augmentation of phagocytosis and proliferative activities of professional phagocytes, first of all macrophages. On the other hand, their proinflammatory activities can lead to certain side effects.

This work was supported by the Czech Science Foundation (project 521/07/J039).

VLIV KARAGENANU NA VNÍMÁNÍ INTENZITY JAHODOVÉHO AROMA V MODELOVÉM VZORKU PUDINKU

ZDEŇKA PANOVSÁ, DOBROMILA LUKEŠOVÁ
a ALENA VÁCHOVÁ

*Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6
Zdenka.Panovska@vscht.cz*

Textura a viskozita potravin hraje velmi významnou roli při jejich oblíbenosti. Jakým způsobem látky upravující texturu ovlivňují lidské vnímání chuti a vůně a jak naopak chuťové látky či aroma ovlivňují lidské vnímání textury je předmětem studia mnohých výzkumných týmů. V sedmdesátých letech, např. Marschall a spol. zkoumal vnímání sladké chuti v gelech tvořených pěti polysacharidy. Zjistili, že intenzita sladké chuti byla více vnímána v karagenovém gelu a nejméně v kukuřičném škrobu. Pektin, želatina a agarový gel měly střední hodnoty vnímání sladkosti. Autoři korelovali subjektivní pocit vnímané sladké chuti s různými fyzikálními parametry gelů jako je tvrdost, soudružnost apod. Žádný testovaný parametr nebo skupinu parametrů nebylo možno použít pro vysvětlení rozdílů ve vnímání sladké chuti.

Také v osmdesátých a devadesátých letech byla tato problematika předmětem zájmu některých vědců. Po mnoha výzkumech se dospělo k obecnému závěru, že vnímání aroma i chuti klesá se stoupající viskozitou, ale také další vlivy jako jsou např. vzájemné vazby, povlak ústní dutiny atd., hrají při vnímání významnou roli. Baines a Morfia (1987) zjistili, že se vnímání sladké chuti a jahodového aroma snižuje v přítomnosti guarové gumy.

Hollywood a kol. (2002) se ve své práci zaměřili na sledování intenzity sladké chuti a aroma ve vzorcích obsahujících různé koncentrace hydroxypropyl-methylcelulosity (HPMC).

Cílem práce senzorické laboratoře bylo porovnat vliv karagenanu na vnímání intenzity jahodového aroma a dalších senzorických charakteristik v modelových vzorcích pudinku. Modelový vzorek se skládal z tapiokového škrobu, mléka, cukru a jahodového aroma. Na senzorickém hodnocení se podíleli zaměstnanci a studenti VŠCHT Praha. První hodnotitelská skupina (panel P1) se skládala ze studentů čtvrtého a pátého ročníku Fakulty potravinářské a biochemické technologie VŠCHT, postgraduálních studentů a zaměstnanců školy. Všichni hodnotitelé absolvovali

li kurs senzorické analýzy. Jednalo se o 27 hodnotitelů, 25 žen a 2 muži ve věku 22–60 let.

Druhá skupina (panel P2) byla složena ze studentů prvního ročníku Fakulty potravinářské a biochemické technologie VŠCHT. Tito hodnotitelé v průběhu semestru prošli základním senzorickým školením. Panel se skládal z 63 hodnotitelů, 43 žen a 20 mužů, ve věku od 19 do 25 let.

Bylo zjištěno, že přídavek karagenanu výrazně ovlivnil nejen hustotu vzorku, ale i vnímání příjemnosti jahodové chuti. Rozdíly mezi pudinkem s karagenem a pudinkem bez karagenanu v příjemnosti jahodové chuti a v hustotě vzorku byly statisticky významné. Vzorek s karagenanem byl vnímán jako hustší, ale měl méně příjemnou jahodovou chuť oproti pudinku bez karagenanu. Tyto parametry byly statisticky významné u obou panelů. Panel P2 zaznamenal více rozdílů mezi pudinky, což mohlo být způsobeno větším počtem hodnotitelů. Odlišnosti byly v příjemnosti vůně, příjemnosti sladké a jahodové chuti a v tučnosti. Pudink bez karagenanu měl vyšší příjemnost vůně, vyšší byla i příjemnost sladké a jahodové chuti. Pudink s karagenanem byl oproti druhému vzorku hodnocen jako tučnější.

OBSAH PEKTINU V KRAJOVÝCH ODRŮDÁCH JABLEK

OTAKAR ROP, DANIELA KRAMÁŘOVÁ, PAVEL VALÁŠEK A PAVEL BŘEZINA

*Ústav potravinářského inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, náměstí T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
rop@ft.utb.cz*

V jednotlivých oblastech střední Evropy byly běžné výsadby místních, pro daný region typických ovocných dřevin, které dnes nazýváme krajovými odrůdami. Obce byly většinou obklopeny pásmy vysokokmenných sadů. V souvislosti s intenzifikací zemědělství, zejména v posledním století, začalo docházet k přechodu na intenzivní pěstování ovocných dřevin. Tento pěstitelský způsob je charakterizován pěstováním méně vzrůstných, ale vysoce produktivních ovocných rostlin.

V rámci změny tohoto pěstitelského způsobu se začaly odstraňovat nejenom extenzivní (vysokokmenné) výsadby, ale také polní křoviny a meze a došlo tak ke zničení mnoha biotopů. Z naší přírody se vytratilo nebo dostalo na okraj zájmu mnoho rostlinných druhů a odrůd¹.

Za účelem našeho výzkumu jsme se věnovali některým typickým krajovým odrůdám jablek v jihovýchodní části Bílých Karpat v oblasti Valašských Klobouk. Právě ke krajině Bílých Karpat odedávna patří sady a zahrady se starými regionálními vysokokmennými odrůdami ovoce². Z krajových odrůd jsme stanovovali obsah pektinu u odrůd Biesterfeldská reneta, Car Alexander, Gascoyneho šarlátové, Grahamovo, Jadernička moravská, Krátkostopka krá-

lovská, Matčino, Panenské české, Strýmka, Lebelovo. Vedle krajových odrůd jsme pro srovnání provedli analýzu i běžných tržních odrůd, získaných ze zmíněné lokality, a to: Golden Delicious, Spartan a Rubín.

Plody jablek byly sklizeny v konzumní zralosti vždy z pěti stromů dané odrůdy. Pro měření byly z každého stromu použity 3 opakování (dohromady tedy u každé odrůdy 15 opakování). Pro určení množství pektinu byl proveden výluh jablečné drti kyselinou chlorovodíkovou $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$. Pektin byl potom stanoven fotometricky jako zbarvený komplex tvořený produktem termického rozložení galakturonové kyseliny s *m*-hydroxybifenylem v prostředí koncentrované H_2SO_4 (cit.³).

Nejvyšší obsahy pektinových látek byly naměřeny u krajové odrůdy Car Alexander, a to v průměru $3,93 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvé hmoty. Tato odrůda pocházející z Ruska byla zejména v minulosti využívána na kulinární zpracování. Vysoká množství byla zaznamenána také u odrůd Strýmka ($3,11 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) a Jadernička moravská ($2,95 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). Tyto odrůdy patří k typickým krajovým v oblasti východní Moravy. Již dlouhou dobu jsou zde využívány pro přímý konzum, ale především potom na výrobu vynikajících destilátů, ovocných pomazánek a dalších potravinářských výrobků⁴. Z tradičních tržních odrůd byl nejvyšší průměrný obsah pektinu naměřen u odrůdy Spartan, a to $2,55 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$.

LITERATURA

1. Tetera V.: *Záchrana starých a krajových odrůd ovocných dřevin*. ČSOP, Veselí nad Moravou 2003.
2. Kuča P., Májský J., Kopeček F., Jongepierová I.: *Biele Karpaty*. Ekológia, Bratislava 1992.
3. Příbela A.: *Analýza potravin*. CHTF, Bratislava 1987.
4. Tetera V.: *Ovoce Bílých Karpat*. ČSOP, Veselí nad Moravou 2006.

ENZYMATIC DETERMINATION OF β -GLUCANS IN WOOD-DESTROYING FUNGI

PETRA SLAVÍČKOVÁ*, JANA ČOPÍKOVÁ, and MIROSLAV NOVÁK

*Institute of Chemical Technology, Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6
petra.slavickovas@vscht.cz*

$\beta(1\rightarrow3)$ -D-Glucans are known for their antitumor and immunostimulating properties. Content of β -glucans in selected samples of *Phellinus* and *Inonotus* spp., and in their water extracts was determined by an enzymatic method using a commercial kit K-YBGL 10/2005 (Megazyme, Ireland). Results were used for explanation of FT-IR spectra of studied samples.

This work was supported by the Czech Science Foundation, (project 521/07/J039).

NANOFIBERS FROM HYALURONAN

LENKA SOUKUPOVÁ, KATEŘINA KNOTKOVÁ,
and VLADIMÍR VELEBNÝCPN spol. s r.o., Dolní Dobrouč 401, 561 02 Dolní
Dobrouč
soukupova@contipro.cz

Tissue engineering or regenerative medicine is an interdisciplinary field that combines biology, medicine and engineering. Biocompatibility, biodegradability and non-toxicity are important properties of materials (biomaterials) for this relatively new field of science. One of the most promising materials for tissue engineering is natural polymer hyaluronan. This vital polysaccharide occurs for example in synovial fluid, extracellular matrix and connective tissues. Hyaluronan can be used successfully for preparation of nanofibers and 3D scaffolds or drug delivery.

This work describes preparation of nanofibers from hyaluronan. The method used for preparation of nanofibers was electrospinning with given parameters: work distance 110 mm and high voltage in the range from 18 to 61 kV. Different molecular weights (137.9, 1109, 1690, 1800 and 2607 kDa) and different concentrations (1–2 wt.%) of hyaluronan and different solvents (water and mixture of alcohol/water) were tested. Samples were characterised by scanning electron microscopy.

There was found out that hyaluronan with molecular weight 137.9 kDa is not suitable for electrospinning, but it was used for decreasing surface tension of high molecular weight hyaluronan solutions. Hyaluronan with molecular weight higher than 1000 kDa was suitable for nanofiber preparation by electrospinning. Blends of high molecular weight and low molecular weight hyaluronan are also suitable. The best solvents were mixtures of water and butan-1-ol, butan-2-ol or 2-methylpropan-2-ol. The nanofibers were created in the form of net with nanobeads. With increasing molecular weight of hyaluronan nanofiber nets were denser. The formation of nanobeads decreased with increasing molecular weight as well.

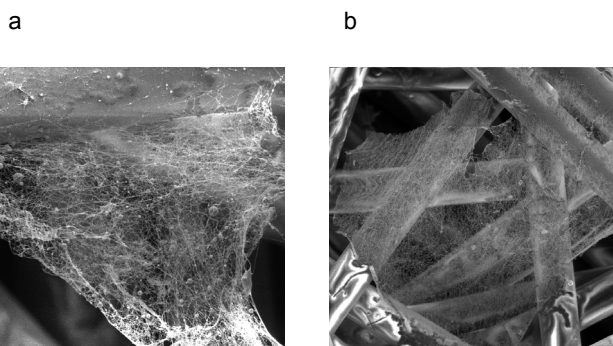


Fig. 1a SEM photo of hyaluronan net (1800 kDa) from butan-2-ol/water 2/8 ($\times 5000$), 1b SEM photo of hyaluronan net (2607 kDa) from butan-2-ol/water 2/8 ($\times 1500$)

QUALITY AND SHELF LIFE ESTIMATION
OF EGG PASTAKRZYSZTOF SURÓWKA, IRENEUSZ
MACIEJASZEK, RYSZARD MACURA,
and JOANNA BANAŚDepartment of Refrigeration & Food Concentrates, Uni-
versity of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Kraków,
Poland
rtsurowk@cyf-kr.edu.pl

Apart from bread, pasta is one of the most common cereal food product that is consumed all over the world. The simplest pasta manufacturing require just flour and water. However, nowadays it is impossible to obtain the product, which is stable and meets consumer demands, without the deep knowledge on product technology which is accompanied by a solid research background. Therefore, the aim of the present work was to establish the shelf life of 4-egg pasta obtained from common wheat flour of the ash content not exceeding 0.55 %. It has been realised by means of the “Accelerated Shelf Life Test” (ASLT), adapted for the dried food products. This method, due to the application of overestimated abuse parameters of storage condition, is suitable for establishing, within a relatively short time, a proper shelf life. In the present work the following ASLT storage parameters were applied: higher air relative humidity (up to 97 %), higher temperature (40 °C), crushing of the product, and its storage without packaging. It was proved that 8-week storage under higher air humidity (starting from 85 %) resulted in the worsening of pasta brittleness, and in weakly perceivable changes in taste and odour. The assessment of sorption properties obtained via sorption isotherm analysis, as well as BET equation indicated that monolayer value of pasta examined was 0.0751 g H₂O/g d.m. Considering the fact that the water content in this product was 10.7 % (equal to 0.1201 g H₂O/g d.m.), it should be stated that the pasta analysed had a slightly higher moisture content than the optimal. However, its water activity of approx. 0.47 protects it against the growth of every microorganism. In such pasta, pathogens may grow when its humidity ranges approx. 14.6 %, which means that its $a_w=0.8$.

It was assumed that the processes, which led to the fall in quality of 4-egg pasta, had a typical for such products value of $Q_{10}=2.5$. It leads to their 2,5-fold lowering, accompanied by a temperature decrease by 10 °C. Taking this into account, the results obtained in examined pasta at 40 °C by means of ASLT method lead to the conclusion that the product stored at 20 °C, under conditions regulated by Polish Standard PN-91/A-74017, should be stable for 12 months.

SIZE DISTRIBUTION OF BARLEY GRAINS

ALENA SÝKOROVÁ^a, EVŽEN ŠÁRKA^a, ZDENĚK BUBNÍK^a, and MATYÁŠ SCHEJBAL^b

^a Department of Carbohydrate Chemistry and Technology,

^b Department of Chemical Engineering, ICT Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6
evzen.sarka@vscht.cz

Barley primarily serves as a major animal feed crop; smaller amounts of barley are used in health foods and in the malting process.

Weight per thousand barley kernels and amount of grain (free of extraneous material) retained on a 2.5 mm sieve are main determinants of its quality. On the other hand detailed geometric parameters of cereal grains are also very important for the design of food engineering processes, such as air transport, drying, milling, malting, etc.

The aims of this study were to:

- determine the kernel sizes of selected barley cultivars,
- to develop five geometric models of barley kernels, and to identify the one which gives the best fit to volumes measured pycnometrically.

Image analysis was used to determine size parameters of one hundred kernels of chosen varieties of *Hordeum vulgare* L. The data for every kernel captured were stored for further use, together with the mean, standard deviation (SD), coefficient of variation (CV), and images themselves.

The measured data were then used to compute the volume and surface area of each of the five kernel models (Models 0–4), the results then being verified by pycnometric measurement. Maple 9.0 was used to calculate the surface area of the general ellipsoid (Model 0). Models 1–3 represent various combinations of two parts of a general ellipsoid with one or two cone frustums (calculated as the difference between two cones). Model 4 was a combination of two cone frustums.

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

STRUCTURAL ANALYSIS OF ALGAE FUCOIDANS

ANDRIY SYNYTSYA^a, ALLA SYNYTSYA^a, RADEK POHL^b, LUCIE FESSLOVÁ^a, FRANTIŠEK KVASNÍČKA^a, and PARK YONG-IL^c

^a Institute of Chemical Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6, Czech Republic, ^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the ASCR, Flemingovo nám. 2, 166 28 Prague 6, Czech Republic, ^c Department of Biotechnology, Catholic University of Korea, Bucheon-si, Gyeonggi-do 420-743, Korea
sinicaa@vscht.cz

Coastal area of southern Korea peninsula is a perspective region for growth and cultivation of brown algae that is plentiful in biologically active fucoidans. Biological activity and medicinal impact of these polysaccharides depends strongly on their structural properties. The goal of this study was structural characterization of fucoidan from cultured sporophyll of Korean algae *Undaria pinnatifida* in comparison with commercial fucoidans. Polysaccharides were analyzed by FTIR, FT Raman, 1D and 2D NMR, neutral sugar and organic elemental analysis. Molecular size and charge density were compared by separation methods (SEC, CE and ITC).

This study was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (project No. CEZ: MSM6046137305 and MSM6046137307) and by the Catholic University of Korea and the GRR program of Gyeonggi province, Korea.

IDENTIFICATION OF ACETYLATED DISTARCH ADIPATE IN A MIXTURE USING IMAGE ANALYSIS MEASUREMENT OF GRANULE SIZES

EVŽEN ŠÁRKA and ZDENĚK BUBNÍK

Institute of Chemical Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6
evzen.sarka@vscht.cz

Cross-linking of starch reinforces the intermolecular binding by introducing covalent bonds to supplement natural intermolecular hydrogen bonds. Cross-linking restricts granule swelling, decreases peak viscosity on cooking, and increases the stability of the gelatinized granule. Cross-linked starch provides a stable, high viscosity paste that may be subject to high temperature, high shear, or low pH.

Acetylated distarch adipate (ADA) is usually used as a stabilizer or a thickener, a solvent/carrier/encapsulating agent, a moisture control agent, flavours and flavour modifiers, a texturizer, a release/antistick agent, a material handling aid, a firming agent etc. Many food firms develop dry mixtures which are applied for these purposes. Identi-

fication of some properties of the starch used in these mixtures can be interesting for competitors or food and customs laboratories.

To determine the origin of ADA, it is necessary to know size distribution in advance. The research work was aimed at particle size distribution measurement of ADA suspensions (two commercial pure products and a mixture). Authors have chosen an image analysis method (system NIS-Elements) combined with microscopic observation for particle size determination.

At first it was necessary to work out original measuring methodology for starch granules, it included starch granule iodine dyeing, choosing of suitable object-lenses, design of lightning, preparing suitable subroutine in which values of contrast and threshold are defined, etc. From these size data the particle size distribution was calculated.

We detected that the starch in a mixture was wheat ADA, but the mixture involved more frequency of bigger starch particles when comparing with the commercial pure sample.

The normality of size distribution of ADA particles was tested. The normal distribution function of volume fraction x_v on equivalent diameter was discovered for wheat ADA, but this distribution was not confirmed for ADA from the mixture.

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

ENZYMATICKÉ STANOVENÍ OBSAHU AMYLOSÝ/AMYLOPEKTINU VE VZORCÍCH OZIMÉ PŠENICE A ŠKROBU Z ODRŮD BRAMBOR PRO PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ

DAGMAR ŠIMKOVÁ^a a LUDMILA PAPOUŠKOVÁ^b

^a Výzkumný ústav bramborářský s.r.o., Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod, ^b Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., oddělení Genové banky, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 simková@vubhb.cz

Mezi obilovinami pěstovanými v České republice zaujímá pšenice dominantní postavení, a také brambory tvoří velmi důležitou součást zemědělské produkce. Proto je velmi významné sledovat kvalitu těchto produktů. Velmi důležitou složkou, která ovlivňuje kvalitu většiny rostlinných produktů, patří vedle obsahu bílkovin také obsah škrobu a jeho frakcí amylosy a amylopektinu. Poměr těchto frakcí určuje nejen vlastnosti a chování škrobu, ale také koncové využití zemědělských plodin.

Metody stanovení obsahu amylosy ve škrobu jsou převážně kolorimetrické, založené na tvorbě amylosojodových komplexů. Další používané metody jsou např. ampérometrické nebo potenciometrické. V naší práci se budeme zabývat zhodnocením enzymatické metody, kdy na dvou nezávislých pracovištích (Výzkumný ústav rost-

linné výroby, v.v.i. a Výzkumný ústav bramborářský s.r.o.) byl ve víceletých pokusech stanovován obsah amylosy v znu pšenice ozimé a ve vzorcích škrobu z brambor za použití kitů firmy Megazyme. U této metody je využíván princip tvorby komplexu mezi amylopektinem a lektinem concanavalinem A, kdy je tento komplex po vysrážení odstraněn a obsah amylosy je po enzymatické hydrolyze na D-glukosu měřen kolorimetricky. Proběhlo také mezilaboratorní měření u dvou vzorků ozimé pšenice (Šárka, Bergland) a dvou vzorků škrobu brambor (Amado, Roberta).

Protože u měření vzorků dochází ke značné variabilitě naměřených hodnot, bylo pro zjištění spolehlivosti metody provedeno opakované měření standardu, kdy směrodatná odchylka měření dosáhla hodnoty 2,16 % (VÚRV) a 2,18 % (VÚB). Přičemž výrobce udává hodnotu pro standard 5 %. Minimální hodnota sm. odchylky byla 0,01 % (VÚRV) a 0,04 % (VÚB), max. 6,71 % (VÚRV) a 5,23 % (VÚB). Tento velký rozptyl chyby stanovení je problémem u vzorků, kdy měření probíhá nejvýše v duplikátech.

Hodnoty měření souboru vzorků nebyly statisticky významné ($P=0,69$ u vybraného souboru pšenice a $P=0,47$ u vybraného souboru brambor) a vykazovaly široké intervaly spolehlivosti.

Při mezilaboratorním měření obsahu amylosy měly hodnoty naměřené ve VÚRV vyšší tendenci než ve VÚB.

Byla zkoušena vyšší navážka (1 g) vzorku oproti návodu (20 mg) z důvodu zmenšení vlivu matrice vzorku, ale výsledky se neukázaly relevantní.

Byl také vyhodnocen různý přírůstek concanavalinu A v průběhu stanovení, kdy zvýšením množství concanavalinu A dochází ke snížení hodnot výsledného obsahu amylosy.

Podle našich zjištění se tato metoda jeví výhodná jako screeningová metoda pro zjištění vysoce odlišných odrůd, např. „waxy“ odrůd a odrůd s běžným obsahem amylosy. Není však průkazná pro rozlišení odrůd s podobným obsahem amylosy.

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Projects Nos. 1G58076, 0002700602 and IG 57056. The results were obtained during the solution of the project MZe ČR NAZV IG 57056.

THE DEVELOPMENT CONCEPTION OF BIOFUELS BASED ON STARCH AND CELLULOSE SOURCES IN THE CZECH REPUBLIC AND IN EUROPEAN UNION Zvaná přednáška

JIŘÍ TRNKA

Ministry of Agriculture of the Czech Republic
Jiri.Trnka@mze.cz

The article and the presentation describe the actual state of using of biofuels based on starch sources (i.e. bio-

ethanol produced from wheat and sugar-beet), the conception of biofuels usage according to the Ministry of agriculture, the actual and the expectant legislation (i.e. EU directives and the sustainability criteria for biofuels) and the possibility of production and usage of 2nd generation biofuels in Czech Republic (i.e. bioethanol based on cellulose sources).

COMPARISON OF SELECTED GRAIN NUTRITIONAL QUALITY CHARACTERS OF SPRING BARLEY (*Hordeum vulgare*, convar. *distichon*, var. *nudum* (L.) Alef.) MATERIALS WITH WAXY AND NORMAL STARCH

KATEŘINA VACULOVÁ^a, EVA MACOVÁ^b, and MARTA BALOUNOVÁ^a

^a *Agrotest Fyto, Ltd., and Agricultural Research Institute Kroměříž, Ltd., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Czech Republic,* ^b *Institute of Botany SAS, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 14, 845 23 Bratislava 4, Slovak Republic*

In a set of seven Canadian cultivars (with waxy and normal starch) and six new Czech lines of hullless spring barley (normal starch) evaluated in 2003–2005, variables “starch type” and “genotype” were significant for selected grain nutritional quality characters (contents of N-substances, fat, total, soluble and insoluble fibre, β -glucans and saccharides), while crop year differences affected only the content of saccharides, ash and total energy value of grain.

Financial support from the Ministry of Agriculture and the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic under projects 1G57064, 1M0570 and MSM2532885901 is gratefully acknowledged.

DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY OF POLYSACCHARIDES

ANEŽKA VESELÁ*, ANDRIY SYNITSYA, and JANA ČOPIKOVÁ

Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Technická 1905, 166 28 Prague 6
anezka.vesela@vscht.cz

Differential scanning calorimetry (DSC) belongs to the group of thermo analytical methods. DSC measures the heat effects, caused by chemical or physical changes, as a function of temperature or time while the substance is heated at a uniform rate. DSC reveals as a suitable method for partial polysaccharide identification. Various types of these biopolymers as well as their derivatives can be dis-

tinguished by DSC according to the mechanism of their decomposition. DSC measurement of polysaccharides in an inert atmosphere leads to the observation of both endothermic and exothermic events. DSC curves usually have several peaks, the first of which is caused by the evaporation of water. The other peaks are related to the decomposition of polysaccharides. Endothermic peaks may result from the subsequent fragmentation of polysaccharide chains with the formation of char and volatile products, whereas exothermic peaks may correspond to cross-linking reactions that occur during the thermal degradation and the following thermal degradation of a new cross-linked material. The DSC curves are influenced by the polysaccharide structure: the branching, type and position of glycosidic bonds, molecular weight, functional groups attached to the chain, etc. All peaks are possible to integrate and to determine T_{onset} .

Selected polysaccharides (cellulose, starch, amylose, amylopectin, chitin, chitosan, pectin, locust gum, guar and xanthan) and their derivatives (methylcellulose, carboxymethylcellulose) were analyzed in a nitrogen atmosphere, temperature range 25–700 °C with the heating rate 10 °C min⁻¹ on DSC 131 (Setaram France). It was discovered that the presence of carboxylic group or free aminogroup in polysaccharide cause exothermic degradation. The other polysaccharides decompose by depolymerisation, which is endothermic process. It was also observed that some polysaccharides do not display only one peak. In comparing the T_{onsets} that were, the linear chains are more thermo stable than the branched ones, and the polysaccharides with endothermic degradation are more thermo stable than the ones with exothermal decomposition.

Specific structural properties and the presence of characteristic functional groups cause various characteristics on polysaccharides DSC curves that could be useful to distinguish them.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM 6046137305).

CHARACTERISTICS OF FUCOSE-CONTAINING POLYSACCHARIDE FROM MYCELIUM CULTURE BIOMASS OF *Agaricus blazei* MURILL

HSUEH-TING WANG, HUI-CHING YU, and TING-JANG LU*

Graduate Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, 10617
tjlu@ntu.edu.tw

Polysaccharides of *Agaricus blazei* Murill have been considered as the major components for its immunomodulating and antitumor activities. To investigate the active polysaccharides in *A. blazei*, we fractionated crude polysaccharides from its mycelium culture biomass by

a bioactivity oriented strategy. A fucose-containing acidic polysaccharide fraction was isolated through selecting precipitation of cetyltrimethylammonium bromide, a quaternary ammonium salt, fractional precipitation with ethanol, DEAE-anion exchange chromatography and gel-filtration chromatography. The polysaccharide did not contain significant amount of protein and consisted of arabinose, galactose, glucose, fucose, mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucuronic acid in the molar ratio of 7.1: 13.2: 2.8: 13.5: 32.6: 6.5: 21.5: 2.8. The molecular weight of this polysaccharide was 3.5×10^5 Da. The polysaccharide showed significant TNF- α cytokine stimulating activity on RAW264.7, a murine macrophage-like cell line used as a bioactivity screen system.

VARIATION OF POLYSACCHARIDES AND (1,3; 1,6)- β -D-GLUCANS IN BIOMASS OF *Ganoderma lucidum* MYCELIUM CULTURE

CHUNG-HUANG WANG^a, LI-LIN HSU^a,
BEEN-HUANG CHIANG^a, MIAW-LING CHEN^b,
BI-FONG LIN^b, and TING-JANG LU^a

^a Graduate Institute of Food Science and Technology,

^b Graduate Institute of Microbiology and Biochemistry,
National Taiwan University, Taipei, Taiwan, 10617
tjlu@ntu.edu.tw

In our previous study, the (1,3)- β -D-glucans with (1,6)- β -D-glucosyl branches have been proved to be the most abundant active polysaccharides in a hot-water extract of fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*, a popular Traditional Chinese Medicine ingredient. Mycelium culture and fermentation significantly increases the biomass and polysaccharide production of this mushroom, but the effects of producing method on polysaccharide composition are still not clear. This study aimed for the polysaccharide profile changes caused by cultivating condition and investigation major active polysaccharide in mycelium biomass using TNF- α cytokine stimulation on RAW264.7, a murine macrophage-like cell line, as screening system. Our results indicated that polysaccharide mass production and its sugar composition profile had significantly changed from different cultivating condition. Although glucose was still the major glycosyl unit of polysaccharides in most mycelium culture samples, the contents of polysaccharides and (1,3; 1,6)- β -D-glucans varied in the range of 68–323 mg/dL and 0.4–168 mg/dL, respectively. The degree of branching, an essential feature for biological activity, of the β -D-glucans also varied from 0.08 to 0.23. The content of (1,3; 1,6)- β -D-glucans was well correlated with TNF- α stimulating activity on RAW264.7. Removal of the β -D-glucans significantly reduced the TNF- α stimulating activity of the polysaccharide extracts. Our results provided applicable evidences to support the use of (1,3; 1,6)- β -D-

glucans as biological marker of *G. lucidum* mycelium biomass.

LOW- AND HIGH-TEMPERATURE PROCESSES AND MECHANISMS IN THE PREPARATION OF POROUS CERAMICS VIA STARCH CONSOLIDATION CASTING

ZUZANA ŽIVCOVÁ, EVA GREGOROVÁ and WILLI PABST

Department of Glass and Ceramics, Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6
Eva.Gregorova@vscht.cz

Porous ceramics have a wide range of applications at all length scales, ranging from filters, membranes and catalyst supports to biomaterials and bone tissue engineering scaffolds, pyro- and piezoelectric functional ceramics, as well as high-temperature acoustic and thermal insulation. Using pore-forming agents (PFAs) is one of the methods to prepare porous ceramics, and biopolymeric PFAs have gained a prominent position today. In particular, starch can be used as a PFA in a new ceramic shaping technique, called starch consolidation casting, where it has at the same time body-forming (consolidating) agent, transforming the viscous ceramic suspension into an elastic (rigid) ceramic body, which can subsequently be dried and fired. In this work we first analyze the shaping step in starch consolidation casting, which involves temperature-induced swelling and gelatinization of starch in water (at temperatures in the range 60–80 °C) and explain the interplay between purely steric effects (swelling kinetics) and rheological changes of the starch-containing aqueous ceramic suspensions. A simple mathematical model is presented, which exploits the measured swelling kinetics of starch granules (by water uptake, measured via laser diffraction) as an input information to predict the time necessary for pressing the ceramic particles to the smallest volume configuration (random close packed or maximally random jammed structure). It is shown that, although steric (excluded volume) effects are crucial in determining the final pore structure, they are not sufficient for consolidation (body formation). Gelatinization at high temperature (accompanied by amylose diffusion into the interstitial voids between the submicron ceramic powder particles) and the corresponding rheological changes, as well as gelation upon cooling, are other key factors. Secondly, the burnout behavior of starch and related PFAs during heating is characterized by thermal analysis (thermogravimetry and differential thermal analysis), including analysis of the developing gases by mass spectrometry. Based on the thermal analysis results, possibilities of optimizing the starch burnout process are indicated (inserting hold times at 300 and 500 °C, fast heating below and above these temperatures). With this heating schedule defect-free starch burnout should be possible even for large body thickness and

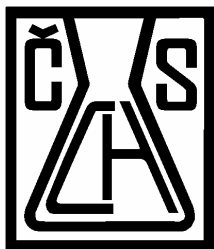
high starch content (> 50 vol.% related to the ceramic powder). Finally, the influence of the maximum firing temperature on the microstructure, in particular the porosity, of alumina ceramics prepared with potato starch is investigated and the relevant sintering mechanisms are discussed. Special attention is paid to partial sintering effects in the temperature range below 1500 °C (1100–1500 °C). It is shown that the large pores originating from starch burnout do not contribute to overall shrinkage of the ceramic bodies during firing, because due to their large diameter (low curvature) the driving force for pore closure

is too low. Thus, the shrinkage of ceramic bodies made with starch is entirely determined by the sintering behavior of the alumina matrix (including interstitial voids, which are eliminated in the final sintering stages) and more or less independent of the amount and type of starch.

Support within 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

- Augustín J. 839
 Balounová M. 855
 Banaš J. 852
 Bartoš M. 846, 848
 Boussarsar H. 839
 Březina P. 851
 Březinová Belcredi N. 840
 Bubník Z. 842, 853
 Bulánková D. 844
 Češek B. 840
 Čížková H. 847
 Čopíková J. 840, 842, 846, 850, 851, 855
 Dandár A. 839
 Debeire P. 839
 Dostálová J. 847
 Doucha J. 841
 Doušková I. 841
 Dušková D. 849
 Ebringerová A. 845
 Ehrenbergerová J. 840
 Faměra O. 841
 Fečková E. 840
 Fesslová L. 846, 853
 Fiedorowicz M. 841
 Firatlıgil-Durmuş E. 842
 Gajdošová A. 843
 Gomba G. K. 842
 Gregorová E. 843, 856
 Havelka P. 844
 Havrlentová M. 843
 Hirsch J. 845
 Horčíčková J. 844
 Horváthová V. 844, 849
 Hromádková Z. 845
 Hsu L.-L. 856
 Chalupa J. 840
 Chen M.-L. 856
 Chiang B.-H. 856
 Jablonský I. 845
 Jaworska G. 839
 Jeřábek T. 840
 Kadlec P. 842
 Khachatryan G. 841
 Klčová L. 845, 849
 Knotková K. 852
 Konieczna-Molenda A. 841
 Kouřimská L. 841
 Kováčová R. 846
 Kraic J. 849
 Kramářová D. 851
 Krejčová J. 846
 Kvasnička F. 846, 853
 Lapčík L. 846, 848, 850
 Lapčík L., Jr. 850
 Lapčíková B. 846, 850
 Lhotáková E. 846
 Lin B.-F. 856
 Lipavský J. 841, 847
 Lu T.-J. 847, 855, 856
 Lukešová D. 847, 850
 Maciejaszek I. 848, 852
 Macová E. 855
 Macuchová S. 840
 Macura R. 848, 852
 Macháčková A. 846, 848, 850
 Marounek M. 849
 Masár Š. 849
 Mathlouthi M. 839
 Melzoch K. 847
 Mikulíková D. 844, 845, 849
 Milichovský M. 840
 Mínaviřčová L. 839
 Minařík A. 846, 848, 850
 Novák M. 840, 842, 850, 851
 Ondáš V. 844
 Pabst W. 843, 856
 Panovská Z. 850
 Papoušková L. 854
 Patáková P. 847
 Pohl R. 853
 Pokorná L. 847
 Procházka A. 846, 848, 850
 Rašner J. 846, 848
 Rémond C. 839
 Riljáková B. 841
 Rogé B. 839
 Rop O. 851
 Rychtera M. 847
 Schejbal M. 842, 853
 Skřivanová E. 849
 Slavičková P. 851
 Sobek J. 840
 Soukupová L. 852
 Surówka K. 839, 848, 852
 Sýkorová A. 853
 Synytsya A. 842, 846, 853, 855
 Synytsya Alla 853
 Šárka E. 842, 853, 853
 Šerá B. 845
 Šimková D. 854
 Štěpán J. 846
 Štětina J. 846
 Tesarowicz I. 848
 Tomšovský M. 842
 Trnka J. 854
 Umysová D. 841
 Vaculová K. 840, 855
 Váchová A. 850
 Valášek P. 851
 Velebný V. 852
 Veselá A. 855
 Víšek L. 844
 Vítová M. 841
 Volek Z. 849
 Vrchotová N. 845
 Wang C.-H. 856
 Wang H.-T. 855
 Yong-II P. 853
 Yu H.-C. 855
 Zachleder V. 841
 Živcová Z. 843, 856



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 odborných životopisem), členství nabývá platnosti po schválení hlavním výborem ČSCH.

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

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	781	EDITORIAL	781
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Špeciácia antimónu vo vodách s využitím spojenia separačných techník s metódami atómovej spektrometrie	782	Speciation of Antimony in Waters Using Separation Coupled with Atomic Spectrometry	782
I. Hagarová a J. Kubová		I. Hagarová and J. Kubová	
Historie objevu ferrocenu	791	History of Ferrocene Discovery	791
P. Štěpnička		P. Štěpnička	
Onkogenní kinasa Bcr-Abl a její rezistence k používaným inhibitorům	795	Oncogenic Kinase Bcr-Abl and Its Resistance to Pharmacological Inhibitors	795
V. Kryštof		V. Kryštof	
Příspěvek ke studiu vzniku a transformace některých pěti a šestičlenných heterocyklických sloučenin obsahujících dusík a síru	801	A Contribution to Study of Formation and Transformation of Some Five- and Six-membered Heterocyclic Compounds Containing Nitrogen and Sulfur	801
J. Hanusek		J. Hanusek	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Stanovení koncentrace produktu genu Reg-1α v séru novou metodou ELISA	811	Determination of Serum Concentration of Gene Reg-1α Product by a New ELISA Method	811
D. Stejskal, M. Karpíšek, M. Švesták a H. Reutová		D. Stejskal, M. Karpíšek, M. Švesták, and H. Reutová	
Štúdium extracelulárnej a imobilizovanej sacharázy náprstníka	815	Study of Extracellular and Immobilized Saccharase in Foxglove	815
J. Stano, B. Diettrich, K. Mičieta, V. Blanáriková a M. Koreňová		J. Stano, B. Diettrich, K. Mičieta, V. Blanáriková, and M. Koreňová	
Obsah a zloženie škrobu v zrne pšenice, raže a tritikale	822	Starch Level and Composition of Wheat, Rye and Triticale Grains	822
D. Mikulíková, V. Horváthová a A. Žofajová		D. Mikulíková, V. Horváthová, and A. Žofajová	
Hodnocení vlastností pšeničského těsta analýzou NIR spekter mouky	829	Evaluation of Wheat Dough Properties by NIR Spectral Analysis of Flour	829
O. Jirsa, M. Hrušková a I. Švec		O. Jirsa, M. Hrušková, and I. Švec	
POLYSACHARIDY 2008	837	POLYSACHARIDES 2008	837

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 102 (2008), čís./no. 9 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 132, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 118 • 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 • REDAKTORŮ/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Heflajš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHNANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORŮ/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (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. Cervený, 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 ZAŠILÁNÍ 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: České Tiskárny, s.r.o., Generála Svobody 335, 533 51 Pardubice - Rosice nad Labem; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2008 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 153 Kč, roční plné předplatné 2008 (12 čísel) 1570 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 785 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 83 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 63 EUR (doručování via SCHS), 234 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & 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: M. Pojarová • Dáno do tisku 8.9.2008.